

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA APLICADA



ESTUDIO DE DIFERENTES ESTRATEGIAS ENCAMINADAS A LA  
DISMINUCIÓN DE LA INCIDENCIA DE *CAMPYLOBACTER* SPP. EN LA  
CADENA ALIMENTARIA

**MÓNICA GAÑÁN MARTÍNEZ-BALLESTA**



INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
Madrid, 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA APLICADA

**ESTUDIO DE DIFERENTES ESTRATEGIAS ENCAMINADAS A LA  
DISMINUCIÓN DE LA INCIDENCIA DE *CAMPYLOBACTER* SPP. EN LA  
CADENA ALIMENTARIA**

Memoria presentada por:

**MÓNICA GAÑÁN MARTÍNEZ-BALLESTA**

Para optar al grado de

**Doctora en Ciencia y Tecnología de los Alimentos**

Trabajo realizado bajo la dirección de:

**Dr. Alfonso V. Carrascosa**

**Dr. Adolfo J. Martínez-Rodríguez**

Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC

"Para edificar un santuario es necesario destruir  
otro". **Friedrich Nietzsche**

*Ya que los agradecimientos de una tesis doctoral constituyen una de las secciones que más miradas atraen, he querido extenderme un poco y expresar de esta manera mi gratitud hacia todas las personas que han hecho posible que este trabajo se haya llevado a feliz término.*

*En primer lugar agradezco al Consejo Superior de Investigaciones Científicas por la concesión de una beca I3P y del proyecto CCG07-CSIC/AGR-2255, y al C.I.C.Y.T. por los proyectos AGL2004-06933-CO2-01/ALI y AGL2003-01762, por el financiamiento que permitió el desarrollo de esta tesis; al Instituto de Fermentaciones Industriales (IFI), por haberme dado la oportunidad de disponer de sus instalaciones, en especial a la Dra. Lourdes Amigo, D. José Luis Andreu y la Dra. Encarnación Pueyo; y a la Universidad Autónoma de Madrid, por darme la oportunidad de continuar con mi carrera científica, sobre todo al Dr. Javier Tabera.*

*Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a los directores de este trabajo: al Dr. Alfonso V. Carrascosa, por abrirme las puertas de su laboratorio, convencerme de realizar esta tesis, haber sido el promotor de mi permanencia en Madrid y sobre todo, por confiar en mí en todo momento; y al Dr. Adolfo Martínez-Rodríguez, por su inagotable paciencia, por aguantar mis crisis, hiperactividad e ideas locas, pero principalmente, por su apoyo y seguimiento constantes. Mil gracias a ambos.*

*De igual manera, agradezco al resto del personal del Departamento de Microbiología del IFI: al Dr. Ramón González y a la Dra. Rosario Muñoz, por su interés en el desarrollo de este proyecto y por sus valiosas contribuciones; a Pepe, por brindarme siempre una sonrisa sincera, y a María Victoria, por su inestimable ayuda en el trabajo diario.*

*Me gustaría también dar las gracias a la Dra. Sonia de Pascual, del Instituto del Frío (CSIC) y a la Dra. Beatriz Miralles, del Instituto de Estudios Biofuncionales de la UCM, por la incalculable colaboración en el área de cultivos celulares y por el aporte en la sección de quitosanos, respectivamente. También quisiera agradecer al Departamento de Microbiología del Hospital de la Paz, en especial al Dr. Enrique de Miguel, por las facilidades prestadas.*

*I would like to thank the University of Reading for allowing me to use its facilities, but mostly for giving me the opportunity to broaden my horizons, compare, learn and see so many things. I would also like to thank the staff of the Department of Food Biosciences, especially Dr. Robert Rastall, for letting me feel part of that big family; Yvonne Harewood, for her sincere and useful help in all the details concerning the logistics of my stays; Kit Brownlee, Akile Defaye and Terry Handford, for their efforts to ensure my safety and for their useful collaboration in the development of my work; Dr. Bernard Mackey for his interest in the development of my experiments; Dr. David Owens, for having permitted me to use his Campylobacter strains and for his helpful advice on the operation of the VAIN. I cannot fail to mention my co-workers at the laboratory: Estela, Eva, Petros, Sofia, Sandra, Leticia, Adele, Simon, Andrew, Guryot, Carmen, Nui, Tae, Ana and Duncan. I would also like to thank the people that, however outside the University, made of my stay in Reading a unique experience: Carole and John Millington, and many others not mentioned here*

*for the lack of space, but that I remember with affection. I would especially like to thank Dr. Michelle Collins, for her selfless and useful help, for her constant monitoring of my work, for her critical but friendly view and for having taught me so many things. Thanks very much everybody!*

*I also would like to thank the Functional Foods Forum of the University of Turku, for the opportunity they gave me to work surrounded by such a quality team and for all the things I learned during my stay in Turku. Special thanks to Seppo Salminen, for opening the doors to his laboratory; Reetta Satoqari, for the constant interest in my work and life (and of course, for the heater); Satu Vesterlund, for the orientation, all the experimental help and the useful tips; Łukasz Grześkowiak, for the assistance in the laboratory and for being my personal tourist information office (yes, of course, also for the sweet bananas and the latin nights); Miguel Gueimonde, and Pirkko Aakko, for their priceless help.*

*No puedo dejar de mencionar a todos aquéllos que vivieron mi día a día durante estos años de arduo trabajo y con quienes quiero compartir este logro: mis compañeros de laboratorio. Por tantos buenos y malos momentos, por las peleas y por las risas, por convertirse en mi familia, por permitirme aprender algo nuevo cada día, y por toda la ayuda, comprensión y apoyo recibidos: Laurita (por adoptarme, por las tardes de patinaje y por tantos buenos recuerdos), Dani (por su amistad y sus magníficos desayunos pre-guerra-fría), Edu (por las risas y por los peores “mojijos” del mundo), Lauri (por los karaokes y todos los momentos compartidos dentro y fuera del labo), Pitu (por todas las risas, los viajes, las fiestas y por ser mi pañuelo tantas veces), Blanca (por poner orden en el caos reinante), Pura (por ser tan cariñoso y por ser mi mayor reto en la comprensión del castellano), Vanessa (por ser tan detallista, por las tardes de piscina y los conciertillos), la Wila (por nuestros altibajos y por todos los momentos compartidos, por más peculiares que hayan sido), Stefi (por ese año tan cortito, pero tan intenso), Angelita León (por los bailes y las conversaciones), Grego (por las guerras de contaminación, por ser mi confidente y por supuesto, por los peores chistes del planeta), Gemo (por ser mi mano derecha durante los últimos tiempos y por ser tan, pero tan buena), Chemito (por todas las risas), Inés (por compartir mi acento y mi cultura), Ángela Marcobal (por su cálida bienvenida), José Antonio (por estar siempre ahí), JP (por estar presente a pesar del tiempo y de la distancia), Max (por sus ganas de aprender), Manolín (por ser tan simpático y haber conquistado el labo en tan poco tiempo), Alba (por su gran dedicación) y Patri (por las conversaciones de chicas). A todos, gracias de corazón...nunca los olvidaré.*

*También debo agradecer a mis amigos más cercanos, por haber estado allí a lo largo de esta tesis, en especial a Daniel Salas, por todo su apoyo durante los momentos más duros, por escucharme, por el “brainwash” y por enseñarme tantas cosas; al Farmer, por su comprensión y apoyo durante las primeras etapas de esta tesis; a Krizia, entre otras cosas, por la valiosa información en el área de producción y consumo de productos naturales; a mis biólogos “nuevenueve”, por ser mi fuente de inspiración a pesar del tiempo y la distancia...chicos, ésta va por todos!!!*

*Por último, quisiera agradecer de manera especial a mi familia, por creer siempre en mí, por ayudarme a crecer y por ser mi soporte en todo momento: a Daniel, por escucharme, entenderme, cuidarme y por ser mi confidente; a mi madre, por su ánimo, paciencia, cuidado, comprensión y por esas comidas tan buenas; y a mi padre, por todos sus sabios consejos, su apoyo, su preocupación y sobre todo, por vivir como propios mis éxitos y fracasos.*

*...Y también a todos aquellos que de una u otra forma han contribuido a la realización de este trabajo y que por alguno motivo no forman parte de esta lista*

*Mil gracias*

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
Índice de tablas y figuras.	vi
Lista de abreviaturas.	x
Publicaciones, patentes y participación en congresos a las que ha dado origen esta tesis.	xiii
<b>Capítulo 1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Campylobacter</i>	3
1.1.1. Características fundamentales	3
1.1.2. Sintomatología y terapia en humanos	4
1.1.3. Transmisión y epidemiología	4
1.1.4. El pollo como principal reservorio de <i>Campylobacter</i> en la cadena alimentaria humana	8
1.1.5. Adherencia de <i>Campylobacter</i> a los epitelios intestinales	11
1.1.6. Invasión celular	12
1.2. Control de <i>Campylobacter</i> en la alimentación animal	13
1.3. Estrategias encaminadas a disminuir la incidencia de <i>Campylobacter</i>	14
1.3.1. Bacterias probióticas y exclusión competitiva	16
1.3.2. Compuestos antiadhesivos y antiinvasivos	18
1.3.3. Compuestos antimicrobianos	20
1.4. Ingredientes naturales y sostenibilidad	20
1.5. Principales modelos para el estudio <i>in vitro</i> de la adherencia e invasividad bacteriana	22
1.5.1. Estudios de adherencia a mucus intestinal	22
1.5.2. Estudios de adherencia e invasividad a células epiteliales	23
1.6. Plan de trabajo	26
1.7. Bibliografía	28
<b>Capítulo 2. Influencia de diferentes variables y determinantes de patogenicidad sobre la adherencia e invasividad de <i>Campylobacter</i></b>	<b>41</b>
2.1. Justificación y objetivos	43
2.2. Materiales y métodos	45
2.2.1. Células eucariotas	45
2.2.1.1. Material plástico	45
2.2.1.2. Medios y reactivos	45
2.2.1.3. Obtención de células Caco-2	45
2.2.1.4. Condiciones de cultivo de células Caco-2	45
2.2.1.5. Ensayos de viabilidad de células Caco-2	46
2.2.2. Células bacterianas	47
2.2.2.1. Medios y reactivos	47
2.2.2.2. Cepas bacterianas	47
2.2.2.3. Condiciones de cultivo de cepas de <i>Campylobacter</i>	47
2.2.2.4. Estudio fisiológico del crecimiento de <i>Campylobacter</i>	48
2.2.2.5. Efecto de las condiciones de incubación sobre la viabilidad de <i>Campylobacter</i>	48
2.2.2.6. Ensayos de viabilidad para <i>Campylobacter</i>	48
2.2.3. Ensayos de adherencia e invasividad a células Caco-2	48
2.2.3.1. Condiciones generales	48

2.2.3.2. Influencia del tiempo de incubación en ensayos de adherencia e invasividad de <i>Campylobacter</i>	50
2.2.3.3. Influencia de la concentración del inóculo de <i>Campylobacter</i> en ensayos de adherencia e invasividad	50
2.2.3.4. Influencia del pH en ensayos de adherencia e invasividad de <i>Campylobacter</i>	50
2.2.4. Estudio de factores de patogenicidad relacionados con la virulencia de <i>Campylobacter</i>	50
2.2.4.1. Extracción de ADN cromosómico bacteriano	50
2.2.4.2. Síntesis de cebadores	51
2.2.4.3. Amplificación del gen <i>flaA</i>	51
2.2.4.4. Digestión enzimática del gen <i>flaA</i>	52
2.2.4.5. Amplificación de los genes <i>cadF</i> , <i>ciaB</i> y <i>pldA</i>	52
2.2.4.6. Secuenciación de los genes <i>cadF</i> , <i>ciaB</i> y <i>pldA</i> y determinación de sus alineamientos	53
2.2.5. Análisis estadístico	53
2.3. Resultados y discusión	55
2.3.1. Influencia del tiempo de incubación en ensayos de adherencia e invasividad de <i>Campylobacter</i>	55
2.3.2. Influencia de la concentración del inóculo de <i>Campylobacter</i> en ensayos de adherencia e invasividad	57
2.3.3. Influencia del pH en ensayos de adherencia e invasividad de <i>Campylobacter</i>	58
2.3.4. Estudio de la fisiología de crecimiento de <i>Campylobacter</i>	60
2.3.5. Adherencia e invasividad de <i>Campylobacter</i> en fase exponencial y estacionaria a células Caco-2	62
2.3.6. Estudio de la presencia del gen <i>flaA</i>	65
2.3.7. Comparación de digestiones enzimáticas del gen <i>flaA</i>	66
2.3.8. Estudio de la presencia de los genes <i>cadF</i> , <i>ciaB</i> y <i>pldA</i>	67
2.3.9. Secuenciación de los genes <i>flaA</i> , <i>cadF</i> , <i>ciaB</i> y <i>pldA</i>	68
2.4. Conclusiones	72
2.5. Bibliografía	73
<b>Capítulo 3. Efecto de extractos de oligosacáridos pécticos sobre la adherencia e invasividad de <i>Campylobacter</i></b>	<b>77</b>
3.1. Justificación y objetivos	79
3.2. Materiales y métodos	81
3.2.1. Extracto de POS	81
3.2.1.1. Obtención del extracto de POS	81
3.2.1.2. Caracterización de la fracción glucídica del extracto de POS	81
3.2.2. Células eucariotas	81
3.2.2.1. Material plástico, medios, reactivos, obtención y condiciones de cultivo	81
3.2.2.2. Ensayos de viabilidad de células Caco-2	81
3.2.3. Células bacterianas	82
3.2.3.1. Medios, reactivos, cepas y condiciones de cultivo	82
3.2.3.2. Ensayos de viabilidad bacteriana	82
3.2.4. Ensayos de adherencia e invasividad a células Caco-2	82
3.2.4.1. Comparación de la capacidad de adherencia e invasividad de <i>Campylobacter</i> a células Caco-2 ND y DF	82
3.2.4.2. Efecto del extracto de POS sobre la adherencia e invasividad de <i>Campylobacter</i> a células Caco-2 ND y DF	83
3.2.4.3. Efecto de la concentración de POS sobre la invasión de <i>Campylobacter</i> a células Caco-2	83



3.2.4.4. Efecto del método de incubación empleado para ensayos de adherencia e invasividad de <i>Campylobacter</i> a células Caco-2	83
3.2.5. Análisis estadístico	84
3.3. Resultados y discusión	85
3.3.1. Caracterización del extracto de POS	85
3.3.2. Adherencia e invasividad de <i>Campylobacter</i> a células Caco-2 ND y DF	86
3.3.3. Influencia del extracto de POS sobre la adherencia e invasividad de <i>Campylobacter</i> a células Caco-2 ND y DF	87
3.3.4. Influencia de la concentración de POS sobre la invasividad de <i>Campylobacter</i>	89
3.3.5. Influencia de la preincubación de POS con <i>Campylobacter</i> en la adherencia e invasividad de células Caco-2	90
3.4. Conclusiones	92
3.5. Bibliografía	93
<b>Capítulo 4.</b> Influencia de las manoproteínas de levadura sobre la adherencia e invasividad de <i>Campylobacter</i>	95
4.1. Justificación y objetivos	97
4.2. Materiales y métodos	99
4.2.1. Extracción y caracterización de fracciones de manoproteínas	99
4.2.1.1. Levaduras y paredes celulares	99
4.2.1.2. Obtención de manoproteínas	99
4.2.1.2.1. Extracción enzimática	99
4.2.1.2.2. Extracción térmica	100
4.2.1.3. Tratamientos aplicados a la fracción de MT	100
4.2.1.3.1. Hidrólisis de las proteínas presentes en la fracción de MT	100
4.2.1.3.2. Hidrólisis ácida de los oligosacáridos presentes en MT	101
4.2.1.4. Caracterización de MT y ME	101
4.2.1.4.1. Fracción proteica	101
4.2.1.4.2. Polisacáridos	101
4.2.2. Células eucariotas	102
4.2.2.1. Material plástico, medios, reactivos, obtención y condiciones de cultivo	102
4.2.2.2. Ensayos de viabilidad de células Caco-2	103
4.2.3. Células bacterianas	103
4.2.3.1. Medios y reactivos	103
4.2.3.2. Cepas	103
4.2.3.3. Condiciones de cultivo de cepas bacterianas	104
4.2.3.4. Efecto de las condiciones de incubación sobre la viabilidad bacteriana	104
4.2.3.5. Ensayos de viabilidad bacteriana	104
4.2.4. Ensayos de adherencia e invasividad a células Caco-2	105
4.2.4.1. Efecto de los extractos de manoproteínas sobre la adherencia e invasividad bacteriana a células Caco-2	105
4.2.4.2. Determinación del efecto de la concentración de manoproteínas sobre la adherencia e invasividad de <i>Campylobacter</i>	105
4.2.5. Análisis estadístico	105
4.3. Resultados y discusión	107
4.3.1. Influencia del empleo de <i>S. cerevisiae</i> y sus paredes sobre la adherencia e invasividad de <i>Campylobacter</i> a células Caco-2	108
4.3.2. Extracción y caracterización de fracciones de manoproteínas de paredes de levaduras	108
4.3.3. Efecto de MT y ME sobre la adherencia e invasividad de <i>Campylobacter</i>	110
4.3.4. Influencia de la fracción proteica y efecto de la hidrólisis ácida de MT sobre la	112

adherencia e invasividad de <i>Campylobacter</i>	
4.3.5. Efecto de MTHA sobre la adherencia e invasividad de otros patógenos bacterianos asociados a pollos	115
4.3.6. Efecto de MTHA sobre potenciales probióticos para pollos	120
4.4. Conclusiones	125
4.5. Bibliografía	126
<b>Capítulo 5.</b> Propiedades antimicrobianas de quitosanos y sus oligómeros contra <i>Campylobacter</i>	135
5.1. Justificación y objetivos	137
5.2. Materiales y métodos	139
5.2.1. Obtención de quitosanos y sus oligómeros	139
5.2.2. Células bacterianas	140
5.2.2.1. Medios y reactivos, cepas y condiciones de cultivo	140
5.2.2.2. Ensayos de viabilidad bacteriana	140
5.2.3. Actividad antimicrobiana de Qs y sus oligómeros	140
5.2.4. Estudio del efecto de Qs y sus oligómeros sobre la integridad de la membrana celular bacteriana	140
5.2.4.1. Tinción con yoduro de propidio	140
5.2.4.2. Efecto de la fase de crecimiento sobre la integridad de la membrana de <i>Campylobacter</i>	141
5.2.5. Análisis estadístico	141
5.3. Resultados y discusión	142
5.3.1. Efecto del peso molecular de los Qs sobre el crecimiento bacteriano	142
5.3.2. Estudio de la integridad de la membrana celular bacteriana	145
5.3.3. Estudio de la integridad de la membrana celular de <i>Campylobacter</i> en diferentes fases de crecimiento	146
5.3.4. Obtención de oligómeros de quitosanos	148
5.3.5. Efecto de diferentes fracciones de oligómeros de quitosanos sobre la viabilidad de <i>Campylobacter</i>	150
5.4. Conclusiones	153
5.5. Bibliografía	154
<b>Capítulo 6.</b> Actividad antimicrobiana de compuestos fenólicos presentes en la uva y el vino contra <i>Campylobacter</i>	157
6.1. Justificación y objetivos	159
6.2. Materiales y métodos	161
6.2.1. Muestras de vinos	161
6.2.2. Compuestos fenólicos	161
6.2.3. Células bacterianas	161
6.2.4.1. Medios, reactivos, cepas y condiciones de cultivo	161
6.2.4. Influencia de la concentración de vino sobre la viabilidad de <i>Campylobacter</i>	161
6.2.5. Influencia del alcohol sobre la viabilidad de <i>Campylobacter</i>	161
6.2.6. Influencia del pH sobre la viabilidad de <i>Campylobacter</i>	161
6.2.7. Influencia de compuestos fenólicos del vino y la uva sobre la viabilidad de <i>Campylobacter</i>	162
6.2.8. Determinación de la integridad de la membrana celular bacteriana	162
6.2.9. Análisis estadístico	162
6.3. Resultados y discusión	163
6.3.1. Influencia de la concentración de vino sobre la viabilidad de <i>Campylobacter</i>	163

6.3.2. Influencia de la concentración de etanol sobre la viabilidad de <i>Campylobacter</i>	164
6.3.3. Influencia del pH sobre la viabilidad de <i>Campylobacter</i>	165
6.3.4. Influencia de compuestos fenólicos del vino y la uva sobre la viabilidad de <i>Campylobacter</i>	167
6.3.5. Estudio de la integridad de la membrana celular de <i>Campylobacter</i> después de su exposición a compuestos fenólicos del vino	172
6.4. Conclusiones	175
6.5. Bibliografía	176
<b>Capítulo 7. Influencia del mucus intestinal sobre la adherencia de <i>Campylobacter</i> y papel de las bacterias probióticas en el control de este patógeno</b>	<b>181</b>
7.1. Justificación y objetivos	183
7.2. Materiales y métodos	185
7.2.1. Obtención e inmovilización de soluciones de mucus	185
7.2.2. Células bacterianas	185
7.2.2.1. Medios, reactivos, cepas y condiciones de cultivo	185
7.2.3. Ensayos de adherencia a mucus intestinal	186
7.2.3.1. Ensayos de exclusión competitiva	186
7.2.4. Análisis estadístico	187
7.3. Resultados y discusión	188
7.3.1. Adherencia de bacterias probióticas a mucus intestinal	188
7.3.2. Determinación de la adherencia de <i>Campylobacter</i> y otros patógenos alimentarios en mucus de diferentes secciones intestinales	189
7.3.3. Ensayos de exclusión competitiva	192
7.4. Conclusiones	195
7.5 Bibliografía	196
<b>Anexos.</b>	<b>200</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.1.</b> Ciclo de transmisión de <i>Campylobacter</i> a humanos	6
<b>Figura 1.2.</b> Esquema del sistema digestivo del pollo	9
<b>Figura 1.3.</b> Esquema de las células epiteliales intestinales del pollo	10
<b>Figura 1.4.</b> Modelo hipotético del efecto de un oligosacárido específico como inhibidor de la adhesión de algunos enteropatógenos a las células intestinales del hospedador	19
<b>Tabla 2.1.</b> Cebadores para los genes <i>flaA</i> , <i>cadF</i> , <i>ciaB</i> y <i>pldA</i> empleados en este trabajo	51
<b>Figura 2.1.</b> Adherencia e invasividad de <i>C. jejuni</i> LP1 a cultivos de células epiteliales Caco-2 al emplear diferentes tiempos de incubación (1, 2, 3 y 4 h)	55
<b>Figura 2.2.</b> Adherencia e invasividad de <i>C. jejuni</i> LP1 a cultivos de células epiteliales Caco-2 empleando diferentes MOI (1000; 100; 10; 1; 0,1; y 0,01)	57
<b>Figura 2.3.</b> Adherencia e invasividad de <i>C. jejuni</i> LP1 a cultivos de células epiteliales Caco-2 a diferentes pH (5, 6 y 7)	59
<b>Figura 2.4.</b> Curvas de crecimiento de las cepas de colección <i>C. jejuni</i> 11168 y 11351, y de los aislados clínicos <i>C. coli</i> LP2, <i>C. jejuni</i> LP1 y <i>C. jejuni</i> 118	61
<b>Figura 2.5.</b> Adherencia e invasividad de las cepas <i>C. jejuni</i> 11168, 11351, LP1, 118, y <i>C. coli</i> LP2 en fase exponencial (18 h de crecimiento) y en fase estacionaria (40 h de crecimiento) a cultivos de células epiteliales Caco-2	63
<b>Figura 2.6.</b> Estudio de la presencia del gen <i>flaA</i> por medio de la extracción del ADN cromosómico, amplificación por PCR y migración en gel de agarosa	65
<b>Figura 2.7.</b> Digestión enzimática del gen <i>flaA</i>	67
<b>Figura 2.8.</b> Estudio de la presencia de los genes <i>cadF</i> , <i>ciaB</i> y <i>pldA</i> por medio de la extracción del ADN cromosómico, amplificación por PCR y migración en gel de agarosa	68
<b>Tabla 2.2.</b> % de identidad entre secuencias de los genes <i>flaA</i> , <i>ciaB</i> , <i>cadA</i> , <i>pldA</i> entre las cepas <i>C. jejuni</i> NCTC 11168, <i>C. jejuni</i> NCTC 11351, <i>C. jejuni</i> LP1, <i>C. coli</i> LP2 y <i>C. jejuni</i> 118	69
<b>Tabla 3.1.</b> Composición porcentual de monosacáridos en la muestra de POS	85
<b>Figura 3.1.</b> Adherencia e invasividad de <i>C. jejuni</i> NCTC 11351 a cultivos de células epiteliales Caco-2 ND y DF	86
<b>Figura 3.2.</b> Influencia del extracto de POS (2,5 mg/mL) sobre la adherencia e invasividad de <i>C. jejuni</i> NCTC 11351 a cultivos de células epiteliales Caco-2 ND y DF	88
<b>Figura 3.3.</b> Influencia de la concentración de POS sobre la invasividad de <i>C. jejuni</i> NCTC 11351 a cultivos de células epiteliales Caco-2 ND	89
<b>Figura 3.4.</b> Efecto del método de incubación sobre la adherencia e invasividad de <i>C. jejuni</i> NCTC 11351 a cultivos de células epiteliales Caco-2 ND	90
<b>Figura 4.1.</b> Influencia de la presencia de MAN, LEC y PAC (15 mg/mL) sobre la adherencia e	107

invasividad de <i>C. jejuni</i> LP1 a cultivos de células Caco-2 no diferenciadas	
<b>Tabla 4.1.</b> Composición porcentual de proteínas y polisacáridos de ME y MT de paredes celulares de <i>S. cerevisiae</i>	109
<b>Figura 4.2.</b> Análisis por electroforesis SDS-PAGE de ME y MT	110
<b>Figura 4.3.</b> Influencia de ME y ME (15 mg/mL) sobre la adherencia e invasividad de <i>C. jejuni</i> LP1 a cultivos de células epiteliales Caco-2 no diferenciadas	111
<b>Figura 4.4.</b> Influencia de diferentes concentraciones (0; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 15 mg/mL) de MT sobre la invasividad de <i>C. jejuni</i> LP1 a cultivos de células epiteliales Caco-2 no diferenciadas	112
<b>Figura 4.5.</b> Perfil proteico de la fracción de MTP y MTP1	113
<b>Figura 4.6.</b> Influencia de los extractos de manoproteínas térmicas (15 mg/mL) sometidos a hidrólisis ácida, e hidrolizados con pronasa y su control preparado con pronasa inactiva sobre la adherencia e invasividad de <i>C. jejuni</i> LP1 a cultivos de células epiteliales Caco-2 no diferenciadas	114
<b>Figura 4.7.</b> Adherencia e invasividad de <i>S. typhimurium</i> ATCC 1428, <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853, <i>Klebsiella</i> spp. IFb y <i>S. sonnei</i> CECT 457 a cultivos de células epiteliales Caco-2 no diferenciadas	116
<b>Tabla 4.2.</b> Influencia del extracto de MTHA (15 mg/mL) sobre la adherencia e invasividad de <i>S. typhimurium</i> ATCC 1428, <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853, <i>Klebsiella</i> spp. IFb y <i>S. sonnei</i> CECT 457 a cultivos de células epiteliales Caco-2 no diferenciadas	118
<b>Figura 4.8.</b> Adherencia e invasividad de <i>L. plantarum</i> ATCC 10241, <i>L. salivarius</i> IFa, <i>L. casei</i> CECT 475, <i>E. faecium</i> BIFI-58 y <i>P. damnosus</i> DSM 20331 a cultivos de células epiteliales Caco-2 no diferenciadas	121
<b>Figura 4.9.</b> Influencia del extracto de manoproteínas (15 mg/mL) sometido a hidrólisis ácida (MTHA) sobre el crecimiento de <i>L. plantarum</i> ATCC 10241, <i>L. salivarius</i> IFa, <i>L. casei</i> CECT 475, <i>E. faecium</i> BIFI-58 y <i>P. damnosus</i> DSM 20331	122
<b>Figura 4.10.</b> Influencia del extracto de manoproteínas (15 mg/mL) sometido a hidrólisis ácida (MTHA) sobre la adherencia de <i>L. plantarum</i> ATCC 10241, <i>L. salivarius</i> IFa, <i>L. casei</i> CECT 475, <i>E. faecium</i> BIFI-58 y <i>P. damnosus</i> DSM 20331 a cultivos de células epiteliales Caco-2 no diferenciadas	123
<b>Tabla 5.1.</b> Condiciones empleadas para las reacciones enzimáticas	139
<b>Tabla 5.2.</b> Influencia de los Quitosanos de diferentes pesos moleculares (A: 120 kDa; B: 400 kDa; C: 643 kDa) (0,5%) sobre la viabilidad de <i>C. jejuni</i> LP1, <i>C. jejuni</i> NTCC 11351, <i>C. jejuni</i> NTCC 11168, <i>C. coli</i> LP2, <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853, <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>L. salivarius</i> IFa y <i>L. casei</i> CECT 475	142
<b>Tabla 5.3.</b> Concentración mínima inhibitoria del Qs A sobre el crecimiento de <i>C. jejuni</i> LP1, <i>C. jejuni</i> NTCC 11351, <i>C. jejuni</i> NTCC 11168 y <i>C. coli</i> LP2	144

<b>Figura 5.1.</b> Permeabilidad al yoduro de propidio de las células de <i>C. jejuni</i> LP1, <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853 y <i>L. salivarius</i> IFa expuestas al Qs A	145
<b>Figura 5.2.</b> Permeabilidad al yoduro de propidio de las células de <i>C. jejuni</i> LP1 y <i>C. jejuni</i> NCTC 11351 durante diferentes etapas de crecimiento, en fase exponencial (1, 3, 5 y 7 h) y en fase estacionaria (24 h)	147
<b>Tabla 5.4.</b> PM y grado de deacetilación obtenidos por viscosimetría de los Qs D y E	148
<b>Figura 5.3.</b> Variación en el tiempo de la viscosidad específica de los Qs D y E tras su depolarización con lisozima o quitosanasas	149
<b>Tabla 5.5.</b> Influencia de fracciones de oligómeros de quitosanos (0,05%) de diferentes pesos moleculares (>30 KDa, 30-10 KDa, 10-3 KDa) extraídas con quitosanasas o lisozima, sobre la viabilidad de <i>C. jejuni</i> LP1	151
<b>Tabla 6.1.</b> Influencia de diferentes concentraciones (100, 75, 50, 25, 10 y 1%) de vino blanco, tinto y rosado sobre la viabilidad de <i>C. jejuni</i> LP1	163
<b>Figura 6.1.</b> Influencia de la concentración de etanol sobre la viabilidad de <i>C. jejuni</i> LP1	165
<b>Figura 6.2.</b> Influencia del pH sobre la viabilidad de <i>C. jejuni</i> LP1 en comparación al control (pH 7).	166
<b>Tabla 6.2.</b> Influencia de diferentes compuestos fenólicos presentes en el vino sobre la viabilidad de <i>C. jejuni</i> LP1 y <i>C. jejuni</i> NCTC 11351 empleando concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 mg/mL.	168
<b>Figura 6.3.</b> Permeabilidad al IP de las cepas <i>C. jejuni</i> LP1 (LP1) y <i>C. jejuni</i> NCTC 11351 (11351) expuestas a diferentes compuestos fenólicos puros presentes en el vino (1000 mg/mL).	173
<b>Figura 7.1.</b> Adherencia de probióticos a mucus intestinal de pollo proveniente de yeyuno (Ye), colon (Co) y ciego (Ci)	188
<b>Tabla 7.1.</b> Adherencia de <i>C. jejuni</i> NCTC 11351, <i>C. jejuni</i> NCTC 11168, <i>C. jejuni</i> 118 y <i>C. jejuni</i> LP1, <i>C.coli</i> LP2, <i>E. coli</i> H-10407 y <i>S. typhimurium</i> 14028 a mucus intestinal de pollo y pavo proveniente de yeyuno (Ye), colon (Co) y ciego (Ci).	190
<b>Figura 7.2.</b> Adherencia de <i>C. jejuni</i> NCTC 11351 (11351), NCTC 11168 (11168), 118, LP1 y <i>C. coli</i> LP2 a mucus intestinal de colon humano.	192
<b>Tabla 7.2.</b> Adherencia de <i>C. jejuni</i> NCTC 11168, <i>C. jejuni</i> 118 y <i>C. coli</i> LP2 a mucus proveniente de yeyuno (Ye), colon (Co) y ciego (Ci) de pollo en presencia de Broilact®, LGG, JS y LAC.	193
<b>Tabla A.1.</b> Influencia de las condiciones de incubación durante los ensayos de adherencia e invasividad sobre la viabilidad bacteriana	201
<b>Tabla A.2.</b> Efecto del pH del medio (7, 6, 5) sobre la viabilidad de cultivos de células epiteliales Caco-2 no diferenciadas. y cultivos en fase exponencial de <i>C. jejuni</i> LP1	202

<b>Tabla A.3.</b> Relación entre el pH intestinal de pollos y la capacidad de colonización de <i>C. jejuni</i>	203
<b>Tabla A.4.</b> Influencia de diferentes concentraciones de gentamicina (GTM), antibiótico utilizado en las pruebas de invasividad, sobre la viabilidad de los diferentes microorganismos	204
<b>Tabla A.5.</b> Influencia de los diferentes compuestos empleados en pruebas de adherencia e invasividad sobre la viabilidad de cultivos de células epiteliales Caco-2	205
<b>Tabla A.6.</b> Efecto de los diferentes compuestos empleados en pruebas de adherencia e invasividad sobre la viabilidad de <i>C. jejuni</i> (LP1, NCTC 11168, NCTC 11351), <i>C. coli</i> LP2, <i>S. typhimurium</i> ATCC 1428, <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853, <i>K. planticola</i> CECT 843 y <i>S. sonnei</i> CECT 457	206
<b>Figura A.1.</b> Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del gen <i>ciaB</i> de las cepas de <i>C. jejuni</i> 118, <i>C. jejuni</i> NCTC 11168, <i>C. jejuni</i> LP1, <i>C. jejuni</i> NCTC 11351 y <i>C. coli</i> LP2	207
<b>Figura A.2.</b> Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del gen <i>cadF</i> de las cepas de <i>C. jejuni</i> 118, <i>C. jejuni</i> NCTC 11168, <i>C. jejuni</i> LP1, <i>C. jejuni</i> NCTC 11351 y <i>C. coli</i> LP2	208
<b>Figura A.3.</b> Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del gen <i>pldA</i> de las cepas de <i>C. jejuni</i> 118, <i>C. jejuni</i> NCTC 11168, <i>C. jejuni</i> LP1, <i>C. jejuni</i> NCTC 11351 y <i>C. coli</i> LP2	209
<b>Figura A.4.</b> Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del gen <i>flaA</i> de las cepas de <i>C. jejuni</i> 118, <i>C. jejuni</i> NCTC 11168, <i>C. jejuni</i> LP1, <i>C. jejuni</i> NCTC 11351 y <i>C. coli</i> LP2	210
<b>Figura A.5.</b> Modelo de la estructura del ramnogalacturano I	211

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta$ FR	Incremento de fluorescencia relativa con respecto al control
° C	Grados centígrados
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ mol	Micromol
11168	<i>C. jejuni</i> NCTC 11168
11351	<i>C. jejuni</i> NCTC 11351
118	<i>C. jejuni</i> 118
219	<i>Lactobacillus paracasei</i> (Bio, Danone)
25922	<i>E. coli</i> ATCC 25922
25923	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
27853	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
475	<i>L. casei</i> 475
5% CO <sub>2</sub>	Incubación a 38° C y con 5% CO <sub>2</sub>
705	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LC-705 (Bioprofit)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AERO	Incubación bajo condiciones aeróbicas
BB	Caldo de cultivo Brucella
bp	Pares de bases
BSA	Albúmina sérica bovina
Caco-2	Células epiteliales humanas derivadas de adenocarcinoma de colon
<i>cadF</i>	Gen que codifica para la proteína CadF
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
Ci	Ciego
Cia	Antígenos de invasión de <i>Campylobacter</i>
<i>ciaB</i>	Gen que codifica para la proteína CiaB
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
Co	Colon
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
cm	Centímetro
cm <sup>2</sup>	Centímetro cuadrado
DF	Células Caco-2 diferenciadas
DMEM	Medio Eagle modificado con glutamina y piruvato
dNTPs	Solución de deoxinucleótidos trifosfato
D.O.	Densidad óptica
EC	Exclusión competitiva
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
EE.UU.	Estados Unidos
<i>flaA</i>	Gen que codifica para la proteína FlaA
FR	Fluorescencia relativa
g	Gramo
GTM	Gentamicina
h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico
IFa	<i>L. salivarius</i> IFa
IP	Yoduro de propidio
JS	<i>Proteobacillus freudenreichii</i> ssp <i>Shermanii</i> (Bioprofit)
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton



KPa	Kilopascal
<i>K. planticola</i>	<i>Klebsiella planticola</i>
L	Litro
La14	<i>Lactobacillus acidophilus</i> La14
LAB	Bacterias ácido lácticas
LAC	<i>Lactobacillus lactis</i> ssp <i>Lactis</i>
<i>L. casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
LEC	Levaduras calentadas
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53103 (Valio Ltd)
LP1	<i>C. jejuni</i> LP1
LP2	<i>C. coli</i> LP2
Lp15	<i>Lactobacillus plantarum</i> Lp115
<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LPS	Lipopolisacáridos
<i>L. salivarius</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
Log	Logaritmo
M	Molaridad/Molar
MAN	Manosa
ME	Manoproteínas de extracción térmica
mg	Miligramo
MHS	Agar Müeller-Hinton con 5% de sangre de cordero desfibrinada
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Micromoles/Micromolar
MOI	Multiplicidad de infección
MT	Manoproteínas de extracción enzimática
MTHA	Manoproteína térmica sometida a hidrólisis ácida
MTP	Manoproteína térmica hidrolizada con pronasa
MTPI	Manoproteína térmica hidrolizada con pronasa previamente inactivada
n	Número de muestras
N	Número de experimentos
N <sub>2</sub>	Nitrógeno
NaCl	Cloruro de sodio
NCTC	Colección Nacional de Cultivos Tipo
ND	Células Caco-2 no diferenciadas
nm	Nanómetro
O <sub>2</sub>	Oxígeno
P	Fracción parental de los oligómeros de quitosanos
PAC	Paredes de levaduras calentadas
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	Tampón fosfato salino
PBS <sup>-Ca//Mg</sup>	Tampón fosfato salino libre de Calcio y Magnesio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>P. damnosus</i>	<i>Pediococcus damnosus</i>
Plant	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014
<i>pldA</i>	Gen que codifica para la proteína PldA
PM	Peso molecular
POS	Oligosacáridos pécticos
p/v	Relación peso sobre volumen
Qs	Quitano
REU	<i>Lactobacillus reuteri</i> INGI
rpm	Revoluciones por minuto
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

SDS	Dodecil sulfato de sodio
seg	Segundos
<i>S. enteritidis</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
SFB	Suero fetal bovino
Shi	<i>Lactobacillus paracasei</i> (Yacult)
<i>S. sonnei</i>	<i>Shigella sonnei</i>
SM	Marcador molecular
SP	Mezcla de estreptomicina y penicilina
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
ufc	Unidades formadoras de colonias
TAE	Tampón tris-fosfato-EDTA
V	Voltios
VAIN	Incubador de atmósfera variable/Condiciones de incubación de microaerofilia
v/v	Relación volumen sobre volumen
Ye	Yeyuno

## Publicaciones, patentes y participación en congresos a las que ha dado origen esta tesis

### Publicaciones peer review

**Capítulo 1.** Ganan, M., Martínez-Rodríguez, A. J., Carrascosa. New strategies for the control of *Campylobacter* spp. (Manuscrito enviado para su revisión).

**Capítulo 2.** Gañan, M., Muñoz, R., Carrascosa, A.V., Martínez-Rodríguez, A.J. Study of genetic determinants of pathogenicity on the adherence and invasion of *Campylobacter* spp. to Caco-2 cultures (Manuscrito enviado para su revisión).

**Capítulo 3.** Ganan, M., Collins, M., Rastall, R., Hotchkiss, A.T., Chau, H.K., Carrascosa, A.V., Martínez-Rodríguez, A.J. Inhibition by pectic oligosaccharides of the invasion of undifferentiated and differentiated Caco-2 cells by *Campylobacter jejuni* (Manuscrito enviado para su revisión).

**Capítulo 4.** Gañan, M., Carrascosa, A.V., de Pascual-Teresa, S., Martínez-Rodríguez A.J. 2009. Inhibition of the invasion of *Campylobacter jejuni* LP1 strain to a Caco-2 cell culture model by a yeast mannoprotein fraction. *Journal of Food Protection*. 72: 55-59; Martínez-Rodríguez A.J., Gañan, M., Pascual-Teresa, S., Carrascosa, A.V. 2007. Influence of two mannoprotein extracts obtained from *S. cerevisiae* on the adherence and invasion of *C. jejuni* to a Caco-2 cell culture model. *Zoonoses and Public Health*. 54(S1): 94.

**Capítulo 5.** Gañan, M., Carrascosa, A.V., Martínez-Rodríguez A.J. 2009. Antimicrobial activity of chitosan against *Campylobacter* spp. and other microorganisms and its mechanism of action. *Journal of Food Protection* 72: 1735-1738; Mengibar, M., Ganan, M., Miralles, B., Carrascosa, A.V., Martínez-Rodríguez, A.J., Heras, A. Antimicrobial activity of chitosan oligosaccharides (COS) against *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) (Manuscrito enviado para su revisión).

**Capítulo 6.** Gañan, M., Carrascosa, A.V., Martínez-Rodríguez A.J. 2009. Antimicrobial activity of phenolic compounds of wine against *Campylobacter jejuni*. *Food Control*. 20: 739-742.

**Capítulo 7.** Ganan, M., Martínez-Rodríguez, A. J., Carrascosa, A.V., Satokari, R., Vesterlund, S. *In vitro* adhesion of *Campylobacter* spp. to chicken intestinal mucus and influence of probiotic bacteria (Manuscrito en preparación).

### Patentes

**Capítulo 6.** Gañan, M., Carrascosa, A.V., Martínez-Rodríguez, A. Compuesto bactericida contra *Campylobacter jejuni*. Nº de solicitud: P200801501. País de prioridad: España. Fecha de prioridad: 22/05/2008. Entidad titular: CSIC.

### Participación en congresos

**Capítulo 2.** Gañan, M., Carrascosa, A.V., de Pascual-Teresa, S., Martínez-Rodríguez, A. 2006. Estudios de la adherencia e invasividad de *Campylobacter* sp. en células Caco-2. Biospain-Biotech 2006. Madrid, *España*.

**Capítulo 4.** Gañan, M., Carrascosa, A., de Pascual-Teresa, S., Martínez-Rodríguez, A. 2007. Effect of two mannoprotein extracts on the adherence and invasion of *Campylobacter* spp. to Caco-2 cells. 14th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms (CHRO), Rotterdam, *Holanda*.

**Capítulo 5.** Mengibar, M., Ganan, M., Miralles, B., Carrascosa, A.V., Martínez-Rodríguez, A.J., Heras, A. 2009. Antimicrobial activity of chitosan oligosaccharides (COS) against *Campylobacter jejuni*. The 11<sup>th</sup> International Conference on Chitin and Chitosan, and the 8<sup>th</sup> Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symposium. Taipei, *Taiwan*.

**Capítulo 5.** Martínez-Rodríguez, A., Ganan, M., Carrascosa, A.V. 2009. Antimicrobial activity of chitosan against *Campylobacter* spp. and other microorganisms. International Congress on Food Safety. Girona, *España*.

**Capítulo 5.** Gañan, M., Carrascosa, A., Martínez-Rodríguez, A. 2008. Los quitosanos como compuestos antimicrobianos de uso potencial en la industria alimentaria contra *Campylobacter* spp. Cytalia 2008, XIII Congreso Annual de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Madrid, *España*.

*Campylobacter* es considerado a escala mundial como el mayor patógeno bacteriano causante de enfermedades gastrointestinales asociadas a alimentos, siendo las aves y en especial el pollo la principal fuente de infección en humanos. Teniendo en cuenta que una gran parte de la producción mundial de pollos se encuentra contaminada con el patógeno y debido a la reciente prohibición en la Unión Europea de los antibióticos promotores del crecimiento en la alimentación animal, resulta fundamental la búsqueda de nuevas estrategias naturales que permitan disminuir la incidencia de esta bacteria en la cadena alimentaria, primordialmente en su principal hospedador. Se cree que la habilidad de *Campylobacter* de establecerse en el tracto gastrointestinal de los pollos conlleva su adherencia, primero a la capa de mucus que recubre el intestino y posteriormente, a las células epiteliales intestinales. Como paso final, una vez adherida de manera específica e irreversible, la bacteria debe invadir dichas células. Debido a lo anterior, el uso de agentes que logren evitar la adherencia y/o invasión del patógeno a nivel del hospedador, resulta una opción de interés en la lucha contra *Campylobacter*. Otra estrategia alternativa a valorar es la inclusión en la dieta de bacterias probióticas capaces de competir por nutrientes y por los sitios de adherencia en el mucus y las células, de producir sustancias nocivas contra el patógeno y de modular la respuesta inmune. De igual manera, el uso de compuestos antimicrobianos de origen natural en la alimentación de los pollos parece ser otra estrategia alternativa para afrontar este problema. En el presente trabajo se estudiarán las diferentes estrategias mencionadas, encaminadas a lograr la erradicación o la disminución de la presencia de *Campylobacter* en pollos, con miras al control de este patógeno dentro de la cadena alimentaria humana.

Capítulo

1

Introducción

## 1.1. *Campylobacter*

### 1.1.1. Características fundamentales

*Campylobacter* es considerado como el agente microbiano más común causante de enfermedades diarreicas bacterianas asociadas a los alimentos (Levin, 2007; Crushell *et al.*, 2004; WHO, 2002; Allos, 2001; Allos y Blaser, 1995), excediendo los casos encontrados para *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli* O157:H7 (Allos, 2001). Se cree que este patógeno podría ser responsable de entre 400 y 500 millones de casos de gastroenteritis anualmente en todo el mundo (Friedman *et al.*, 2000).

El género *Campylobacter* comprende 17 especies, 14 de las cuales han sido asociadas a enfermedades en humanos, y entre éstas, *C. jejuni* y *C. coli* suman más del 95% de las infecciones ocasionadas por este género (Park, 2002; Lastovica y Skirrow, 2000). Los miembros del género *Campylobacter* se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, con forma curvada en espiral y con uno o dos flagelos polares. *Campylobacter* posee un movimiento característico que se asemeja al de un sacacorchos, que le permite movilizarse en la capa mucosa que recubre las paredes del tracto gastrointestinal y que generalmente paraliza a otros bacilos móviles (Altekruse *et al.*, 1999; Shigematsu *et al.*, 1998).

Una característica común en los patógenos asociados a los alimentos es que suelen ser organismos resistentes a las tecnologías utilizadas para la conservación de éstos, debido a la necesidad de sobrevivir bajo las condiciones adversas impuestas por el procesamiento y la aplicación de aditivos. A diferencia de estos, *Campylobacter* posee numerosos requerimientos de crecimiento y una sensibilidad inusual al estrés ambiental. De forma paradójica, a pesar de ser el patógeno bacteriano asociado a alimentos de mayor incidencia, *Campylobacter* parece carecer de muchas de las respuestas adaptativas que pueden estar relacionadas con la resistencia al estrés presente en otros patógenos de alimentos (Park, 2002).

Entre sus requerimientos de crecimiento, el más característico es su condición de microaerófilo, ya que crece óptimamente en atmósferas con 5% O<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub> y 10% CO<sub>2</sub> (Altekruse *et al.*, 1999). Además de lo anterior y a pesar de ser un microorganismo termófilo, con temperaturas óptimas de crecimiento entre 37° C y 42° C, es sensible a las altas temperaturas y no es capaz de sobrevivir en alimentos pasteurizados o adecuadamente cocinados (Altekruse *et al.*, 1999; Tauxe, 1992). *Campylobacter* es muy sensible a la desecación y al estrés osmótico, por lo que no sobrevive en

ambientes secos ni a concentraciones de cloruro de sodio mayores a 2% (Fernandez *et al.*, 1985; Doyle y Roman, 1982; Blaser *et al.*, 1980).

Son justamente estas características las que restringen la capacidad de multiplicación de este microorganismo fuera del animal hospedador y, a diferencia de la mayoría de los patógenos alimentarios, no es capaz de multiplicarse en los alimentos durante su procesamiento o almacenamiento (Fernandez *et al.*, 1985).

### **1.1.2. Sintomatología y terapia en humanos**

El espectro clínico de la enfermedad entérica ocasionada por *Campylobacter*, principalmente por *C. jejuni* y *C. coli*, varía de diarrea severa inflamatoria a diarrea moderada no inflamatoria. La severidad de los síntomas depende tanto de la cepa contaminante como del estado físico del hospedador.

A pesar de ser autolimitante en la mayoría de los casos, la infección con *Campylobacter* puede acarrear graves complicaciones. Se ha visto la aparición de algunas secuelas derivadas de la infección con este patógeno como el síndrome Guillian-Barré (Susuki *et al.*, 2004), el síndrome de Reiter o la artritis reactiva (Crushell *et al.*, 2004; Hannu *et al.*, 2004).

Las terapias antimicrobianas son necesarias en pacientes con enteritis severas o prolongadas (especialmente neonatos y ancianos), septicemias y cuando se observan manifestaciones extra-intestinales. Entre los antibióticos que más se usan en esta terapia, se incluyen ciprofloxacina (Oldfield y Wallace, 2001) y eritromicina (Hakanen *et al.*, 2003).

Los crecientes incrementos en la tasa de infecciones por *Campylobacter* causadas por cepas resistentes a antibióticos hace que la terapia de estas enfermedades sea aún más difícil (Murphy *et al.*, 1996; Piddock, 1995).

### **1.1.3. Transmisión y epidemiología**

En humanos, las infecciones por *Campylobacter* son generalmente resultado de la ingesta de alimentos contaminados de origen animal, siendo las aves, en especial el pollo, su principal reservorio,

aunque también puede encontrarse en otras aves de corral, ganado bovino, porcino y ovino, en animales y aves silvestres, y en mascotas (Lee y Newell, 2006; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2004; Stanley y Jones, 2003; Friedman *et al.*, 2000).

Se ha visto que gran parte de la producción mundial de pollos se encuentra contaminada con *Campylobacter* (Willis y Murray, 1997; Stern y Line, 1992). Algunos estudios demuestran que más del 98% de los productos derivados de pollos crudos encontrados en establecimientos comerciales pueden estar contaminados con esta bacteria (Hanninen *et al.*, 2000; Jacobs- Reitsma, 2000; Pearson *et al.*, 2000; Madden *et al.*, 1998). De igual forma, en estudios realizados en EE.UU. se ha determinado que cerca del 90% de las plantas productoras de pollos se encuentran contaminadas con *Campylobacter* (Stern *et al.*, 2001). En Europa, por otra parte, se ha visto que la presencia de este patógeno en este tipo de plantas es de 18-90%, siendo menor su incidencia en el norte del continente, por razones desconocidas (Newell y Fearnley, 2003).

La contaminación cruzada debida a la manipulación inadecuada de los alimentos a nivel doméstico es una fuente importante de infección (Mattick *et al.*, 2003; Allos, 2001). A pesar de que el proceso de congelación de carnes contaminadas reduce significativamente su supervivencia (Humphrey y Cruickshank, 1985), este patógeno ha podido ser aislado de productos previamente congelados (Fernandez *et al.*, 1985).

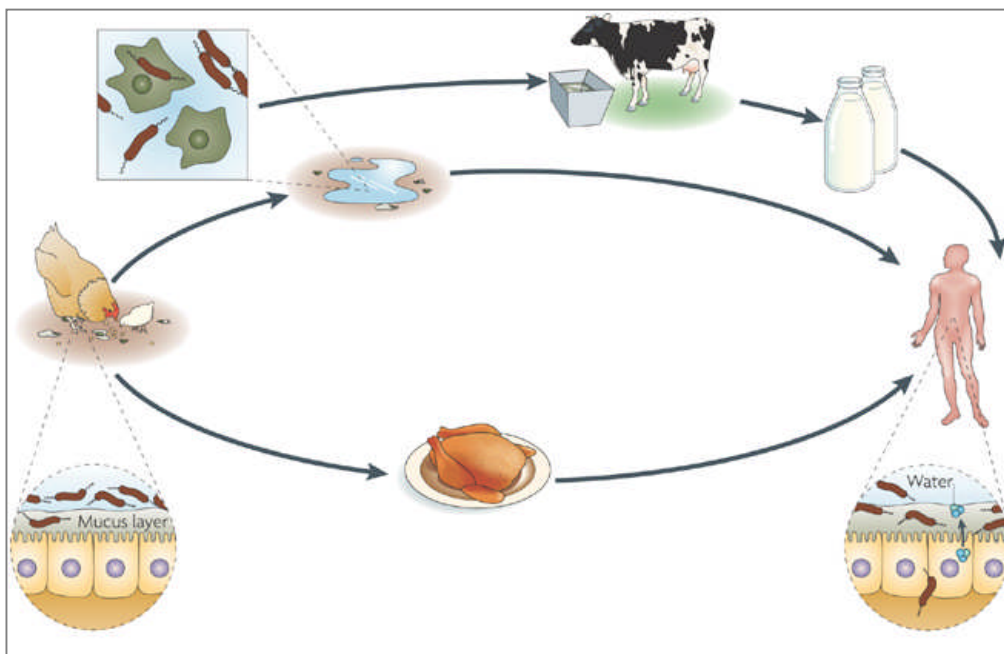
Estudios epidemiológicos realizados por la FAO (FAOSTAT, 2006) indican que existe una relación lineal entre la presencia de *Campylobacter* en pollos y la incidencia de campilobacteriosis en humanos, por lo tanto, una reducción en la infección de los pollos debería contribuir efectivamente a una reducción substancial en la incidencia de la enfermedad en humanos (WHO, 2001).

La mayoría de las enfermedades causadas por *Campylobacter* en humanos corresponden a casos aislados y los brotes epidémicos son poco frecuentes y suelen estar asociados al consumo de leche no pasteurizada o de aguas contaminadas (Figura 1.1.) (Ketley, 1999; Skirrow, 1991; Humphrey y Cruickshank, 1988; Blaser *et al.*, 1987).

Se cree que los casos de campilobacteriosis a nivel mundial constituyen únicamente una fracción pequeña de los existentes, debido principalmente a que en muchos países, como es el caso de España, no es obligatoria su declaración, además de las dificultades en el diagnóstico del patógeno y a que en numerosos casos sus síntomas son moderados y no requieren de la intervención médica (Butzler, 2004).



La epidemiología de *Campylobacter* es diferente en países en vías de desarrollo que en los industrializados. En los primeros, las infecciones asintomáticas son comunes en niños y adultos, mientras que en los países industrializados este tipo de infecciones es poco común. En los países en vías de desarrollo encontrados en áreas tropicales las infecciones por *Campylobacter* son endémicas entre los niños, especialmente en los menores de 2 años (Allos, 2001). El número de casos diagnosticados en países no industrializados es menor que los de los países desarrollados. A pesar de la escasez de casos, se ha visto que *Campylobacter* es el segundo patógeno aislado de las heces de pacientes con gastroenteritis en Barbados (Workman *et al.*, 2005), mientras que en Sudáfrica se ha observado una alta incidencia del patógeno entre la población infantil menor de 2 años (Samie *et al.*, 2007; Richardson *et al.*, 1983).



**Figura 1.1.** Ciclo de transmisión de *Campylobacter* a humanos (Young *et al.*, 2007).

En EE.UU. *Campylobacter* es detectado con más frecuencia que *Salmonella* y *Shigella* juntos (Centre for Disease Control and Prevention, 1999), con un total estimado de entre 2,1 y 2,4 millones de casos al año (CDC, 2007). En Inglaterra y Gales los datos de infecciones al año por *Campylobacter* ascienden a 85 casos por cada 100.000 habitantes, aunque se cree que el número real de infecciones es cercano a 1100 por cada 100.000 habitantes (HPA, 2009). En Holanda se han detectado hasta 56 casos por cada 100.000 habitantes entre 2000 y 2004 (Van Hees *et al.*, 2007). *Campylobacter* también

ha sido reconocido como el mayor causante de diarrea bacteriana en los países del norte de Europa (Vierikko *et al.*, 2004; Rautelin y Aninén, 2000; Kapperud *et al.*, 1992), llegándose a registrar en Finlandia durante 1999, hasta 101 casos de campilobacteriosis por cada 100.000 habitantes (Vierikko *et al.*, 2004).

Según la agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), la campilobacteriosis es la enfermedad de origen animal que con más frecuencia ataca a los europeos, seguida por la salmonelosis y la listeriosis. Según el último informe, se registraron en Europa 200.507 casos en 2007, lo que corresponde a 11,4 casos por cada 100.000 habitantes. Lo anterior supone un aumento del 14,2% con respecto a los casos del año 2006 (EFSA, 2007).

Aunque en España el Centro Nacional de Epidemiología lleva a cabo la identificación y control de microorganismos implicados en infecciones, los datos registrados para *Campylobacter* no corresponden al total de casos reales. A pesar de que las limitaciones propias del sistema de registro e información, se ha podido determinar que en nuestro país los dos principales patógenos bacterianos relacionados con el consumo de alimentos son *Campylobacter* y *Salmonella* (Centro Nacional de Epidemiología, 2008).

Según el Boletín Epidemiológico de la Comunidad de Madrid, los patógenos bacterianos declarados más frecuentemente son *Salmonella pyogenes* (17% de los casos), *Campylobacter jejuni* (11%) y *Salmonella enteritidis* (9%), siendo responsables de aproximadamente el 40% del total de los agentes infecciosos identificados. Las infecciones gastrointestinales son el motivo de consulta del 50% de las muestras analizadas, procediendo el 64% de ellas de laboratorios hospitalarios. De dichas muestras, los patógenos más frecuentemente aislados son *Salmonella* (34% de los casos), *Campylobacter* (26%) y algunos parásitos (22%) (Comunidad de Madrid, 2003).

A pesar de esto, en España los datos provenientes de estudios independientes dirigidos a determinar las características epidemiológicas de *Campylobacter*, son escasos (Luquero *et al.*, 2007). Por ejemplo, en un estudio realizado en Valladolid entre los años 2000 y 2004 se observó que la tasa de infección por *Campylobacter* en esa región es mayor en niños menores de 5 años y en los hombres, con un número de casos al año de 1797-1890 y 97-102 por cada 100.000 habitantes, respectivamente (Luquero *et al.*, 2007). De manera similar, se estimó la incidencia poblacional de las infecciones intestinales esporádicas diagnosticadas en Castellón durante el año 2000 y se determinó que *Campylobacter* presenta las tasas mayores (115 por cada 100.000 habitantes), seguido de los rotavirus (94,7) y *Salmonella* (83) (Bellido *et al.*, 2003). En Málaga, por otra parte, observó que el 64 % de los

pacientes adultos ingresados en clínicas privadas por gastroenteritis aguda bacteriana corresponde a infecciones por *C. jejuni*, mientras que *Salmonella* únicamente es causante del 36% de los casos (Rodríguez *et al.*, 2001). En Huesca, sin embargo, el número de infecciones declaradas para *Salmonella* es mayor que el de las ocasionadas por *Campylobacter*, este último con índices de infección registrados de 95 y 80 por cada 100.000 habitantes, respectivamente (Pérez-Ciordia *et al.*, 2001).

#### **1.1.4. El pollo como principal reservorio de *Campylobacter* en la cadena alimentaria humana**

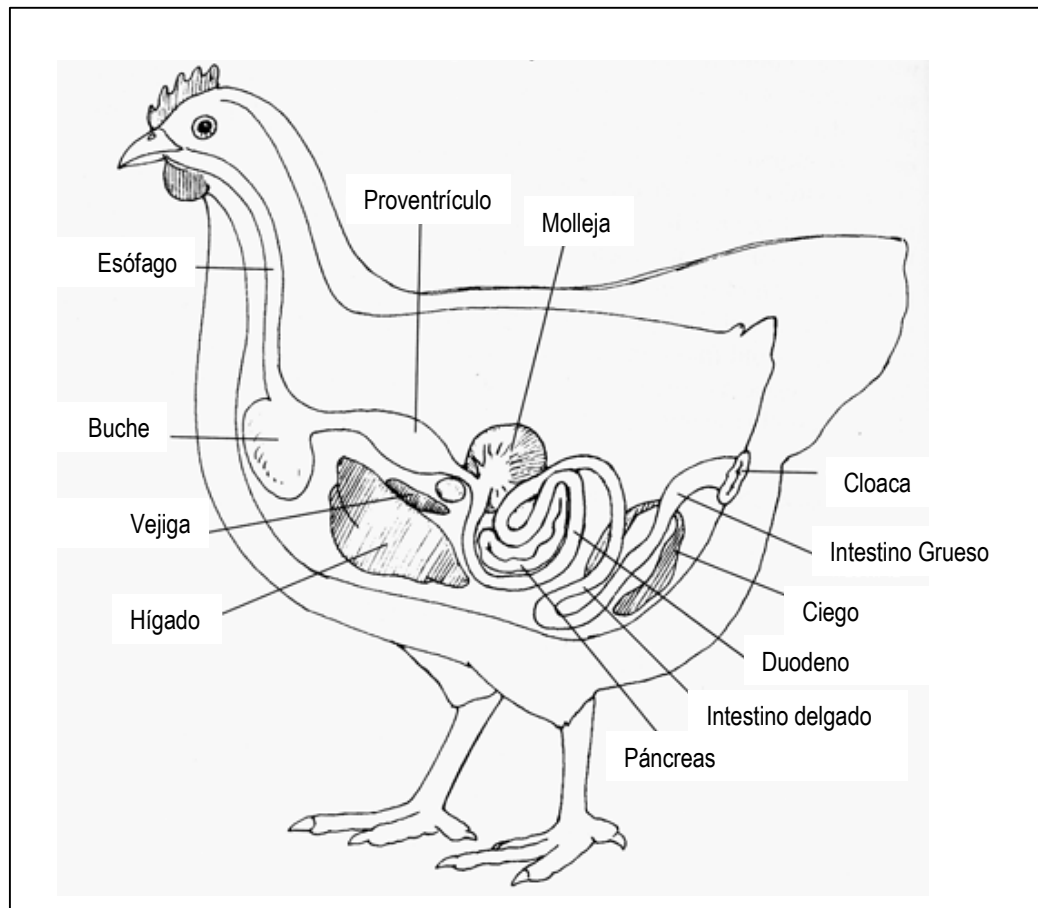
A pesar de constituir un importante patógeno en humanos, por razones aún desconocidas, la mayor parte de las veces *Campylobacter* se comporta como comensal en aves, es decir, no parece ocasionar efectos beneficiosos ni adversos en las aves (Young *et al.*, 2007; Newell y Fearnley, 2003; Sahin *et al.*, 2001; Falk *et al.*, 1998; Cawthraw *et al.*, 1994).

La presencia de este microorganismo se encuentra extendida en la naturaleza y forma parte de la microbiota intestinal de gran cantidad de aves y mamíferos tanto domésticos como salvajes, y su vía de transmisión más común viene dada por la contaminación de la superficie de la carne con material fecal durante la matanza (Newell y Fearnley, 2003; Harris *et al.*, 1986).

La coprofagia es presumiblemente un factor determinante en la diseminación del microorganismo en la granja. La transmisión de pollo a pollo es extremadamente rápida y una vez que un individuo es colonizado, prácticamente el 100% de los pollos presentes en la planta son contaminados en unos pocos días (Miflin *et al.*, 2001; Shreeve *et al.*, 2000). Experimentalmente, la dosis de *C. jejuni* requerida para una colonización efectiva en pollos puede llegar a ser tan baja como 40 ufc/mL (Kothary y Babu, 2001).

Se ha visto que este patógeno coloniza principalmente el intestino de las aves y se piensa que el proceso de infección en éstas depende de dos características fundamentales: la motilidad, que le permite atravesar la barrera de la mucosa intestinal, y la respuesta quimiotáctica, que direcciona al microorganismo a sitios específicos en el tracto gastrointestinal para que ocurra la invasión celular (Hugdahl *et al.*, 1988).

El alimento entra al organismo de las aves a través de la boca y es dirigido por medio del esófago hasta el buche, donde es almacenado y se da inicio al proceso digestivo (Figura 1.2.). Posteriormente, pasa al estómago y de allí al intestino delgado a través del píloro, llegando al duodeno. La parte restante del intestino delgado se encuentra dividida en dos secciones denominadas yeyuno e íleon. El intestino delgado es el lugar donde se lleva a cabo la mayor parte del proceso digestivo y de la absorción de nutrientes en aves (Hoffmann y Volker, 1969; Ede, 1966).



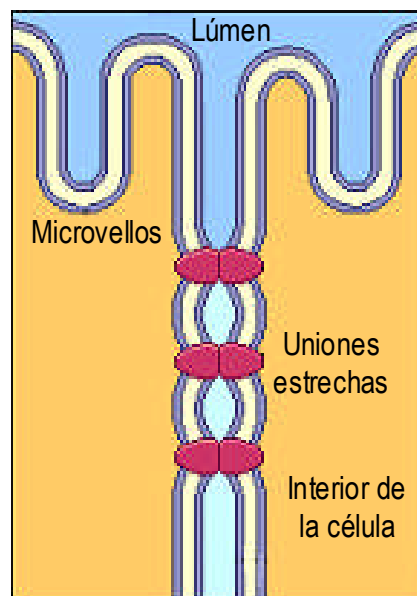
**Figura 1.2.** Esquema del sistema digestivo del pollo (Damerow, 1994).

Al final del intestino delgado se distinguen dos ciegos, lugar donde se degrada la celulosa por acción de la microbiota intestinal. A continuación se distingue el intestino grueso, el cual se encuentra muy reducido en aves, en comparación con los mamíferos. En éste se ubica el colon, lugar donde se realiza la absorción de agua y proteínas de los alimentos que allí llegan. El tracto digestivo de las aves termina en la cloaca, donde el material fecal es acumulado hasta su expulsión al exterior a través del ano (Swenson, 1999).

En términos generales se puede decir que *Campylobacter* entra en el organismo del hospedador en asociación con el agua o la comida, supera la barrera ácida del estómago y coloniza los tejidos epiteliales y conectivos del sistema gastrointestinal (Campbell *et al.*, 1987).

El primer contacto que tiene la bacteria con los tejidos del hospedador ocurre en el mucus, que es una capa que recubre las células epiteliales intestinales, cuya principal función es proteger el epitelio de daños ocasionados por acción química, enzimática, física y bacteriana (Montagne *et al.*, 2004).

A pesar de que la estrategia usada por *Campylobacter* para colonizar el tracto intestinal del pollo todavía no ha sido completamente elucidada (Van Deun *et al.*, 2008), se cree que después de atravesar la capa de mucus, la bacteria se adhiere a la superficie de los apéndices, denominados microvellos, ubicados en los bordes de cepillo de las células (Figura 1.3.), para luego proceder a la invasión celular (Crushell *et al.*, 2004; Ketley, 1999). Cabe destacar que en el pollo, dicha invasión no se ve acompañada por necrosis o apoptosis de las células intestinales ni por inflamación intestinal (Van Deun *et al.*, 2008).



**Figura 1.3.** Esquema de las células epiteliales intestinales del pollo.

Se cree que una vez que el patógeno ha colonizado las células intestinales es capaz de atravesar el epitelio para acceder a los tejidos más internos usando vías tanto transcelulares como paracelulares, permitiendo su diseminación por el organismo del hospedador, a pesar de su

incapacidad para proliferar intracelularmente (Van Deum *et al.*, 2008; Friis *et al.*, 2005; Konkel *et al.*, 2001).

Al igual que ocurre en pollos, en humanos, una vez que el patógeno es ingerido, debe atravesar la capa de mucus que recubre el intestino para poder adherirse a las células epiteliales intestinales e invadirlas, dando inicio al proceso de patogénesis (Konkel *et al.*, 2001).

Los mecanismos específicos de adhesión e invasividad de *Campylobacter* aún no han sido totalmente esclarecidos, aunque la reciente dilucidación de la secuencia completa del genoma de *C. jejuni* ha aumentado las oportunidades de investigación de las bases moleculares de la invasión (Friis *et al.*, 2005; Parkhill *et al.*, 2000). De igual manera, todavía no se conocen las diferencias entre aves y humanos, que ocasionan que esta bacteria resulte patógena para estos últimos pero no para las primeras.

#### **1.1.5. Adherencia de *Campylobacter* a los epitelios intestinales**

Como se ha mencionado, el primer contacto que tiene *Campylobacter* con el hospedador, ave o humano, ocurre en la mucosa intestinal. El patógeno logra adherirse a los componentes que conforman la capa de mucus, pasando a compartir nicho con las numerosas bacterias que conforman la microbiota intestinal. Cuanto mayor es el número de bacterias que logran adherirse y atravesar esta capa, más grande será la probabilidad de que entren en contacto con las células epiteliales y sean capaces de unirse a ellas.

Una vez que el microorganismo traspasa la capa de mucus, se encuentra con las células epiteliales intestinales. Se ha descrito que la adherencia de *Campylobacter* a estas células es un componente esencial para la invasión del patógeno (Friis *et al.*, 2005; Parkhill *et al.*, 2000). La adhesión celular es un proceso reversible, complejo, que se encuentra influenciado por numerosos factores y que consta fundamentalmente de dos etapas. En la primera, se lleva a cabo una adhesión inespecífica y reversible, basada en interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, que es seguida por una segunda etapa, en la que se lleva a cabo una unión irreversible y específica (Konkel *et al.*, 1997; Busscher y Weerkamp, 1987; Beachey *et al.*, 1981).

Es conocido que para que ocurra la adherencia específica de un patógeno a una célula hospedadora se requiere de receptores, por lo general formados por glicoproteínas o glicolípidos, que

se encuentran en la superficie celular del hospedador, y de adhesinas, que son componentes macromoleculares y típicamente proteicos de la superficie celular bacteriana, y que interactúan con la parte glucídica de los receptores del hospedador. Las adhesinas y los receptores suelen interactuar de manera complementaria y específica (Finlay y Falkow, 1989), aunque por lo general cada patógeno es capaz de expresar más de un tipo de adhesina (Ofek *et al.*, 2003).

La especificidad de las adhesinas por un determinado carbohidrato tiene un rol dual: en primer lugar determina el rango de hospedadores que el patógeno es capaz de colonizar y en segundo lugar establece el lugar al cual el patógeno se adhiere (Zopf y Roth, 1996).

Algunas evidencias previas sugieren que la adherencia de *Campylobacter* a la célula hospedadora es un proceso de varios pasos que está mediado por una serie de interacciones adhesina-receptor (Crushell *et al.*, 2004).

Se ha descrito también que la adhesión de *Campylobacter* a las células epiteliales se ve favorecida por diversos componentes, especialmente por las glicoproteínas de pared (Karlyshev *et al.*, 2004), y por algunas proteínas codificadas por genes como *flaA* (Newell *et al.*, 1985), *cadF* (Ziprin *et al.*, 2001), *ciaB* (Rivera-Amill *et al.*, 2001) y *pldA* (Ziprin *et al.*, 2001).

Aunque se cree que cada uno de estos componentes tiene un papel determinado en la adhesión bacteriana y en la organización de los elementos del citoesqueleto, ninguno de ellos parece ser esencial para lograr una adhesión irreversible (Friis *et al.*, 2005).

El modelo de adherencia e invasividad descrito para bacterias enteropatógenas expone que estos microorganismos pueden adherirse de manera reversible o irreversible a la célula hospedadora, pero solamente aquéllas que logran adherirse de manera irreversible podrán invadir posteriormente (Jones *et al.*, 1981).

### **1.1.6. Invasión celular**

Una vez que *Campylobacter* se adhiere de manera irreversible a las células epiteliales intestinales, se da inicio a una cascada de señales trasduccionales en el hospedador que conllevan a una reorganización del citoesqueleto de las células entéricas, la que permite que el patógeno sea

capaz de atravesar la membrana celular y sea internalizado mediante un proceso denominado invasión (Zhu *et al.*, 2006).

Se cree que la invasión de este patógeno a las células hospedadoras se encuentra mediada por la producción de sustancias extracelulares por parte de la bacteria, denominadas invasinas, capaces de afectar los mecanismos de defensa del hospedador (Ketley, 1999) y que se encuentran codificadas por diferentes genes, principalmente el *ciaB* (Rivera-Amill *et al.*, 2001) y el *pldA* (Zhu *et al.*, 2006; Ziprin *et al.*, 2001, Grant *et al.*, 1997).

Se ha visto que las bacterias que han logrado invadir con éxito la célula epitelial pueden encontrarse libres en el citoplasma de la célula hospedadora o en el interior de vesículas recubiertas por membranas (Wooldrige y Ketley, 1997; Russell *et al.*, 1993). Una vez que ha ocurrido la invasión, *Campylobacter* es capaz de sobrevivir por largos períodos de tiempo dentro del epitelio celular hasta que las condiciones ambientales sean óptimas para la inducción de una respuesta citotóxica (Konkel *et al.*, 2001).

La capacidad para invadir tejidos es una variable fenotípica en *Campylobacter* y se ha visto que puede ser útil para la clasificación de la severidad de la enfermedad, ya que las cepas más invasoras suelen ser aquellas más patógenas (Fauchere *et al.*, 1986; Newell y Pearson, 1984).

## **1.2. Control de *Campylobacter* en la alimentación animal**

Durante los últimos 50 años, los aditivos se han utilizado como complemento en la dieta de animales destinados al consumo humano, con el fin de prevenir ciertas enfermedades y aumentar la eficiencia en la producción (White *et al.*, 2002). La gama de aditivos utilizados es muy amplia e incluye sustancias tan diversas como complementos alimenticios, enzimas o agentes promotores del crecimiento (APC).

Los APC reducen la incidencia de enfermedades, aumentan la eficiencia en la utilización de los alimentos y mejoran significativamente la ganancia de peso de los animales, debido principalmente a que ocasionan modificaciones de los procesos digestivos y metabólicos.

A escala comunitaria, las disposiciones administrativas, legislativas y reglamentarias en relación con los aditivos utilizados en la alimentación animal se recogen en la directiva 70/524/CE del



Consejo de la Unión Europea y en sus posteriores modificaciones, en las cuales se ha promulgado la prohibición total del uso de los APC a partir del primero de enero de 2006 (Unión Europea, 2003; Unión Europea, 1970). Dicha prohibición está basada esencialmente en la peligrosidad de estas sustancias debido a su posible efecto residual y a su capacidad de ocasionar resistencias cruzadas con los antibióticos utilizados en medicina humana (National Research Council, 1999).

La prohibición del uso de APC podría tener repercusiones sobre la salud pública, ya que la supresión de estas sustancias con actividad antimicrobiana puede provocar un aumento en la incidencia de determinadas patologías en los animales y su consiguiente transmisión a los consumidores. Sin embargo, estos inconvenientes podrían paliarse si se encuentran alternativas eficaces al uso de los antibióticos, es decir, compuestos que ejerzan un efecto positivo sobre la producción animal, que no signifiquen un riesgo para la salud humana, animal o para el medio ambiente, y que sean económicamente rentables para ser empleados a gran escala.

Lo anterior ha ocasionado en los últimos años un aumento en los estudios dedicados a la búsqueda de alternativas para los APC, la mayor parte enfocados hacia la inclusión en la dieta de los animales de sustancias capaces de interferir en la colonización de los patógenos (Lee *et al.*, 2002; Lee y Puong, 2002; Ishihara *et al.*, 2000; Schoeni y Wong, 1994).

### **1.3. Estrategias encaminadas a disminuir la incidencia de *Campylobacter***

La solución al problema de la contaminación de los pollos por *Campylobacter* debe ser económicamente rentable, realista, y estar amparada por el sistema legislativo, además de ser aceptada por el consumidor (Greathead, 2003). Un logro obviamente deseable es la reducción de los niveles de este patógeno al final del procesado del animal. En este sentido, se ha visto que la aplicación de medidas higiénicas puede disminuir o retrasar la infección por *Campylobacter* en pollos, pero no resulta suficiente como para erradicar al patógeno (Evans, 1992).

Se cree que la irradiación de las canales de pollo o los lavados con agentes químicos de las mismas podría llegar a ser una de las soluciones más efectivas contra este problema, sin embargo, su aplicación por el momento no es aceptada por el consumidor por ser considerada una técnica poco segura (Butzer, 2004; Whyte *et al.*, 2001).

En la actualidad se encuentran bajo desarrollo diversas estrategias encaminadas a la disminución en los niveles de colonización de los pollos por parte de la bacteria como medio para controlar la infección en humanos (ACMSF, 1992).

Probablemente la técnica más efectiva para evitar la colonización de enteropatógenos en pollos destinados al consumo humano sea la cría de los animales en condiciones de esterilidad, sin embargo, en la práctica, el precio de esta práctica resultaría incosteable (Barrow y Page, 2000).

A pesar de ser ampliamente utilizada contra otros patógenos, la vacunación no constituye hoy en día una estrategia factible contra *Campylobacter*, ya que su empleo hasta el momento no ha sido exitoso (Rice *et al.*, 1997; Khoury y Meinersmann, 1995; Noor *et al.*, 1995). Lo anterior es debido principalmente a que los pollos no viven lo suficiente como para lograr una respuesta inmune efectiva (Swayne *et al.*, 2000; Sharma y Burmester, 1982) y a que en muchos casos *Campylobacter* no resulta patogénico para ellos.

Diversos autores han estudiado el uso de bacteriófagos específicos contra *Campylobacter* en la alimentación de pollos (Carrillo *et al.*, 2005; Connerton *et al.*, 2005; Wagenaar y Snijders, 2004; Goode *et al.*, 2003), sin embargo su empleo a nivel industrial presenta grandes limitaciones como son el desarrollo de resistencia bacteriana y el peligro que puede suponer la liberación de estos fagos al ambiente (Goode *et al.*, 2003).

La inclusión en la dieta de los pollos de bacterias definidas capaces de producir efectos nocivos sobre los microorganismos patógenos, pero que a la vez puedan establecer relaciones comensales o simbióticas con el hospedador, constituye una estrategia extensivamente estudiada y que ha arrojado resultados positivos en el caso de otros microorganismos como *Salmonella* y *E. coli*, aunque su efectividad contra *Campylobacter* todavía no ha sido demostrada (Revolledo *et al.*, 2006; Rabsch *et al.*, 2000; Hakkinen y Scheitz, 1996; Qin *et al.*, 1995).

La introducción de este tipo de bacterias, en su mayoría con carácter probiótico, se basa principalmente en la habilidad que tienen ciertos microorganismos de estimular el sistema inmune; de acidificar el entorno, de secretar metabolitos perjudiciales (como bacteriocinas o peróxido de hidrógeno), y de competir con los patógenos por nutrientes o lugares de adherencia en el mucus o las células epiteliales del hospedador (Asp *et al.*, 2004; Lu y Walker, 2001). Este último fenómeno es comúnmente denominado exclusión competitiva (EC). Los términos probiótico y exclusión competitiva serán comentados con detenimiento más adelante en este capítulo.

La inclusión de sustancias antimicrobianas específicas contra *Campylobacter* y otros patógenos en la dieta de los animales constituye otra estrategia interesante en la lucha contra las enfermedades bacterianas y los estudios basados en la búsqueda de nuevas sustancias que cumplan con estos requerimientos son cada vez más frecuentes (Van Deun *et al.*, 2007).

### **1.3.1. Bacterias probióticas y exclusión competitiva**

La composición y metabolismo de la microbiota intestinal afecta profundamente el rendimiento de los animales de granja. Las bacterias autóctonas se establecen en el animal a los pocos días después de su nacimiento o eclosión, e interactúan con los sistemas digestivo e inmune del organismo. Sus efectos pueden llegar a ser tanto beneficiosos como dañinos para el hospedador (Nousiainen *et al.*, 2004).

La colonización de los diferentes compartimientos del intestino por bacterias comensales específicas, ya sea por su asociación a la capa de mucus o a las células epiteliales, sirve como una primera barrera de defensa contra microorganismos invasores o sustancias tóxicas provenientes de la dieta. En animales sanos, cada parte del intestino es colonizado por una microbiota específica, adaptada para crecer en una relación simbiótica con el hospedador. La composición de la microbiota intestinal es específica para cada especie y varía dependiendo de los factores ambientales, la edad del animal, la región intestinal y la dieta (Nousiainen *et al.*, 2004).

Se ha determinado que el intestino de los pollos contiene una gran variedad de microorganismos, muchos de los cuales pertenecen al grupo de las bifidobacterias o al de las bacterias lácticas (comúnmente denominadas LAB), y que incluyen géneros como *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Pediococcus* (Gibson *et al.*, 2005; Cummings *et al.*, 2004). Cerca del 24% de las bacterias presentes en esta zona pertenecen al género *Lactobacillus* y dentro de este grupo, las especies más frecuentemente aisladas son *L. salivarius*, *L. acidophilus*, *L. crispatus* y *L. reuteri* (Ngoc Lan *et al.*, 2002).

Se sabe que las LAB resultan fundamentales para el mantenimiento del ecosistema microbiano intestinal de humanos y animales (Salminen *et al.*, 1998; Sandine, 1979) ya que entre otras cosas, se ha visto que poseen actividad inhibitoria contra algunos enteropatógenos como *Listeria monocytogenes* (Ashenafi, 1991; McKay, 1990; Harris *et al.*, 1989; Schillinger y Lücke, 1989), *E. coli* y *Salmonella* sp. (Hudault *et al.*, 1997; Drago *et al.*, 1997; Chateau *et al.*, 1993), y otros (Coconnier *et al.*, 1997; Olsen *et al.*, 1995; Axelsson *et al.*, 1989).

Algunas LAB, las bifidobacterias y otros microorganismos comensales que pueden resultar beneficiosos para el hospedador, conforman el grupo de los denominados probióticos. Hasta el momento se han planteado numerosas definiciones para este término (Jin *et al.*, 1997), aunque pueden ser descritos globalmente como microorganismos vivos que una vez ingeridos afectan de manera beneficiosa al hospedador, mejorando su equilibrio microbiano (Fuller, 1989).

Tanto en la producción animal como en la alimentación humana, las principales características y funciones que se esperan de un probiótico eficiente incluyen el mantenimiento del equilibrio de la microbiota intestinal por exclusión competitiva y antagonismo frente a patógenos, el incremento de la actividad enzimática digestiva, la neutralización de enterotoxinas, la estimulación del sistema inmune y la optimización de la ingesta de alimentos y del aprovechamiento de nutrientes (Ghadban, 2002). Además de lo anterior debe cumplir los siguientes requisitos básicos: ser capaz de colonizar las células y el mucus del intestino del hospedador, no resultar patogénico, resistir a los ácidos gástricos y biliares y a las enzimas intestinales y ser viables en el tracto gastrointestinal (Nousiainen *et al.*, 2004).

La utilización de probióticos en alimentación se deriva directamente del concepto de exclusión competitiva (EC) (Vandeplas *et al.*, 2008). La EC se diseñó originalmente para paliar los problemas de contaminación de pollos con *Salmonella* (Nurmi y Rantala, 1973), y aunque sus mecanismos aún no han sido bien establecidos, también es empleada con frecuencia para el control de *E. coli*, *Clostridium* y *Listeria* (Schneitz, 2005; Gill, 2003). A pesar de lo anterior, su efectividad sobre *Campylobacter* no ha podido ser demostrada (Young *et al.*, 2007).

La adherencia o asociación cercana de las LAB probióticas con las células epiteliales también puede contribuir a la exclusión competitiva. En primer lugar, las LAB se adhieren a la superficie de las células epiteliales intestinales y pueden colonizar estos tejidos temporalmente y entrar en contacto con el contenido luminal. En segundo lugar, si las LAB ocupan los receptores de adhesión en la superficie celular, las bacterias patógenas no se pueden adherir y por tanto son eliminadas del intestino. Esto es, obviamente, válido únicamente si los patógenos y los probióticos comparten los lugares de unión en el intestino (Nousiainen *et al.*, 2004).

Las preparaciones comerciales de probióticos se encuentran disponibles para uso humano y animal, sin embargo, su empleo en pollos no es una práctica frecuente y su efectividad contra *Campylobacter* suele ser cuestionada, principalmente por la escasez de conocimientos relativos al funcionamiento de la microbiota intestinal de estos animales (Collado *et al.*, 2007; Hofacre, 2000).

Además del empleo de bacterias probióticas con el fin de propiciar la exclusión competitiva sobre *Campylobacter* y otros patógenos, también se ha estudiado el efecto de la inoculación de cepas viables pero no colonizadoras de *C. jejuni* (Ziprin *et al.*, 2002; Barrow y Page, 2000) y otras bacterias entéricas (Schoeni y Wong, 1994) en las dietas de pollos, pero no se han obtenido resultados beneficiosos hasta el momento.

Los probióticos para uso animal son comercializados generalmente como productos liofilizados y usualmente las cepas empleadas pertenecen a la microbiota intestinal autóctona del animal o provienen de fermentos lácticos (Nousiainen *et al.*, 2004). Entre los productos comerciales de exclusión competitiva con eficiencia demostrada contra algunos patógenos, los más empleados a nivel de granjas son Broilact®, AVIGARD® y AVIFREE® (Silva *et al.*, 2005).

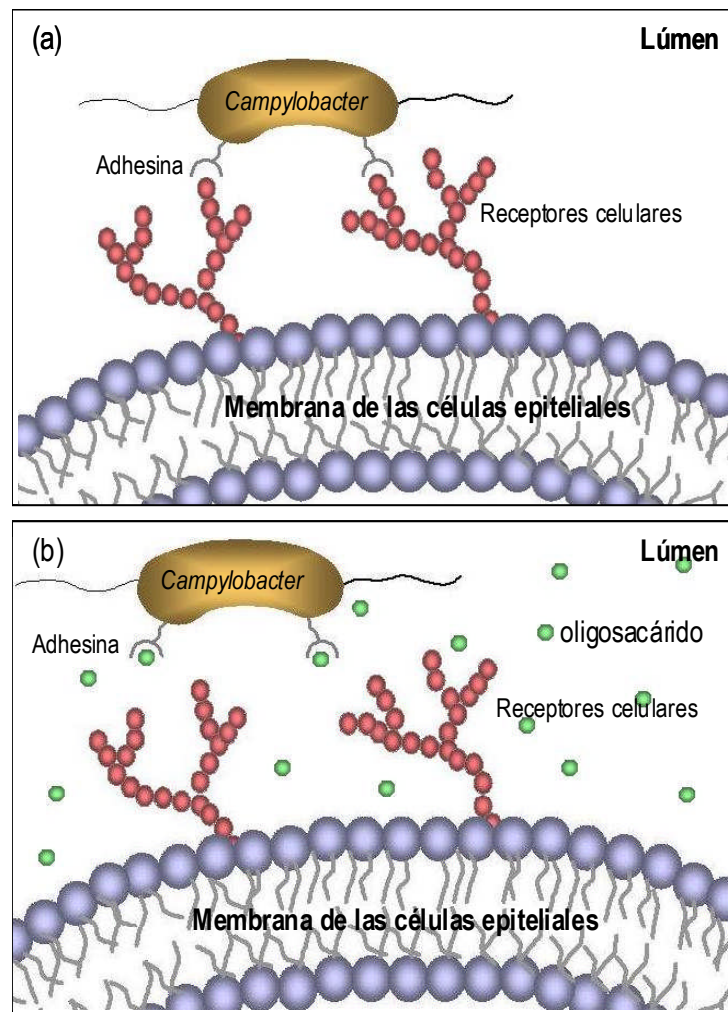
### **1.3.2. Compuestos antiadhesivos y antiinvasivos**

El uso de agentes antiadhesivos y antiinvasivos en la alimentación de pollos y humanos, es otra alternativa interesante a los problemas de contaminación con patógenos bacterianos. Se sabe que muchos patógenos requieren de sitios receptores en las células hospedadoras que contienen porciones de oligosacáridos y péptidos para una adherencia adecuada, y por consiguiente, una invasión exitosa. Basándose en lo anterior, podría ser posible bloquear las adhesinas de ciertos patógenos con fracciones específicas de oligosacáridos (Figura 1.4.) para impedir la adhesión de las bacterias a las mucosas del intestino y evitar de este modo la unión de las enterobacterias a los receptores y por tanto, la colonización bacteriana (Santin *et al.*, 2001; Zopf y Roth, 1996).

La principal ventaja del uso de agentes antiadhesivos y antiinvasivos es que, al no tratarse de sustancias bactericidas, la probabilidad de aparición de cepas resistentes es mucho menor que con la exposición a los antibióticos u otros agentes capaces de afectar la fisiología o el metabolismo bacteriano (Ofek *et al.*, 2003).

El concepto de utilizar carbohidratos para bloquear la adherencia y colonización de células hospedadoras por patógenos se introdujo por primera vez por Aronson *et al.* (1979). Desde ese entonces se ha realizado una investigación exhaustiva *in vitro* e *in vivo* de posibles terapias antiadhesivas y antiinvasoras específicas para diferentes patógenos, basados principalmente en el empleo de modelos animales o en el uso de cultivos celulares (Wittschier *et al.*, 2007; Thomas y Brooks, 2004; Hirno *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 1997).

En la práctica, el uso de carbohidratos puros presenta importantes inconvenientes. El principal es su alto precio, que dificulta su implementación en el ámbito industrial. Algunos autores consideran que dado que la adherencia es un proceso multifactorial, el bloqueo de las lectinas con un solo compuesto es menos efectivo que el empleo de mezclas de diferentes clases de sustancias inespecíficas, que pueden actuar de forma simultánea sobre diferentes dianas (Wittschier *et al.*, 2007). Actualmente se emplean diferentes productos de composición indefinida basados en este principio y que son usados como complementos para alimentación animal (Benites *et al.*, 2008).



**Figura 1.4.** Modelo hipotético del efecto de un oligosacárido específico como inhibidor de la adhesión de algunos enteropatógenos a las células intestinales del hospedador. (a) Enteropatógeno anclado de manera específica a través de las adhesinas a los receptores de la superficie de la membrana celular del hospedador. (b) Efecto de bloqueo que puede llegar a ejercer el oligosacárido específico sobre las adhesinas bacterianas, evitando su adherencia a los receptores de la membrana celular del hospedador.

### 1.3.3. Compuestos antimicrobianos

La resistencia de *Campylobacter* a los antibióticos ha aumentado de manera significativa en los últimos tiempos (Zhang y Plummer, 2008). Sin embargo, se ha visto que algunos compuestos derivados de plantas resultan efectivos contra patógenos asociados a alimentos resistentes a antibióticos, lo que podría atribuirse a las diferencias entre sus mecanismos de acción (Friedman *et al.*, 2006).

El gran potencial que encierran los compuestos antimicrobianos naturales ha llevado a investigar la efectividad de sustancias provenientes de plantas, animales, bacterias y hongos, como son los ácidos orgánicos, las enzimas, los aceites esenciales y las bacteriocinas (Roller, 2003; Lemay *et al.*, 2002).

En estudios *in vitro* se ha demostrado que diferentes sustancias naturales como el aceite esencial de laurel, tomillo (Smith-Palmer *et al.*, 1998), caléndula, jengibre, jazmín, pachulí, gardenia, madera de cedro, semillas de zanahoria, apio, nardo (Friedman *et al.*, 2002) y naranja (Nannapaneni *et al.*, 2009) son efectivos contra *C. jejuni*. Si embargo, su efectividad no ha sido demostrada *in vitro*.

Según nuestro conocimiento, hasta el momento solamente se han realizado dos estudios en los que se hace referencia a la inclusión de compuestos naturales en la dieta de pollos para la disminución de *Campylobacter*. En ellos se observó que el ácido caprílico, conocido antimicrobiano presente en el aceite de coco y la leche, resulta efectivo para disminuir la colonización intestinal del patógeno (Solis de los Santos *et al.*, 2009, Solis de los Santos *et al.*, 2008).

De igual manera, se ha visto que al agregar aceites esenciales de canela en el agua usada en la alimentación de pollos, una de las principales fuentes de contaminación del animal con *Campylobacter*, los recuentos del patógeno en el líquido se reducen de manera significativa, lo que podría contribuir a disminuir el riesgo de contaminación del animal (Pearson *et al.*, 1993).

## 1.4. Ingredientes naturales y sostenibilidad

Como consecuencia de los crecientes problemas de contaminación ambiental a nivel mundial y de sus múltiples consecuencias socio-económicas, en las últimas décadas han aumentado las medidas para optimizar los procesos industriales y para minimizar la cantidad de residuos producidos en estos.

A pesar de existir en países como EE.UU., Australia y Francia (Nerantzis *et al.*, 2003), en la actualidad no existe una legislación a nivel europeo que promueva el reciclaje de residuos industriales (Barth, 2006), aunque se está trabajando en una ley de definición y diferenciación de desechos y sub-productos industriales, de la que se presentó un primer borrador en el año 2005 (unión Europea, 2005). A pesar de lo anterior, se cree que el proceso para completarla necesitará todavía unos cuantos años hasta su puesta en marcha (Sorvari, 2008).

Mientras tanto, el principio que predomina en la Unión Europea obliga al productor a responsabilizarse de los costos de remediación de la contaminación que ocasiona, lo que puede ser considerado como un primer intento para promover el reciclaje de residuos industriales (Sorvari, 2008). Sin embargo, es lógico pensar que próximamente las legislaciones se harán más estrictas y se incrementará el costo del manejo de desechos (Nerantzis *et al.*, 2003).

De manera independiente, en algunos países europeos como Finlandia se está estudiando la aplicación de una ley que contemple el uso de sub-productos industriales y del manejo y disposición de residuos, cuya finalización e implementación se estima que tardará también unos cuantos años (Sorvari, 2008).

La recuperación de productos de valor añadido a partir de productos de desecho puede ser una solución al problema de contaminación ambiental por residuos industriales. De igual manera, dichos productos, en especial los provenientes de las industrias de alimentos, pueden constituir una importante fuente de compuestos de valor añadido aprovechables a escala industrial por sus propiedades tecnológicas y nutricionales.

En nuestros días, el consumidor es cada vez más exigente con la calidad e inocuidad de los productos que adquiere, lo que le lleva buscar productos con ingredientes naturales, por considerarlos más seguros (Schieber *et al.*, 2001). Debido a lo anterior el empleo de sub-productos industriales como ingredientes funcionales es una estrategia interesante que permite apoyar la sostenibilidad de las actividades industriales, a la vez de promover el uso de productos naturales de alto valor añadido y bajo costo.



En España, dos de los productos agrícolas mayoritarios son la uva (INE, 2009a) y la naranja (Intercitrus, 2009), con una producción media de 7 millones de toneladas para cada producto. Por otra parte, dentro de la industria pesquera, los crustáceos constituyen un producto de importancia fundamental, con una producción de 130 toneladas anuales en España (INE, 2009b). De manera similar, entre los productos alimenticios manufacturados en el país, el vino constituye uno de los principales (31-50 millones de hectolitros anuales) (FAOSTAT, 2006). Debido a lo anterior, el empleo de sub-productos de estas industrias, además de económicamente rentable, resultaría sostenible.

## **1.5. Principales modelos para el estudio *in vitro* de la adherencia e invasividad bacteriana**

### **1.5.1. Estudios de adherencia al mucus intestinal**

El mucus es una capa gelatinosa que recubre las células epiteliales estomacales e intestinales y que constituye el principal sitio anatómico donde la microbiota intestinal se encuentra adherida. Además, es el lugar donde las bacterias ingeridas tienen el primer contacto con los tejidos del hospedador (Vesterlund, 2006). Esta capa es segregada por células epiteliales específicas denominadas células goblet (Fostner *et al.*, 1995).

El mucus está compuesto en más de un 95% por agua. Sus principales componentes orgánicos son las mucinas, que a su vez constituyen aproximadamente un 5% de su composición en peso seco (Juntunen *et al.*, 2001). Las mucinas están compuestas fundamentalmente por glicoproteínas de gran tamaño, cuya fracción glucídica está conformada principalmente por N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, galactosa y fucosa (Mantle, 1996; Carlstedt-Duke, 1989; Neutra y Forstner, 1987; Allen, 1984), aunque también contienen otros componentes como lípidos, proteínas libres y sales (Lopez-Ferrer *et al.*, 2000). El contenido proteico de las mucinas es del 20% en peso seco, mientras que el de carbohidratos es de 70-80% (Tuomola *et al.*, 1999).

Las bacterias comensales se adhieren a los carbohidratos complejos presentes en la mucina, lo que se ha visto que puede prevenir la colonización intestinal por parte de bacterias patógenas (Vesterlund *et al.*, 2006; Tuomola y Salminen, 1998). Se cree que los mecanismos implicados en la adhesión bacteriana al mucus intestinal no son los mismos que los que definen la adhesión a las células epiteliales, por lo que resulta interesante estudiar ambos fenómenos por separado (Henriksson y Conway, 1996).

En diversas ocasiones se han empleado glicoproteínas inmovilizadas del mucus intestinal de diferentes animales como sustrato para estudiar la adherencia bacteriana, especialmente de bacterias probióticas, y los fenómenos de exclusión competitiva (Vesterlund *et al.*, 2006; Ouwehand *et al.*, 2002; Tuomola *et al.*, 1999; Craven 1997; Henriksson y Conway, 1996; Blomberg *et al.*, 1993).

### **1.5.2. Estudios de adherencia e invasividad a células epiteliales**

A pesar de que los modelos animales han resultado ser efectivos para ensayos con otros patógenos gastrointestinales como *Salmonella* o *E. coli* (Savkovic *et al.*, 2005), el estudio de los mecanismos de la patogénesis de *Campylobacter* resulta complicado, debido a la carencia de modelos animales de fácil empleo y que simulen la enfermedad en humanos (Zheng *et al.*, 2006; Fox *et al.*, 2004). En contraste con esto, los métodos de cultivos celulares *in vitro* constituyen una alternativa útil que permite investigar las interacciones entre *Campylobacter* y el epitelio del hospedador que ocurre durante la infección, ya que posibilitan un control preciso del ambiente, aseguran la homogeneidad de las muestras, ofrecen una mayor economía y evitan las controversias éticas que pueden conllevar los ensayos con animales.

Se denomina cultivo celular al conjunto de técnicas que facilitan el mantenimiento y propagación de células *in vitro*, tanto en suspensión como formando monocapas, y que permiten conservar al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas (Wiley-Liss, 1994). La adherencia de un microorganismo patógeno a los tejidos del hospedador puede ser estudiada por diferentes métodos, que incluyen la detección con anticuerpos, la citometría de flujo y la microscopía (Bogovic Matijasíc *et al.*, 2004). Sin embargo, el método más común consiste en incubar un inóculo bacteriano con una línea celular adecuada y determinar por recuento directo el número de bacterias adheridas.

El ensayo de la resistencia a la gentamicina es frecuentemente utilizado para medir la invasividad bacteriana y toma en cuenta el hecho de que el antibiótico gentamicina tiene una habilidad limitada de penetrar en las células eucariotas. Al igual que los estudios de adherencia, este ensayo incluye la incubación de cultivos celulares con una suspensión de bacterias, seguido del lavado para excluir las células no adheridas. Posteriormente se realiza un tratamiento con gentamicina, con el fin de eliminar las bacterias adheridas, en el que las bacterias que han invadido las células pueden ser contadas, después de lisar las células eucariotas con un detergente (Friss *et al.*, 2005).

La capacidad de una determinada cepa bacteriana de adherirse e invadir cultivos celulares por lo general es expresada como el número de bacterias adheridas o invasoras (Karlyshev *et al.*, 2004; De Melo *et al.*, 1989). Sin embargo, este modo de expresión no toma en cuenta que el potencial de adhesión e invasividad depende, no sólo de la concentración del inóculo bacteriano, sino también del número de células eucariotas presentes en el cultivo. Debido a lo anterior resulta fundamental determinar el valor de la multiplicidad de infección (MOI), que es el cociente entre el número de bacterias inoculadas y el número de células presentes en el cultivo (Hu *et al.*, 2008).

Se han empleado diferentes líneas celulares para estudiar la invasividad de *Campylobacter* con el fin elucidar sus mecanismos de patogenicidad y para la búsqueda de sustancias que inhiban dicho proceso. Las líneas celulares utilizadas en muchos de los primeros estudios de invasión realizados con *Campylobacter* se derivaban de carcinoma de laringe humana (HEp-2) (Konkel *et al.*, 1990; Konkel *et al.*, 1989) o de células de intestino de embriones humanos (INT-407) (Biswas *et al.*, 2004). Sin embargo, los resultados realizados con estas líneas celulares en ocasiones resultaban contradictorios, ya que estas células no se asemejan a aquéllas que conforman los epitelios intestinales.

Actualmente, una de las líneas celulares más utilizadas para los estudios de invasividad *in vitro* de *Campylobacter* es Caco-2 (Mihaljevic *et al.*, 2007; MacCallum *et al.*, 2005, Friss *et al.*, 2005). Esta línea celular se derivó originalmente de adenocarcinoma de colon humano y en la actualidad se emplea comúnmente en estudios de interacciones celulares de tipo patógeno-hospedador. El amplio uso de dicha línea celular para este tipo de estudios se debe principalmente a su capacidad de formar monocapas celulares bien diferenciadas y a su similitud con los enterocitos colónicos (Szymanski *et al.*, 1995). Además, los resultados obtenidos de los ensayos de gentamicina por recuento en placas son similares a los de los recuentos directos de las bacterias invasoras realizados al microscopio (Hu y Kopecko, 1999).

Además de lo anterior, en un estudio realizado por Hänel *et al.* (2004) se demostró que existe un alto grado de correlación entre el nivel de invasividad de *Campylobacter* a cultivos de Caco-2 y su tasa de colonización en intestinos de pollo *in vivo*. En el año 2008, el mismo grupo reafirmó esta conclusión al determinar, entre otras cosas, que las cepas del patógeno con mayor índice de invasividad son más eficientes en la colonización del intestino de pollos que las poco invasoras (Hänel, 2009). Este hecho confirma la utilidad de este modelo experimental para llevar a cabo estudios de adherencia e invasividad de *Campylobacter*.

Los cultivos de varias líneas celulares, incluyendo Caco-2, se han empleado para determinar el efecto de algunos agentes considerados como anti-adhesivos o anti-invasivos sobre *Campylobacter* y otros enteropatógenos (Gnoth *et al.*, 2000; Konkel *et al.*, 1992; Cinco *et al.*, 1984). Estos estudios se pueden llevar a cabo de la manera descrita para los estudios de adherencia e invasividad *in vitro*, siendo en este caso el microorganismo incubado con el agente a estudiar antes de realizar el ensayo.

## 1.6. PLAN DE TRABAJO

En la cadena alimentaria, el intestino del pollo y de otros hospedadores es el único punto de proliferación de *Campylobacter*, de ahí el impacto que tiene su control en el ámbito primario de producción para evitar la diseminación del patógeno. Dado que *Campylobacter* constituye el primer patógeno bacteriano asociado a alimentos a escala mundial y debido principalmente a la reciente prohibición en la Unión Europea del uso de los antibióticos promotores del crecimiento en alimentación animal, resulta de gran importancia la búsqueda de nuevas estrategias eficaces que permitan disminuir la incidencia de esta bacteria a nivel del hospedador.

El presente trabajo pretende ahondar, mediante el empleo de técnicas *in vitro*, en el estudio de diferentes estrategias naturales como son el uso de agentes antimicrobianos, antiadhesivos y antiinvasivos, así como de bacterias probióticas, todas ellas encaminadas a la disminución de *Campylobacter* en su principal vector, el pollo, con miras al control de este patógeno dentro de la cadena alimentaria humana. Se debe recalcar que todas las técnicas estudiadas aquí podrían ser potencialmente utilizables en alimentación humana con fines similares.

Para ello, en primer lugar se llevará a cabo la optimización de distintas variables experimentales que afectan la adherencia e invasividad de diferentes cepas de *Campylobacter* en cultivos de células epiteliales Caco-2, así como el estudio de la entrada en fase estacionaria en el comportamiento observado. Además se evaluará la influencia de varios factores de virulencia de la bacteria sobre estos parámetros (**Capítulo 2**).

Una vez optimizado el método, se estudiará el efecto de diferentes agentes de origen natural sobre la adherencia e invasividad del patógeno. Para ello, en primer lugar se determinará el efecto de un extracto de oligosacáridos pécticos extraídos a partir de cáscara de naranjas, sobre la adherencia e invasividad de *C. jejuni* a células Caco-2 (**Capítulo 3**). De manera similar, se determinará el efecto de diferentes fracciones de manoproteínas derivadas de la pared celular de levaduras vínicas, sobre ambos parámetros (**Capítulo 4**).

Además del empleo de compuestos potencialmente antiadhesivos y antiinvasivos, se estudiará el poder antimicrobiano frente a *Campylobacter* de algunos agentes naturales de origen vegetal y animal. En este sentido, se analizarán extractos de quitosanos y sus oligómeros obtenidos a partir de caparazones de crustáceos (**Capítulo 5**) y se determinará el efecto de compuestos fenólicos presentes

en la uva sobre la viabilidad del patógeno (**Capítulo 6**), haciéndose hincapié en sus mecanismos de acción.

Por último, se comparará la capacidad de adherencia de *Campylobacter* a mucus intestinal de diferentes organismos hospedadores y se estudiará el efecto de algunas bacterias probióticas de uso humano sobre dicha capacidad (**Capítulo 7**).

## 1.7. BIBLIOGRAFÍA

ACMSF. 1992. Interim report on *Campylobacter*. Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food, Her Majesty's Stationery Office. Londres.

Allen, A. 1984. The structure and function of gastrointestinal mucus. En: Attachment of organisms to the gut mucosa. Boedeker, E.C. (Ed). CRC Press. Boca Raton, p. 3-11.

Allos, B.M., Blaser, M.J. 1995. *Campylobacter jejuni* and the expanding spectrum of related infections. Clinical Infectious Diseases 20: 1092-1099.

Allos, B.M. 2001. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. Clinical Infectious Diseases 32: 1201-1206.

Altekruse, S.F., Stern, N.J., Fields, P.I., Swerdlow, D.L. 1999. *Campylobacter jejuni* an emerging foodborne pathogen. Emergent Infectious Diseases 5: 28-35.

Aronson, M., Medalia, O., Schori, L., Mirelman, D., Sharon, N., Ofek, I. 1979. Prevention of colonisation of the urinary tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with methyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside. The Journal of Infectious Diseases 139: 329-332.

Ashenafi, M. 1991. Growth of *Listeria monocytogenes* in fermenting tempeh made of various beans and its inhibition by *Lactobacillus plantarum*. Food Microbiology 8: 303-310.

Asp, N.G., Möllby, R., Norin, L., Wadström, T. 2004. Probiotics in gastric and intestinal disorders as functional food and medicine. Scandinavian Journal of Nutrition 48: 15-25.

Axelsson, L.T., Chung, T.C., Dobrogosz, W.G., Lindgren, S.E. 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. Microbiology and Ecology Health Disease 2: 131-136.

Barrow, P.A., Page, K. 2000. Inhibition of colonization of the alimentary tract in young chickens with *Campylobacter jejuni* by pre-colonization with strains of *C. jejuni*. FEMS Microbiology Letters 182: 87-91.

Barth, J. 2006. Status of organic waste recycling in the European Union. First Baltic Biowaste Conference. Estonia.

Beachey, E.H., Giampapa, C.S., Abraham, S.N. 1981. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. Journal of Infectious Diseases 143: 325-345.

Bellido, J.B., Galiano, J.V., Tirado, M.D., González-Camo, J.M., Safont, L. 2003. Incidencia de casos esporádicos de las infecciones intestinales más frecuentes en Castellón. Revista Española de Salud Pública 77: 629-638.

Benites, V., Gilharry, R., Gernat, A.G., Murillo, J.G. 2008. Effect of dietary mannan oligosaccharide from Bio-Mos or SAF-Mannan on live performance of broiler chickens. The Journal of Applied Poultry Research 17: 471-475.

Biswas, D., Niwa, H., Itoh, K. 2004. Infection with *Campylobacter jejuni* induces tyrosine-phosphorylated proteins into INT-407 cells. Microbiology and Immunology 48: 221-228.

Blaser, M.J.H., H.L., Powers, B., Wang, W.L. 1980. Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in biological milieus. Journal of Clinical Microbiology 11: 309-313.

Blaser, M.J., Sazie, E., Williams, L.P.J. 1987. The influence of immunity on raw milk-associated *Campylobacter* infection. The Journal of the American Medical Association 257: 43-46.

- Blomberg, L., Henriksson, A., Conway, P.L. 1993. Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* K88 to piglet ileal mucus by *Lactobacillus* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 34-39.
- Bogovic Matijasíc, B., Stojkovic, S., Salobir, J., Malovrh, S., Rogelj, I. 2004. Evaluation of the *Lactobacillus gasseri* K7 and LF221 strains in weaned piglets for their possible probiotic use and their detection in the faeces. *Animal Research* 53: 35-44.
- Comunidad de Madrid. 2003. Boletín epidemiológico del sistema de vigilancia microbiológica de la Comunidad de Madrid, 9(8). Madrid.
- Busscher, H. J., Weerkamp, A.H. 1987. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiology Reviews* 46: 165-173.
- Butzer, J.P. 2004. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clinical Microbiology and Infection* 10: 868-876.
- Campbell, S., Duckworth, S., Thomas, C.J., McMeekin, T.A. 1987. A note on adhesion of bacteria to chicken muscle connective tissue. *Journal of Applied Microbiology* 63: 67-71.
- Carlstedt-Duke, B. 1989. The normal microflora and mucin. En: *The regulatory and protective role of the normal microflora*. Grubb, R., Midtvedt, T., Norin, E. (Ed). M. Stockton Press. Nueva York, p. 109-127.
- Carrillo C.L., El-Shibiny, A., Connerton, P. L., Dillon, E., Scott, A., Connerton, I. F. 2005. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonisation of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 6554-6563.
- Cawthraw, S., Ayling, R., Nuijten, P., Wassenaar, T., Newell, D.G. 1994. Isotype, specificity, and kinetics of systemic and mucosal antibodies to *Campylobacter jejuni* antigens, including flagellin, during experimental oral infections of chicken. *Avian Diseases* 38: 341-349.
- CDC. 2007. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food (10 states). *MMWR* 56:336-339.
- Centre for Disease Control and Prevention. 2003. Preliminary data on the incidence of foodborne illnesses on selected sites of the United States, 2002. *Food Net Online Weekly Report* 52: 340-343.
- Centro Nacional de Epidemiología. 2008. Sistema de información microbiológico [en línea]. Referencia de 2 de diciembre de 2008. Disponible en: <http://cne.isciii.es/htdocs/ve/ve.htm>.
- Chateau, N., Castellanos, I., Deschamps, A.M. 1993. Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolates of a commercial probiotic consortium. *Journal of Applied Bacteriology* 74: 36-40.
- Cinco, M., Banfi, E., Ruaro, E., Crevatin, D., Crotti, D. 1984. Evidence for L-fucose-(6-deoxy-L-galactopyranose) mediated adherence of *Campylobacter* ssp. to epithelial cells. *FEMS Microbiology Letters* 21: 347-351.
- Coconnier, M.H., Liévin, V., Bernet-Camard, M.F., Hudault, S., Servin, A.L. 1997. Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 41: 1046-1052.
- Collado, M.C., Grześkowiak, Ł., Salminen, S. 2007. Probiotic strains and their combination inhibit *in vitro* adhesion of pathogens to pig intestinal mucus. *Current Microbiology* 55: 260-265.
- Connerton, I.F., Connerton, P.L., Atterbury, R.J., Swift, C.I., Frost, J.A., Dodd, C.E.R., Rees, C.E.D. 2005. Correlation of *Campylobacter* bacteriophage with reduced presence of host in broiler chicken caeca. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4885-4887.



- Craven, S.E., Williams, D. 1997. Inhibition of *Salmonella thyphimurium* attachment to chicken cecal mucus by intestinal isolates of *Enterobacteriaceae* and *Lactobacilli*. *Avian Diseases* 41: 548-558.
- Crushell, E., Harty, S., Sharif, F., Bourke, B. 2004. Enteric *Campylobacter*: Purging its secrets?. *Pediatric Research* 55: 3-12.
- Cummings, J.H., Antoine, J.M., Azpiroz, F., Bourdet-Sicard, R., Brandtzaeg, P., Calder, P.C., Gibson, G.R., Guarner, F., Isolauri, E., Pannemans, D., Shortt, C., Tuijelaars, S., Watzl, B. 2004. PASSCLAIM - gut health and immunity. *European Journal of Nutrition* 43: 118-173.
- Damerow, G. 1994. Anatomy of a chicken. En: *Chicken health handbook*. Damerow, G. (Ed). Storey Books. North Adams, p. 43-57.
- De Melo, M.A., Gabbiani, G., Pechere, J.C. 1989. Cellular events and intracellular survival of *Campylobacter jejuni* during infection of Hep-2 cells. *Infection and Immunology* 57: 2214-2222.
- Doyle, M.P., Roman, D.J. 1982. Response of *Campylobacter jejuni* to sodium chloride. *Applied and Environmental Microbiology* 43: 561-565.
- Drago, L., Gismondo, M.R., Lombardi, A., de Haën, C., Gozzini, L. 1997. Inhibition of *in vitro* growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. *FEMS Letters* 153: 455-463.
- Ede, D.A. 1966. Las vísceras. En: *Anatomía de las aves*. Ede, D.A. (Ed). Editorial Acribia. Zaragoza, p. 54-65.
- EFSA. 2007. Report of the task force of zoonoses data collection including a proposal for a harmonized monitoring scheme of antimicrobial resistance in *Salmonella* in fowl (*Gallus gallus*), turkeys, and pigs and *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in broilers. *The EFSA Journal* 96:1-46.
- Evans, S.J. 1992. Introduction and spread of thermophilic campylobacters in broiler flocks. *The Veterinary Record* 131: 574-576.
- Falk, P.G., Hooper, L.V., Midtvedt, T., Gordon, J.I. 1998. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 1157-1170.
- FAOSTAT. 2006. Food and Agricultural Organization Database [en línea]. Referencia de 12 de diciembre de 2008. Disponible en: <http://www.fao.org>.
- Fauchere, J.L., Rosenau, A., Veron, M., Moyen, E.N., Richard, S., Pfister, A. 1986. Association with HeLa cells of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from human feces. *Infection and Immunology* 54: 283-287.
- Fernandez, H., Vergara, M., Tapia, F. 1985. Desiccation resistance in thermotolerant *Campylobacter* species. *Infection* 13: 197-198.
- Finlay, B.B., Falkow, S. 1989. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiology Reviews* 53: 210-230.
- Fostner, J.F., Oliver, M.G., Sylvester, F.A. 1995. Production, structure, and biological relevance of gastrointestinal mucins. En: *Infections of the gastrointestinal tract*. Blaser, M.J., Smith, P.D., Radvin, J.I., Greenberg, H.B., Guerrant, R.L. (Ed). Lippincott Williams & Wilkins. Nueva York, p. 523-562.
- Fox, J.G., Rogers, A.B., Whary, M.T., Ge, Z., Taylor, N.S., Xu, S., Horwitz, B.H., Erdman, S.E. 2004. Gastroenteritis in NF-kappaB-deficient mice is produced with wild-type *Campylobacter jejuni* but not with *C. jejuni*

lacking cytolethal distending toxin despite persistent colonization with both strains. *Infection and Immunity* 72: 1116-1125.

Friedman, C.R., Neimann, J., Wegener, H.C., Tauxe, R.V. 2000. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. En: *Campylobacter*. Nachamkin, I., Blaser, M.J. (Ed). ASM Press. Washington D.C., p. 121-138.

Friedman, M., Henika, P.R., Mandrell, R.E. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection* 65: 1545-1560.

Friedman, M., Buick, R., Elliott, C.T. 2006. Antimicrobial activities of plant compounds against antibiotic-resistant *Micrococcus luteus*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 28: 156-158.

Friis, L.M., Pin, C., Pearson, B.M., Wells, J.M. 2005. *In vitro* cell culture methods for investigating *Campylobacter* invasion mechanisms. *Journal of Microbiological Methods* 61: 145-160.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66: 365-378.

Ghadban, G.S. 2002. Probiotics in broiler production-a review. *Archiv Fur Geflugelkunde* 66: 49-58.

Gibson, G.R., McCartney, A.L., Rastall R.A. 2005. Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections. *British Journal of Nutrition* 93: S31-S34.

Gill, H.S. 2003. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Practices for Research in Clinical Gastroenterology* 17: 755-773.

Gnoth, M.J., Kunz, C., Kinne-Saffran, E., Rudloff, S. 2000. Human milk oligosaccharides are minimally digested *in vitro*. *Journal of Nutrition* 130: 3014-3020.

Goode, D., Allen, V.M., Barrow, P.A. 2003. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophage. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 5032-5036.

Grant, K.A., Ubarretxena Belandia, I., Dekker, N., Richardson, P.T., Park, S.F. 1997. Molecular characterization of *pldA*, the structural gene for a phospholipase A from *Campylobacter coli*, and its contribution to cell-associated hemolysis. *Infection and immunity* 65: 1172-1180.

Greathead, H. 2003. Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proceedings of the Nutrition Society* 62: 279-290.

Hakanen, A.J., Lehtopolku, M., Siitonen, A., Huovinen, P., Kotilainen, P. 2003. Multidrug resistance in *Campylobacter jejuni* strains collected from Finnish patients during 1995-2000. *Journal of antimicrobials and Chemotherapy* 52: 1035-1039.

Hakkinen, M., Schneitz, C. 1996. Efficacy of a commercial competitive exclusion product against a chicken pathogenic *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7. *The Veterinary Record* 139: 139-141.

Hänel, I., Müller, J., Müller, W., Schulze, F. 2004. Correlation between invasion of Caco-2 eukaryotic cells and colonization ability in the chick gut in *Campylobacter jejuni*. *Veterinary Microbiology* 101: 75-82.

Hänel, I., Borrmann, E., Müller, J., Pauly, B., Liebler-Tenorio, E.M., Schulze, F. 2009. Genomic and phenotypic changes of *Campylobacter jejuni* strains alter passage of the chicken gut. *Veterinary Microbiology* 136: 121-129.

- Hanninen, M.L., Perko-Makela, P., Pitkala, A., Rautelin, H. 2000. A three-year study of *Campylobacter jejuni* genotypes in humans with domestically acquired infections and in chicken samples from the Helsinki area. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 1998-2000.
- Hannu, T., Kauppi, M., Tuomala, M., Laaksonen, I., Klemets, P., Kuusi, M. 2004. Reactive arthritis following an outbreak of *Campylobacter jejuni* infection. *Journal of Rheumatology* 31: 528-530.
- Harris, N.V., Weiss, N.S., Nolan, C.M. 1986. The role of poultry and meats in the etiology of *Campylobacter jejuni/coli* enteritis. *American Journal of Public Health* 76: 407-411.
- Harris, L.J., Daechsel, M.A., Stiles, M.E., Klaenhammer, T.R. 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 52: 384-387.
- Henriksson, A., Conway, P.L. 1996. Adhesion of *Lactobacillus fermentum* 104-S to porcine stomach mucus. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 33: 31-34.
- Hirmo, S., Kelm, S., Iwersen, M., Hotta, K., Goso, Y., Ishihara, K., Suguri, T., Morita, M., Wadstrom, T., Schauer, R. 1998. Inhibition of *Helicobacter pylori* sialic acid-specific haemagglutination by human gastrointestinal mucins and milk glycoproteins. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 20: 275-281.
- Hofacre, C.L. 2000. Comparison of a lyophilized chicken-origin competitive exclusion culture, a lyophilized probiotic, and fresh turkey cecal material against *Salmonella* colonization. *Journal of Applied Poultry Research* 9: 195-203.
- Hoffmann, G., Volker, A. 1969. Anatomía y fisiología de las aves domésticas. Editorial Acribia, Zaragoza.
- HPA. 2009. *Campylobacter* species: Laboratory reports of faecal isolates reported to the Health Protection Agency Centre for Infections, by sex, England and Wales, 1989-2008. Londres.
- Hu, L., Kopecko, D.J. 1999. *Campylobacter jejuni* 81-176 associates with microtubules and dynein during invasion of human intestinal cells. *Infection and Immunology* 67: 4171-4182.
- Hu, L., Tall, B.D., Curtis, S.K., Kopecko, D.J. 2008. Enhanced microscopic definition of *Campylobacter jejuni* 81-176 adherence to, invasion of, translocation across, and exocytosis from polarized human intestinal Caco-2 cells. *Infection and Immunity* 76: 5294-5304.
- Hudault, S., Lievin, V., Bernet-Camard, M.F., Servin, A.L. 1997. Antagonistic activity exerted *in vitro* and *in vivo* by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 513-518.
- Hugdahl, M.B., Beery, J.T., Doyle, M.P. 1988. Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunology* 56: 1560-1566.
- Humphrey, T.J., Cruickshank, J.G. 1985. Antibiotic and deoxycholate resistance in *Campylobacter jejuni* following freezing or heating. *Journal of Applied Microbiology* 59: 65-71.
- Humphrey, T.J., Hart, R.J. 1988. *Campylobacter* and *Salmonella* contamination of unpasteurized cow's milk on sale to the public. *Journal of Applied Bacteriology* 65: 463-467.
- INE. 2009a. Producción de uva por tipo y periodo [en línea]. Referencia de 2 de marzo de 2009. Disponible en: <http://www.ine.es/infoine>.

INE. 2009b. Producción acuícola marina por especies y periodo [en línea]. Referencia de 2 de marzo de 2009. Disponible en: <http://www.ine.es/infoine>.

Intercitrus. 2009. Consumo de cítricos en la Unión Europea [en línea]. Referencia de 3 de marzo de 2009. Disponible en: <http://www.intercitrus.org>.

Ishihara, N., Chu, D., Akachi, S., Juneja, L.R. 2000. Preventive effect of partially hydrolysed guar gum on infection of *Salmonella enteritidis* in young and laying hens. *Poultry Science* 79: 689-697.

Jacobs-Reitsma, W. 2000. *Campylobacter* in the food supply. En: *Campylobacter*. Nachamkin, M., Blaser, J. (Ed). ASM Press. Washington D.C. p. 467-481.

Jin L.Z., H.Y.W., Abdullah N., Jalaludin S. 1997. Probiotics in poultry: modes of action. *World's Poultry Science Journal* 53: 351-368.

Jones, G.W., Richardson, L.A., Uhlman, D. 1981. The invasion of HeLa cells by *Salmonella typhimurium*: reversible and irreversible bacterial attachment and the role of bacterial motility. *Journal of Genetic Microbiology* 127: 351-360.

Juntunen, M., Kirjavainen, P.V., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J., Isolauri, E. 2001. Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8: 293-296.

Kapperud, G., Skjerve, E., Bean, N.H., Ostroff, S.M., Lassen, J. 1992. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infections: results of a case-control study in Southeastern Norway. *Journal of Clinical Microbiology*. 30: 3117-3121.

Karlyshev, A.V., Everest, P., Linton, D., Cawthraw, S., Newell, D.G., Wren, B.W. 2004. The *Campylobacter jejuni* general glycosylation system is important for attachment to human epithelial cells and in the colonization of chicks. *Microbiology* 150: 1957-1964.

Ketley, J.M. 1999. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology* 143: 5-21.

Khoury, C.A., Meinersmann, R.J. 1995. A genetic hybrid of the *Campylobacter jejuni* flaA gene with LT-B of *Escherichia coli* and assessment of the efficacy of the hybrid protein as an oral chicken vaccine. *Avian Diseases* 39: 812-820.

Konkel, M.E., Joens, L.A. 1989. Adhesin to and invasion of Hep-2 cells by *Campylobacter* spp. *Infection and Immunology* 57: 2984-2990.

Konkel, M.E., Joens, L.A. 1990. Effect of enteroviruses on adherence to and invasion of Hep-2 cells by *Campylobacter* isolates. *Infection and Immunology* 58: 1101-1105.

Konkel, M.E., Mead, D.J., Hayes, S.F., Cieplak, J.W. 1992. Translocation of *Campylobacter jejuni* across human polarized epithelial cell monolayer cultures. *Journal of Infectious Diseases* 166: 308-315.

Konkel, M.E., Garvis, S.G., Tipton, S.L., Anderson, D.E. Jr., Cieplak, W. Jr. 1997. Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Molecular Microbiology* 24: 953-963.

Konkel, M.E., Monteville, M.R., Rivera-Amill, V., Joens, L.A. 2001. The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*-mediated enteritis. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 2: 55-71.

Kothary, M., Babu, U. 2001. Infective dose of foodborne pathogens in volunteers: A review. *Journal of Food Safety* 21: 49-73.

Lastovica, A.J., Skirrow, M.B. 2000. Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. En: *Campylobacter*. Nachamkin, I., Blaser, M.J. (Ed). ASM Press. Whashington D.C. p. 139-153.

Lee, H.W., Park, Y.S., Jung, J.S., Shin, W.S. 2002. Chitosan oligosaccharides, dp 2-8, have prebiotic effect on the *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus* sp. *Anaerobe* 8: 319-324.

Lee, Y.K., Puong, K.L. 2002. Competition for adhesion between probiotics and human gastrointestinal pathogens in the presence of carbohydrate. *British Journal of Nutrition* 88: S101-S108.

Lee, M.D., Newell, D.G. 2006. *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. *Avian Diseases* 50: 1-9.

Lemay, M.J., Choquette, J., Delaquis, P.J., Gariépy, C., Rodrigue, N., Sausier, L. 2002. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. *International Journal of Food Microbiology* 78: 217-226.

Levin, R.E. 2007. *Campylobacter jejuni*: a review of its characteristics, pathogenicity, ecology, distribution, subspecies characterization and molecular methods of detection. *Food Biotechnology* 21: 1271-1347.

Lopez-Ferrer, A., De Bolos, C., Barranco, C., Garrido, M., Isern, J., Carltedt, I., Reis, C.A., Torrado, J., Real, F.X. 2000. Role of fucosyltransferases in the association between apomucin and Lewin antigen expression in normal and malignant gastric epithelium. *Gut* 47: 349-356.

Lu, L., Walker, A. 2001. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *American Journal of Clinical Nutrition* 73: 1124S-1130S.

Luquero Alcalde, F.J., Sánchez Padilla, E., Eiros Bouza, J.M., Domínguez-Gil González, M., Gobernado Serrano, C., Bachiller Luquer, R., Catrodeza Sanz, J.J., Ortiz de Lejarazu, R. 2007. Tendencia y variaciones estacionales de las gastroenteritis por *Campylobacter* en Valladolid. Serie de cinco años: 2000-2004. *Revista Española de Salud Pública* 81: 319-326.

MacCallum, A., Haddock, G., Everest, P.H. 2005. *Campylobacter jejuni* activates mitogen-activated protein kinases in Caco-2 cell monolayers and *in vitro* infected primary human colonic tissue. *Microbiology* 151: 2765-2772.

Madden, R.H., Moran, L., Scates, P. 1998. Frequency of occurrence of *Campylobacter* spp. in red meats and poultry in Northern Ireland and their subsequent subtyping using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and the random amplified polymorphic DNA method. *Journal of Applied Microbiology* 84: 703-708.

Mantle, M. 1996. The anti-adherent role of intestinal mucus: mechanisms and physiopathology. *Mucus Dialogue On-line* 2: 1-6.

Martinez-Rodriguez, A., Kelly, A.F., Park, S.F., Mackey, B.M. 2004. Emergence of variants with altered survival properties in stationary phase cultures of *Campylobacter jejuni*. *International Journal of Food Microbiology* 90: 321-329.

Mattick, K., Dirham, K., Domingue, G., Jorgenson, F., Sen, M., Schaffner, D.W., Humphrey, T. 2003. The survival of foodborne pathogens during domestic washing-up subsequent transfer onto washing-up sponges, kitchen surfaces and food. *Internacional Journal of Microbiology* 85: 213-226.

- McKay, A.M. 1990. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* against *Listeria* spp. Letters in Applied Microbiology 11: 15-17.
- Mifflin, J., Templeton, J., More, S. 2001. An improved sampling strategy for the study of *Campylobacter* spp. in poultry flocks. International Journal of Medical Microbiology 291: 38.
- Mihaljevic, R.R., Sikic, M., Klancnik, A., Brumini, G., Mozina, S.S., Abram, M. 2007. Environmental stress factors affecting survival and virulence of *Campylobacter jejuni*. Microbial Pathogenesis 43: 120-125.
- Montagne, L., Piel, C., Lallès, J.P. 2004. Effect of diet on mucin kinetics and composition: nutrition and health implications. Nutrition Reviews 62: 105-114.
- Murphy, G.S.J., Echeverria, P., Jackson, L.R., Arness, M.K., LeBron, C., Pitarangsi, C. 1996. Ciprofloxacin- and azithromycin-resistant *Campylobacter* causing traveler's diarrhea in U.S. troops deployed to Thailand in 1994. Clinical and Infectious Diseases 22: 868-869.
- Nannapaneni, R., Chalova, V.I., Crandall, P.G., Ricke, S.C., Johnson, M.G., O'Bryan, C.A. 2009. *Campylobacter* and *Arcobacter* species sensitivity to commercial orange oil fractions. International Journal of Food Microbiology 129: 43-49.
- National Research Council. 1999. The use of drugs in food animals: benefits and risks. National Academy Press. Washington D.C.
- Nerantzis, E.T., Tataridis, P. 2003. Integrated enology-utilization of winery by-products into high added value products. E-Journal of Science & Technology 12: 1-12.
- Neutra, M.R., Forstner, J.F. 1987. Gastrointestinal mucus: synthesis, secretion and function. En: Physiology of the gastrointestinal tract. Jhonson, L.R. (Ed). Raven Press. Nueva York, p. 975-1009.
- Newell, D.G., Pearson, A. 1984. The invasion of epithelial cell lines and the intestinal epithelium of infant mice by *Campylobacter jejuni/coli*. Journal of Diarrhoeal Diseases Research 2: 19-26.
- Newell, D.G., McBride, H., Dolby, J.M. 1985. Investigations on the rol of flagella in the colonization of infant mice with *Campylobacter jejuni* and attachment of *Campylobacter jejuni* to human epithelial cell lines. Journal of Hygiene 95: 217-227.
- Newell, D.G., Fearnley, C. 2003. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. Applied and Environmental Microbiology 69: 4343-4351.
- Ngoc Lan, P.T., Hayashi, H., Sakamoto, M., Benno, Y. 2002. Phylogenetic analysis of cecal microbiota in chicken by the use of 16S rDNA clone libraries. Microbiology and Immunology 46: 371-382.
- Noor, S.M., Husband, A.J., Widders, P.R. 1995. *In ovo* oral vaccination with *Campylobacter jejuni* establishes early development of intestinal immunity in chickens. British Journal of Poultry Science 36: 563-573.
- Nousiainen, J., Javanainen, J., Setälä, J., Von Wright, A. 2004. Lactic acid bacteria as animal probiotics. En: Lactic acid bacteria, microbial and functional aspects. Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand, A. (Ed). Marcel Dekker Inc. Nueva York, p. 547-580.
- Nurmi, E., Rantala, M. 1973. New aspects of *Salmonella* infections in broiler production. Nature 241: 210.
- Ofek, I., Hasty, D.L., Sharon, N. 2003. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. FEMS Immunology and Medical Microbiology 38: 181-191.

- Oldfield, E.C., Wallace, M.R. 2001. The role of antibiotics in the treatment of infectious diarrhea. *Gastroenterology Clinics of North America* 30: 817-836.
- Olsen, A., Halm, M., Jakobsen, M. 1995. The antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermented maize (kenkey) and their interactions during fermentation. *Journal of Applied Bacteriology* 79: 506-512.
- Ouwehand, A.C., Salminen, S., Tölkö, S., Roberts, P., Ovaska, J., Salminen, E. 2002. Resected human colonic tissue: new model for characterizing adhesion of lactic acid bacteria. *Clinical Diagnosis in Laboratory and Immunology* 9: 184-186.
- Park, S.F. 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogen. *International Journal of Food Microbiology* 74: 177-188.
- Parkhill, J., Wren, B.W., Mungall, K., Ketley, J.M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R.M., Felwell, T., Holroyds, S., Jagels, K., Karlyshev, A.V., Moule, S., Palen, M.J., Penn, C.W., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rutherford, K.M., Van Vliet, A.H., Whitehead, S., Barrell, B.G. 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 403: 665-668.
- Pearson, A.D., Greenwood, M., Healing, T.D., Rollins, D., Shahamat, M., Donaldson, J., Colwell, R.R. 1993. Colonization of broiler chickens by waterborne *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 87-996.
- Pearson, A.D., Greenwood, M. H., Donaldson, J., Healing, T. D., Jones, D. M., Shahamat, M., Feltham, R. K., Colwell, R. R. 2000. Continuous source outbreak of campylobacteriosis traced to chicken. *Journal of Food Protection* 63: 309-314.
- Pérez-Ciordia, I., Rezusta, A., Maizal, P., Larrosa, A., Herrera, D., Martínez-Navarro, F. 2001. Estudio comparado de infección por *Salmonella* y *Campylobacter* en Huesca. 1996-1999. *Revista Española de Salud Pública* 75: 459-466.
- Piddock, L.J.V. 1995. Quinolone resistance and *Campylobacter* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 36: 891-898.
- Qin, Z.R., Fukata, T., Baba, E., Arakawa, A. 1995. Effect of lactose and *Lactobacillus acidophilus* on the colonization of *Salmonella enteritidis* in chicks concurrently infected with *Eimeria tenella*. *Avian Diseases* 39: 548-553.
- Rabsch, W., Hargis, B.M., Tsohis, R.M., Kingsley, R.A., Hinz, K.H., Tschäpe, H., Baumler, A.J. 2000. Competitive exclusion of *Salmonella enteritidis* by *Salmonella gallinarum* in poultry. *Emerging Infectious Diseases* 6: 443-448.
- Rautelin, H., Aníñen, M.L. 2000. *Campylobacters*: the most common bacterial enteropathogens in the nordic countries. *Annals of Medicine* 32: 440-445
- Revolledo, L., Ferreira, A.J.P., Mead, G.C. 2006. Prospects in *Salmonella* control: competitive exclusion, probiotics, and enhancement of avian intestinal immunity. *Journal of Applied Poultry Research* 15: 341-351.
- Rice, B.E., Rollins, D.M., Mallinson, E.T., Carr, L., Joseph, S.W. 1997. *Campylobacter jejuni* in broiler chickens: colonization and humoral immunity following oral vaccination and experimental infection. *Vaccine* 15: 1922-1932.
- Richardson, N.J., Koornhof, H.J., Bokkenheuser, V.D., Mayet, Z., Rosen, E.U. 1983. Age related susceptibility to *Campylobacter jejuni* infection in a high prevalence population 58: 616-619.

- Rivera-Amill, V., Kim, B.J., Seshu, J., Konkel, M.E. 2001. Secretion of the virulence-associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. *Journal of Infectious Diseases* 183: 1607-1616.
- Rodríguez, F., Oballe, J., Domínguez, J.C., Soriano, G. 2001. Predominio de *Campylobacter jejuni* en casos de gastroenteritis bacteriana en el adulto. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 19: 138-139.
- Roller, S. 2003. *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods*. Woodhead Publishing, Cambridge, 384 p.
- Russell, R.G., O'Donnoghue, M., Blake, D.C. Jr., Zulty, J., DeTolla, L.J. 1993. Early colonic damage and invasion of *C. jejuni* in experimentally challenged infant *M. mulatta* monkeys. *Journal of Infectious Diseases* 168: 210-215.
- Sahin, O., Zhang, Q., Meitzler, J.C., Harr, B.S., Morishita, T.Y., Mohan, R. 2001. Prevalence, antigenic specificity, and bactericidal activity of poultry anti-*Campylobacter* maternal antibodies. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3951-3957.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J.H., Franck, A., Gibson, G.R., Isolauri, E., Moreau, M.C., Roberfroid, M., Rowland, I. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition* 80: 147-171.
- Samie, A., Ramalivhana, J., Igumbor, E.O., Obi, C.L. 2007. Prevalence, haemolytic and haemagglutination activities and antibiotic susceptibility profiles of *Campylobacter* spp. isolated from human diarrhoeal stools in Vhembe District, South Africa. *Journal of Health Population and Nutrition* 4: 406-413.
- Sandine, W.E. 1979. Role of *Lactobacillus* in the intestinal tract. *Journal of Food Protection* 42: 259-262.
- Santin, E., Maiorka, A., Macari, M. 2001. Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Journal of Applied Poultry Research* 10: 236-244.
- Savkovic, S.D., Villanueva, J., Turner, J.R., Matkowskyj, K.A., Hecht, G. 2005. Mouse model of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infection and Immunity* 73: 1161-1170.
- Sharma, J.M., Burmester, B. R. 1982. Resistance of Marek's Disease at hatching in chickens vaccinated as embryos with the Turkey Herpesvirus. *Avian Diseases* 26: 134-149.
- Schieber, A., Stintzing, F.C., Carle, R. 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds-recent developments. *Trends in Food Science and Technology* 12: 401-413.
- Shigematsu, M., Umeda, A., Fujimoto, S., Amako, K. 1998. Spirochaete-like swimming mode of *Campylobacter jejuni* in a viscous environment. *Journal of Medical Microbiology* 47: 521-526.
- Schillinger, U., Lücke, F.K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1901-1906.
- Schneitz, C. 2005. Competitive exclusion in poultry-30 years of research. *Food Control* 16: 657-667.
- Schoeni, J.L., Wong, A.C. 1994. Inhibition of *Campylobacter jejuni* colonization in chicks by defined competitive exclusion bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 1191-1197.
- Shreeve, J.E., Toszeghy, M., Pattison, M., Newell, D.G. 2000. Sequential spread of *Campylobacter* infection in a multi-pen broiler house. *Avian Diseases* 44: 983-988.



- Silva, M.L., Quintana, M.P., Barreras, R.P., Florido, G.M. 2005. Evaluación de la actividad prebiótica de un producto de exclusión competitiva sobre indicadores microbiológicos en pollos de ceba. *Brazilian Journal of Food Technology* 5: 102-108.
- Simon, P.M.G., Mobasser, A., Zopf, D. 1997. Inhibition of *Helicobacter pylori* binding to gastrointestinal epithelial cells by sialic acid-containing oligosaccharides. *Infection and Immunity* 65: 750-757.
- Skirrow, M.B. 1991. Epidemiology of *Campylobacter enteritis*. *International Journal of Food Microbiology* 12: 9-16.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology* 26: 118-122.
- Solis de los Santos, F., Donoghue, A.M., Venkitanarayanan, K., Dirain, M.L., Reyes-Herrera, I., Blore, P.J., Donoghue, D.J. 2008. Caprylic acid supplemented in feed reduces enteric *Campylobacter jejuni* colonization in ten-day-old broiler chickens. *Poultry Science* 87: 800-804.
- Solis de los Santos, F., Donoghue, A.M., Venkitanarayanan, K., Metcalf, J.H., Reyes-Herrera, I., Dirain, M.L., Aguiar, V.F., Blore, P.J., Donoghue, D.J. 2009. Therapeutic supplementation of caprylic acid in feed reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broiler chicks?. *Poultry Science* 88: 98-105.
- Sorvari, J. 2008. Developing environmental legislation to promote recycling of industrial by-products-an endless story?. *Waste Management* 3: 489-501.
- Stanley, K., Jones, K. 2003. Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter*. *Journal of Applied Microbiology* 94: 104S-113S.
- Stern, N.J., Line, J.E. 1992. Comparison of three methods for recovery of *Campylobacter* spp. from broiler carcasses. *Journal of Food Protection* 55: 663-666.
- Stern, N.J., Fedorka-Cray, P., Bailey, J.S., Cox, N.A., Craven, S.E., Hiatt, K.L., Musgrove, M.T., Ladely, S., Cosby, D., Mead, G.C. 2001. Distribution of *Campylobacter* spp. in selected U.S. poultry production and processing operations. *Journal of Food Protection* 64: 1705-1710.
- Susuki, K., Atsumi, M., Koga, M., Hirata, K., Yuki, N. 2004. Acute facial diplegia and hyperreflexia: A Guillain-Barré syndrome variant. *Neurology* 62: 825-827.
- Swayne, D.E., Beck, J.R., Kinney, N. 2000. Failure of a recombinant fowl Poxvirus vaccine containing an avian influenza hemagglutinin gene to provide consistent protection against influenza in chickens preimmunized with a Fowl Pox Vaccine. *Avian Diseases* 44: 132-137.
- Swenson, M.J. 1999. Digestión, excreción y metabolismo. En: *Fisiología de los animales domésticos de Dukes*. Swenson, M.J. (Ed). Limusa. Madrid, p. 325-331.
- Szymanski, C.M., King, M., Haardt, M., Armstrong, G.D. 1995. *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 cells. *Infection and Immunity* 63: 4295-4300.
- Tauxe, R.V. 1992. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* and the United States and other industrialized nations. En: *Campylobacter jejuni: current status and future trends*. Nachamkin, I., Blaser, M.J., Tompkins, L.S. (Ed). American Society of Microbiology. Washington D.C., p. 9-19.
- Thomas, R., Brooks, T. 2004. Common oligosaccharide moieties inhibit the adherence of typical and atypical respiratory pathogens. *Journal of Medical Microbiology* 53: 833-840.

- Tuomola, E.M., Salminen, S.J. 1998. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology* 41: 45-51.
- Tuomola, E.M., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J. 1999. Human ileostomy glycoproteins as a model for small intestinal mucus to investigate adhesion of probiotics. *Letters in Applied Microbiology* 28: 159-163.
- Unión Europea. 1970. Reglamento (CEE) n° 524/1970 del Consejo de Directiva, de 23 de noviembre de 1970, relativo a los aditivos en la alimentación animal. Directiva del 23 de noviembre de 1970. Bruselas.
- Unión Europea. 2003. Reglamento (CE) n° 261/2003 de la Comisión, de 12 de febrero de 2003, relativo a la autorización provisional de nuevas utilidades de aditivos en los piensos. Bruselas.
- Unión Europea. 2005. Reglamento (CE) n° 281/2005 de la Comisión, de 26 de diciembre de 2005, relativo a la propuesta para una directiva del Parlamento Europeo y para el Consejo de Desechos. Bruselas.
- Van Deun, K., Pasmans, F., Van Immerseel, F., Ducatelle, R., Haesebrouck, F. 2007. Butyrate protects Caco-2 cells from *Campylobacter jejuni* invasion and translocation. *British Journal of Nutrition* 14: 1-5.
- Vandeplas, S., Marcq, C., Dauphin, R.D., Beckers, Y., Thonart, P., Théwis, A. 2008. Contamination of poultry flocks by the human pathogen *Campylobacter* spp. and strategies to reduce its prevalence at the farm level. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 12: 317-334.
- Van Hees, B.C., Veldman-Ariesen, M.J., de Jongh, B.M., Tersmette, M., Van Pelt, W. 2007. Regional and seasonal differences in incidence and antibiotic resistance of *Campylobacter* from a nationwide surveillance study in The Netherlands: an overview of 2000-2004. *Clinical Microbiology and Infection* 13: 305-310.
- Vesterlund, S. 2006. Methods to determine the safety and influence of probiotics on the adherence and viability of pathogens [tesis doctoral]. University of Turku. Turku.
- Vesterlund, S., Karp, M., Salminen, S., Ouwehand, A.C. 2006. *Staphylococcus aureus* adheres to human intestinal mucus but can be displaced by certain lactic acid bacteria. *Microbiology* 152: 1819-1826.
- Vierikko, A., Aninien, M.L., Siitonen, A., Ruutu, P., Rautelin, H. 2004. Domestically acquired *Campylobacter* infections in Finland. *Emerging Infectious Diseases* 10: 127-130.
- Wagenaar, C.L., Snijders, J.M.A. 2004. Decontamination of broilers with hydrogen peroxide stabilised with glycerol during processing. *International Journal of Food Microbiology* 91: 205-208.
- White, L.A., Newman, M.C., Cromwell, G.L., Lindemann, M.D. 2002. Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weaning pigs. *Journal of Animal Science* 80: 2619-2628.
- WHO. 2001. Joint FAO/WHO expert consultation on risk assessment of microbiological hazards in foods: hazard identification, exposure assessment and hazard characterization of *Campylobacter* spp. in broiler chickens and *Vibrio* spp. in seafood. Génova.
- Whyte, P., Collins, J.D., McGill, K., Monahan, C., O'Mahony, H. 2001. Quantitative investigation of the effects of chemical decontamination procedures on the microbiological status of broiler carcasses during processing. *Journal of Food Protection* 64: 179 -183.
- Wiley-Liss. 1994. Culture of animal cells. A manual of basic technique. John Wiley & Sons Canada Ltd. Nueva York.

- Willis, L., Murray, C. 1997. *Campylobacter jejuni* seasonal recovery observations of retail market broilers. Poultry Science 76: 314-317.
- Wittschier, N., Lengsfeld, C., Vortheims, S., Stratman, U., Ernst, J.F., Verspohl, E.J., Hensel, A. 2007. Large molecules as anti-adhesive compounds against pathogens. Journal of Pharmacy and Pharmacology 59: 777-786.
- Wooldrige, K.G., Ketley, J.M. 1997. *Campylobacter*-host cell interactions. Trends in Microbiology 5: 96-102.
- Workman, S.N., Mathison, G.E., Lavoie, M.C. 2005. Pet dogs and chicken meat as reservoirs of *Campylobacter* spp. in Barbados. Journal of Clinical Microbiology 43: 2642-2650.
- Young, K.T., Davis, L.M., DiRita, V.J. 2007. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. Nature Reviews Microbiology 5: 665-679.
- Zhang, Q., Plummer, P. 2008. Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter*. En: *Campylobacter*. Nachamkin, I., Szymanski, C.M., Blazer, M.J. (Ed). ASM Press. Washington DC. p. 263-276.
- Zheng, J., Meng, J., Zhao, S., Singh, R., Song, W. 2006. Adherence and invasion of human intestinal epithelial cells by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from retail meat products. Journal of Food Protection. 69: 768-774.
- Zhu, J., Hua, X., Wu, Z., Yi, M. 2006. Molecular mechanisms of pathogenesis of *Campylobacter jejuni*. Reviews in Medical Microbiology 17: 39-43.
- Ziprin, R., Hume, M.E., Young, C.R., Harvey, R.B. 2002. Inoculation of chicks with viable non-colonizing strains of *Campylobacter jejuni*: evaluation of protection against a colonizing strain. Current Microbiology 44: 221-223.
- Zopf, D., Roth, S. 1996. Oligosaccharide anti-infective agents. Lancet 347: 1017-1021.

Se estudió la influencia de diferentes variables y determinantes de patogenicidad sobre la capacidad de adherencia e invasividad de *Campylobacter* spp. a cultivos celulares Caco-2. Se determinó que ninguno de los dos parámetros varía al emplear diferentes tiempos de incubación (entre 1 y 4 h). Sin embargo se observó que ambos aumentan de manera proporcional a la concentración del inóculo microbiano empleado, hasta alcanzar el punto de saturación (MOI = 100). La adherencia no se ve alterada al emplear pH de 5, 6 y 7, mientras que la invasividad disminuye a medida que se reduce el valor de este parámetro. Entre las 5 cepas de *Campylobacter* estudiadas, las más resistentes ante condiciones de estrés (118 y LP2) presentan una capacidad similar de adherencia e invasión a células epiteliales en fase exponencial y estacionaria de crecimiento. Por el contrario, la entrada en fase estacionaria ocasiona una disminución en la capacidad de adherencia e invasividad en las cepas más sensibles al estrés (11351, 11168 y LP1). El análisis de varios genes asociados con la virulencia de *Campylobacter* (*flaA*, *ciaB*, *cadF* y *pldA*) permitió observar que no es la presencia de éstos sino su composición lo que pudiera estar relacionado con la capacidad de adherencia e invasividad observada en las diferentes cepas estudiadas.

Capítulo

# 2

Influencia de diferentes variables y determinantes de patogenicidad sobre la adherencia e invasividad de *Campylobacter*

## 2.1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Se ha descrito que *Campylobacter* sufre cambios metabólicos y fisiológicos importantes durante su entrada en fase estacionaria con respecto a las características observadas en fase exponencial, reflejados en alteraciones en su patrón de movilidad, en los niveles de expresión de algunos de sus genes y en variaciones en cuanto a la utilización de los sustratos (Wright *et al.*, 2009; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2004). Sin embargo, prácticamente todos los estudios acerca de la adherencia e invasividad del patógeno han empleado cultivos en fase exponencial, por lo que el efecto de la fase de crecimiento sobre estos parámetros continúa siendo desconocido.

La presencia de algunos genes como *flaA*, *ciaB*, *pldA* y *cadF* se ha asociado con la virulencia y la patogenicidad de *Campylobacter*, y puede influir sobre su capacidad de adherencia e invasividad (Datta *et al.*, 2003), por lo que el estudio de estos genes resulta de interés cuando se analizan estos parámetros. Además de depender de factores genéticos de virulencia, la capacidad de *Campylobacter* spp. para adherirse e invadir cultivos de Caco-2 puede verse afectada además por diferentes variables, como son la especie y cepa bacteriana, el tiempo de incubación del patógeno con las células epiteliales, el pH del medio y la concentración del inóculo bacteriano (Mooney *et al.*, 2003; Szymanski *et al.*, 1995).

Debido a lo anterior, el principal objetivo de este capítulo es el estudio de la influencia de diferentes variables (tiempo de incubación, pH, multiplicidad de infección, fase de crecimiento y efecto de la cepa bacteriana) sobre la capacidad de adherencia e invasividad de *Campylobacter* spp. a cultivos de células epiteliales Caco-2, con el propósito de optimizar la metodología a emplear en adelante en nuestro laboratorio en este tipo de estudios. De igual manera, este capítulo tiene como objetivo estudiar diferentes factores de virulencia de *Campylobacter* y establecer su relación con su capacidad de adherencia e invasividad a células Caco-2. Para ello, se siguieron los siguientes objetivos específicos:

Determinar la influencia del tiempo de incubación sobre la capacidad de adherencia e invasividad de *Campylobacter* a células Caco-2 y selección del período óptimo.

Optimizar la concentración del inóculo de *Campylobacter* a emplear en estudios de adherencia e invasividad a células Caco-2.

Estudiar la influencia del pH sobre la capacidad de adherencia e invasividad de *Campylobacter* a células Caco-2.

Determinar la influencia de la cepa de *Campylobacter* en la adherencia e invasividad a células Caco-2, por medio del cumplimiento de los siguientes sub-objetivos.

Caracterizar el comportamiento de 5 cepas de *Campylobacter* aisladas de diferentes orígenes, durante la fase exponencial y la fase estacionaria, y observar la influencia de la fase de crecimiento sobre su capacidad de adherencia e invasividad.

Determinar si existe una relación entre el patrón de adherencia e invasividad de las diferentes cepas y la presencia de distintos factores de virulencia relacionados con dichas características, como son las proteínas codificadas por los genes *flaA*, *ciaB*, *cadF* y *pldA*.

## **2.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1. Células eucariotas**

#### **2.2.1.1. Material plástico**

Para el cultivo de las células epiteliales se emplearon rascadores de células de 25 cm, placas de 24 pozos, frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> con ventilación y envases para centrifuga de 50 mL y fondo cónico (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania).

#### **2.2.1.2. Medios y reactivos**

Para la siembra y mantenimiento de las células epiteliales Caco-2, se utilizaron los siguientes medios y reactivos: medio modificado Dulbecco Eagle con glutamina y piruvato (DEMEM), suero fetal bovino (SFB), solución de aminoácidos no esenciales, mezcla de antibióticos estreptomycin y penicilina (SP) y tripsina/EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (Cambrex BioScience, Wokingham, Reino Unido), colorante azul tripán (BioWhittaker, Walkersville, EE.UU.) y tampón fosfato salino libre de calcio y magnesio (PBS-Ca/Mg) pH 7, 6 y 5. En adelante, en todos los casos en los que no se especifique el pH del tampón empleado, se asumirá que se usó el de pH 7.

#### **2.2.1.3. Obtención de células s Caco-2**

Las células Caco-2 se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares para la Microbiología Aplicada y la Investigación (ECACC 86010202, Salisbury, Reino Unido) y se mantuvieron en congelación (-70° C) hasta el momento de su utilización.

#### **2.2.1.4. Condiciones de cultivo de células Caco-2**

Las células se cultivaron en frascos de cultivo con Medio DEMEM con 10% de SFB, 1% aminoácidos no esenciales y 1% SP, a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub> (estufa Inco 2, Memmert, Alemania). Los cultivos se observaron a diario con la ayuda de un microscopio invertido y un aumento de 25X (CT Wild Heerbrugg; Alemania) para comprobar su desarrollo, hasta que alcanzaron un 80-90% de confluencia, es decir, de agrupación entre células. Llegado ese momento, se eliminó el medio de cultivo, se añadieron 5 mL de la solución de tripsina/EDTA y se dejó reposar 8 min. Pasado este tiempo, se añadieron 20 mL del medio de cultivo y con la ayuda de un rascador de células, éstas se separaron de la superficie del frasco de cultivo y se transvasaron a envases de centrifuga.



Se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min (Megafuge 1.0 Heraus Instruments, Hanau, Alemania), se resuspendió en 4 mL de medio y se realizó el recuento de células al microscopio (Meiji Techno ML5000, California, EE.UU.), con la ayuda de un hematocitómetro convencional. Para los ensayos experimentales, las células Caco-2 se cultivaron en placas de plástico de 24 pozos, a una concentración de  $2 \times 10^4$  células por pozo y se incubaron durante 7 días hasta alcanzar la confluencia para cultivos no diferenciados (ND) o 21 días para cultivos diferenciados (DF) bajo las condiciones descritas. En adelante, siempre que el nivel de diferenciación celular no sea especificado en este trabajo, se asumirá que se emplearon cultivos no diferenciados (ND), es decir, de 7 días de crecimiento.

El cambio del medio de cultivo se realizó cada 48 h, usando medio fresco y atemperado a 38° C (baño de agua Precistern Selecta, Barcelona, España). En el último cambio previo a cada ensayo, se sustituyó el medio DEMEM por uno carente de la mezcla de antibióticos. Previamente a cada ensayo, las células se lavaron dos veces con PBS<sup>-Ca/Mg</sup>.

#### **2.2.1.5. Ensayos de viabilidad de células Caco-2**

Con el fin de determinar el efecto de la gentamicina (GTM) (500 mg/mL) empleada para los ensayos de invasividad a lo largo de este estudio, sobre la viabilidad de las células Caco-2, las células epiteliales se lavaron dos veces con 1 mL PBS<sup>-Ca/Mg</sup> y se incubaron durante 1 h con 5% CO<sub>2</sub> con 500 µl del compuesto. Como control se empleó PBS<sup>-Ca/Mg</sup>.

De manera similar, para probar el efecto de diferentes niveles de pH sobre la viabilidad de las células Caco-2, las células epiteliales se lavaron dos veces con 1 mL PBS<sup>-Ca/Mg</sup> y se incubaron durante 1 h con 5% CO<sub>2</sub> con 500 µl de PBS<sup>-Ca/Mg</sup> (pH 7, 6 ó 5).

En ambos casos, después de la incubación, las monocapas celulares se lavaron dos veces con 1 mL de PBS<sup>-Ca/Mg</sup>. Se añadieron 200 µl/pozo de tripsina/EDTA, se incubó durante 3 min y se añadieron 800µl/pozo de DEMEM. Se centrifugó durante 10 min a 5000 rpm. Se añadieron 50 µl de DEMEM y 50 µl de colorante azul tripán al pellet obtenido y se incubó 5 min. Finalmente, se realizó el recuento de células al microscopio, utilizando para ello un hematocitómetro convencional.

Usando la siguiente fórmula se calculó el porcentaje de viabilidad de las células:

$$\text{Porcentaje de viabilidad} = 100 \times \text{células viables} \times \text{células totales}^{-1}$$

## **2.2.2. Células bacterianas**

### **2.2.2.1. Medios y reactivos**

Para el cultivo de las células de *Campylobacter* se utilizó como medio líquido caldo Brucella (BB) (Bencton Dickinson and Company, Le Pont de Claix, Francia), y Müeller-Hinton con 5% de sangre de cordero desfibrinada (MHS) (Biomedics, Tres Cantos, España) como agar de siembra. Se empleó también PBS<sup>-Ca-Mg</sup> pH 7, 6 y 5 (Mediatech, Washington DC, E.E.U.U.), y gentamicina (GTM) (Merck, Darmstadt, Alemania).

### **2.2.2.2. Cepas bacterianas**

Se utilizaron cinco cepas de *Campylobacter* spp., dos pertenecientes a la Colección Nacional de Cultivos Tipo del Reino Unido (NCTC, Londres, Inglaterra) (*C. jejuni* NCTC 11351 y *C. jejuni* NCTC 11168) y tres provenientes de diferentes aislamientos clínicos, suministradas por el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III (*C. jejuni* 118) y por el Departamento de Microbiología del Hospital La Paz (*C. jejuni* LP1 y *C. coli* LP2). Todas las cepas empleadas se almacenaron hasta el momento de su utilización a -70° C en viales con crioprotección específica (Microbank, Pro-Lab Diagnostics, Neston, Reino Unido).

### **2.2.2.3. Condiciones de cultivo de cepas de *Campylobacter***

Las cepas de *Campylobacter* se cultivaron en agar MHS bajo condiciones de microaerofilia (85% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>) utilizando un incubador de atmósfera variable (VAIN) modelo MACS-VA500 (Don Whitley Scientific, Shipley, Reino Unido), durante 48 h a 38° C. En adelante, estas condiciones serán denominadas como cultivo en microaerofilia o VAIN.

Se seleccionaron colonias aisladas que se inocularon en 50 mL de medio líquido BB e incubadas durante 24 h en condiciones de microaerofilia y en agitación (240 rpm) por 18 h a 38° C. Se realizó una dilución 1/10 de estos cultivos en BB fresco y se incubó en las condiciones descritas anteriormente durante 18 h. Posteriormente, se realizó una dilución 1/100 de los cultivos en BB fresco. Estos últimos cultivos, incubados según el tiempo indicado en cada caso, constituyeron el inóculo bacteriano utilizado para los diferentes ensayos. Todos los cultivos posteriores de *Campylobacter* spp. se realizaron en BB (medio líquido), o en MHS (medio sólido).

#### **2.2.2.4. Estudio fisiológico del crecimiento de *Campylobacter***

Para el estudio fisiológico del crecimiento de *Campylobacter* spp., las cepas se cultivaron bajo las condiciones mencionadas en el apartado 2.2.2.3. Se tomaron muestras después de 8, 24 y 48 h de incubación bajo las condiciones descritas con antelación. Las muestras mencionadas se diluyeron de manera seriada (PBS pH 7), se sembraron en MHS y se incubaron en microaerofilia durante 48 h. Pasado este tiempo se realizó el recuento de las unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL).

#### **2.2.2.5. Efecto de las condiciones de incubación sobre la viabilidad de *Campylobacter***

Los cultivos bacterianos se incubaron tanto con un 5% de CO<sub>2</sub> como bajo condiciones de microaerofilia. Se tomaron muestras de los cultivos a 1 h y 3 h, que equivale al tiempo de incubación empleado para los ensayos de adherencia e invasividad, respectivamente. Se realizaron diluciones seriadas y se sembró en medio sólido MHS para el recuento bacteriano.

#### **2.2.2.6. Ensayos de viabilidad para *Campylobacter***

Para la determinación del efecto de los diferentes niveles de pH empleados en las pruebas de adherencia e invasividad, se lavó dos veces el inóculo bacteriano y se resuspendió en PBS<sup>-Ca/Mg</sup> pH 7, 6 ó 5. Se incubó en condiciones de microaerofilia durante 2 h, después de lo cual se realizaron diluciones seriadas y siembra en agar MHS.

De manera similar, para la determinación de la concentración óptima de antibiótico a emplear en las pruebas de invasividad, se incubó en condiciones de microaerofilia el inóculo bacteriano con diferentes concentraciones de GTM (0, 100, 250 y 500 mg/mL) durante 2 h, y se realizaron diluciones seriadas y siembra en agar MHS.

### **2.2.3. Ensayos de adherencia e invasividad a células Caco-2**

#### **2.2.3.1. Condiciones generales**

El método utilizado para las pruebas de adherencia e invasividad está basado en el descrito por Hänel *et al.* (2004). Los inóculos bacterianos empleados en cada caso se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min y se lavaron con PBS<sup>-Ca/Mg</sup> (con pH acorde a las especificaciones de cada caso) + 1% de SFB y la densidad óptica a 600 nm se ajustó según la concentración bacteriana especificada en cada caso. De esta suspensión, 500 µl se inocularon en pozos que contenían monocapas de células

Caco-2. El número de bacterias inoculado se determinó retrospectivamente, utilizando diluciones seriadas y cultivo en placas con el medio sólido.

Se incubaron las células Caco-2 por el tiempo especificado en cada caso a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> para permitir la adherencia e invasividad de las bacterias. Para la determinación de la adherencia, se lavaron las células tres veces con PBS<sup>-Ca/Mg</sup>, se lisó la monocapa celular con Tritón X-100 al 1% y se contabilizó el total de las bacterias adheridas e internalizadas por medio de diluciones seriadas y recuento en placas de agar MHS.

Para la determinación de las bacterias internalizadas, las células infectadas se lavaron dos veces con PBS<sup>-Ca/Mg</sup> y se incubaron con 5% CO<sub>2</sub> a 37° C durante el tiempo especificado en cada caso en PBS<sup>-Ca/Mg</sup> fresco con 1% de SFB y la concentración necesaria de GTM específica para cada cepa, con el fin de eliminar el número de microorganismos extracelulares. Las células se lavaron 2 veces con PBS<sup>-Ca/Mg</sup> y se lisaron con Tritón X-100 al 1%. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas y se sembró en medio sólido.

En cada ensayo de adherencia e invasividad se realizó el recuento del número de células epiteliales de tres pozos diferentes. Para ello se lavaron las monocapas de células Caco-2 dos veces con 1 mL de PBS<sup>-Ca/Mg</sup>, se añadieron 200 µl/pozo de tripsina/EDTA, se incubó durante 3 min y se añadieron 800 µl/pozo de DEMEM. Se centrifugó durante 10 min a 5000 rpm y se resuspendió en 100 µl de DEMEM. Finalmente se realizó el recuento de células al microscopio, utilizando para ello un hematocitómetro convencional. Este recuento se realizó con la finalidad de controlar la multiplicidad de infección (MOI) empleada en cada caso.

De igual manera, en cada ensayo se realizó el recuento del inóculo bacteriano empleado, para lo cual se sembraron diluciones seriadas del cultivo y se incubaron bajo las condiciones especificadas para cada bacteria.

Las tasas de adherencia e invasividad se calcularon basándose en el inóculo bacteriano empleado, utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{Porcentaje de adherencia} = 100 \times \text{Bacterias adheridas} \times \text{Bacterias en el inóculo}^{-1}$$

$$\text{Porcentaje de invasividad} = 100 \times \text{Bacterias invasoras} \times \text{Bacterias en el inóculo}^{-1}$$

### **2.2.3.2. Influencia del tiempo de incubación en ensayos de adherencia e invasividad de *Campylobacter***

Se obtuvieron inóculos bacterianos de la cepa *C. jejuni* LP1 según la metodología descrita en 2.2.2.3., tras 24 h de incubación. Los ensayos de adherencia e invasividad se realizaron según se mencionó con anterioridad. El inóculo bacteriano, ajustado a un MOI final de 1000 (Karlyshev *et al.*, 2004) se incubó en presencia de las células epiteliales durante 1, 2, 3 ó 4 h, y se empleó PBS<sup>-Ca/Mg</sup> con pH 7.

### **2.2.3.3. Influencia de la concentración del inóculo de *Campylobacter* en ensayos de adherencia e invasividad**

Se obtuvieron inóculos bacterianos de la cepa *C. jejuni* LP1 según la metodología descrita en 2.2.2.3., tras 24 de incubación. Los ensayos de adherencia e invasividad se realizaron según se mencionó con anterioridad, empleando PBS<sup>-Ca/Mg</sup> a pH 7. Para ello, se utilizaron diferentes niveles de inóculo bacteriano, que corresponden a los siguientes valores de MOI: 1000; 100; 10; 1; 0,1 y 001; los cuales se incubaron durante 1 h en contacto con las células epiteliales.

### **2.2.3.4. Influencia del pH en ensayos de adherencia e invasividad de *Campylobacter***

Se obtuvieron inóculos bacterianos de la cepa *C. jejuni* LP1 según la metodología descrita en 2.2.2.3., tras 24 de incubación. Antes de su adición a los cultivos celulares, el inóculo bacteriano (MOI = 1000) se lavó tres veces (4500 rpm x 6 min), se resuspendió en PBS<sup>-Ca/Mg</sup> a pH 7, 6 ó 5, y se incubó durante 1 h con las células epiteliales.

## **2.2.4. Estudio de factores de patogenicidad relacionados con la virulencia de *Campylobacter***

### **2.2.4.1. Extracción de ADN cromosómico bacteriano**

Para la extracción del ADN cromosómico de *Campylobacter* spp., las cepas de este microorganismo se cultivaron bajo las condiciones mencionadas en el apartado 2.2.2.3. La concentración bacteriana se ajustó a una  $A_{600} = 0,6 \pm 0,01$  y los cultivos se centrifugaron a 2700 rpm durante 15 minutos. Se lavó el pellet con 500  $\mu$ L de TES (10 mM tris-HCl pH 8; 0,1 mM EDTA; 100 mM NaCl), se centrifugó a 12000 rpm durante 4 min y se resuspendió en 600  $\mu$ L de TE (10 mM tris-HCl pH 8; 0,1 mM EDTA) y lisozima (10 mg/mL) (Sigma-Aldrich, Dorset, Reino Unido). Por último, se incubó en un baño de agua (Precistern Barcelona, España) a 37° C durante 30 min.

Posteriormente se añadieron 70  $\mu$ L de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% hasta lograr la lisis del cultivo, y se agregaron 700  $\mu$ L de fenol-Sevag (fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, 25:24:1) agitando suavemente por inversión. Se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min y se recogió la fase superior acuosa, a la cual se añadieron 700  $\mu$ L de Sevag (cloroformo:alcohol isoamílico, 24:1). Después de agitar suavemente, se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min. Se recogió nuevamente la fase acuosa superior y se añadieron 20  $\mu$ L de NaCl 5M (1/25 volumen).

A continuación se agregaron 1,4 mL de etanol al 100% (-20° C). El ADN compactado presente en la muestra se recogió con la ayuda de una pipeta y se lavó con 500  $\mu$ L de etanol al 70%. La muestra se incubó a 37° C hasta su desecación y la fracción recuperada se resuspendió en 50  $\mu$ L de TE.

#### 2.2.4.2. Síntesis de cebadores

Para la amplificación de los genes *flaA*, *cadF*, *ciaB* y *pldA*, se emplearon los siguientes cebadores, sintetizados por Eurofins M.W.G. GmbH (Hamburg, Alemania):

**Tabla 2.1.** Cebadores para los genes *flaA*, *cadF*, *ciaB* y *pldA* empleados en este trabajo

Gen	Oligonucleótido	Secuencia 5'→3'	Referencia
<i>flaA</i>	<i>flaA</i> -F	ATGGGATTTTCGTATTAACAC	Hänel <i>et al.</i> , 2004
	<i>flaA</i> -R	CTGTAGTAATCTTAAAACATTTTG	
<i>cadF</i>	<i>cadFI</i> -F2B	TTGAAGGTAATTTAGATATG	Zheng <i>et al.</i> , 2006
	<i>cadFI</i> -R1B	CTAATACCTAAAGTTGAAAC	
<i>ciaB</i>	<i>ciaBI</i> -652	TGCGAGATTTTTCGAGAATG	Zheng <i>et al.</i> , 2006
	<i>ciaBI</i> -1159	TGCCCGCCTTAGAACTTACA	
<i>pldA</i>	<i>pldA</i> -361	AAGAGTGAGGCGAAATTCCA	Zheng <i>et al.</i> , 2006
	<i>pldA</i> -726	GCAAGATGGCAGGATTATCA	

#### 2.2.4.3. Amplificación del gen *flaA*

Para la amplificación del gen *flaA*, se mezclaron 2  $\mu$ L del ADN microbiano obtenido como se indica en 2.2.4.1.; 12,5  $\mu$ L de agua bidestilada, 5  $\mu$ L de tampón para Taq polimerasa (10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl); 5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>; 5  $\mu$ L de solución de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (Amersham Pharmacia Biotech, Sunnyvale, E.E.U.U.); 10  $\mu$ L del cebador en dirección 5'→3'; 10  $\mu$ L del cebador en dirección 3'→5'; y 0,4  $\mu$ L de Taq polimerasa (Applied Biosystems, Tres Cantos, España).

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, Alemania). El programa de termociclado que se empleó para la amplificación del ADN bacteriano consistió en una etapa de desnaturalización inicial, en la cual se mantuvo la muestra a 95 °C durante 10 minutos, para activar la enzima y conseguir la separación de las dos cadenas de ADN molde.

A continuación se repitieron 35 ciclos de tres fases cada uno:

- 1) Desnaturalización de los oligonucleótidos con el ADN molde (95° c durante 1 min).
- 2) Hibridación del ADN desnaturalizado con sus secuencias complementarias 45° C (1 min).
- 3) Síntesis de las nuevas cadenas de ADN (72° C durante 2 min).

Una vez finalizados los ciclos, la muestra se mantuvo a 72 °C durante 10 min para que tuviera lugar una elongación final. Una vez concluida la reacción, la muestra se almacenó a 4° C hasta el momento de su uso.

Para la verificación de los fragmentos amplificados (tamaño del gen 1,7 Kb), se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa, empleando agarosa al 0,7% con un 20% de tampón de carga a 5 V/cm, utilizando como marcador de pesos moleculares  $\lambda$ -hindIII/ECO (Biotools, Madrid, España). La electroforesis se realizó a 5 V/cm y una vez finalizada, los geles se colocaron en tampón TAE (Tris-fosfato-EDTA) con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) 0,5  $\mu$ g/mL para su tinción.

#### **2.2.4.4. Digestión enzimática del gen *flaA***

Se realizó la comparación de los fragmentos amplificados del gen *flaA* obtenidos como se indicó en 2.2.4.1. de las diferentes cepas de *Campylobacter* spp. Para ello, se emplearon dos enzimas diferentes: *AluI* y *DdeI*. En ambos casos, 8  $\mu$ L de la muestra del gen amplificado se incubaron durante 2 h a 37° C con 1  $\mu$ L de tampón Tris-HCl 50 mM y 0,8  $\mu$ L de la enzima. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% con un 20% de tampón de carga a 5 V/cm, empleando 100 bp Ladder (Biotools, Madrid, España) como marcador de pesos moleculares.

#### **2.2.4.5. Amplificación de los genes *cadF*, *ciaB* y *pldA***

Para la amplificación de los genes *cadF*, *ciaB* y *pldA*, se mezclaron 2  $\mu$ L del ADN microbiano obtenido como se indica en 1.2.3.1.; 12,5  $\mu$ L de agua bidestilada, 5  $\mu$ L de tampón para Taq polimerasa (10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl); 5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>; 5  $\mu$ L de solución de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (Amersham Pharmacia Biotech, Sunnyvale, E.E.U.U.); 10  $\mu$ L del cebador en dirección 5'→3';

10 µL del cebador en dirección 3'→5'; y 0,4 µL de Taq polimerasa (Applied Biosystems, Tres Cantos, España).

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, Alemania). El programa de termociclado que se empleó para la amplificación del ADN bacteriano consistió en una etapa de desnaturalización inicial, en la cual se mantuvo la muestra a 95 °C durante 10 minutos, para activar la enzima y conseguir la separación de las dos cadenas de ADN molde.

A continuación se repitieron 35 ciclos de tres fases cada uno:

- 1) Desnaturalización de los oligonucleótidos con el ADN molde (95° c durante 1 min).
- 2) Hibridación del ADN desnaturalizado con sus secuencias complementarias 42° C (1 min).
- 3) Síntesis de las nuevas cadenas de ADN (72° C durante 50 seg).

Una vez finalizados los ciclos, la muestra se mantuvo a 72 °C durante 10 min para que tuviera lugar una elongación final. Una vez concluida la reacción, la muestra se almacenó a 4° C hasta el momento de su uso.

Posteriormente, se verificaron los fragmentos amplificados para los genes *ciaB* (527 bp), *cadF* (400 bp) y *pldA* (385 bp) mediante una electroforesis en gel de agarosa, empleando agarosa al 2% con un 20% de tampón de carga a 5 V/cm, utilizando 100 bp como marcador de pesos moleculares.

#### **2.2.4.6. Secuenciación de los genes *flaA*, *cadF*, *ciaB* y *pldA* y determinación de sus alineamientos**

Para llevar a cabo la secuenciación de los genes *flaA*, *cadF*, *ciaB* y *pldA*, se emplearon 10 µL del ADN obtenido como se indica en 2.2.4.1. y 1 µL del cebador en dirección 5'→3'. La secuenciación se realizó en el Centro de Investigaciones Biológicas (SECUGEN, CIB-CSIC, Madrid, España). Una vez obtenida las secuencias, se determinaron sus alineamientos múltiples, empleando el programa CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk>).

#### **2.2.5. Análisis estadístico**

Los datos experimentales se analizaron utilizando el programa Minitab versión 14.1 (Minitab 14, State College, PA). Para el análisis de datos se empleó la prueba t de Student. Las diferencias entre

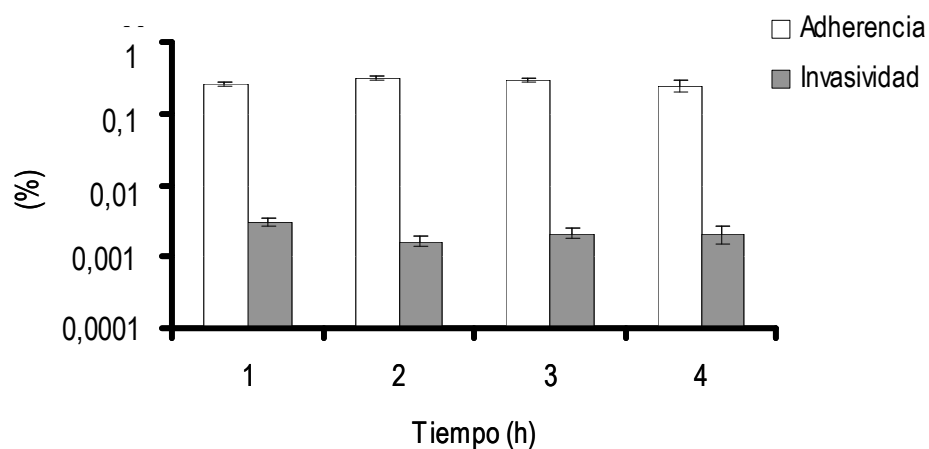


muestras se consideraron significativas cuando  $p \leq 0,05$ . En las Tablas y Figuras correspondientes, N se refiere al número de experimentos realizados y n al número de muestras analizadas.

## 2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.3.1. Influencia del tiempo de incubación en ensayos de adherencia e invasividad de *Campylobacter*

El tiempo de incubación del inóculo bacteriano con las células epiteliales es una variable que puede influir en los resultados de los ensayos de adherencia e invasividad. Con el fin de optimizar el tiempo de incubación a emplear durante dichos ensayos, se estudió la variabilidad de estos parámetros al emplear diferentes períodos de incubación (1, 2, 3 y 4 h) (Figura 2.1.).



**Figura 2.1.** Adherencia e invasividad de *C. jejuni* LP1 a cultivos de células epiteliales Caco-2 al emplear diferentes tiempos de incubación (1, 2, 3 y 4 h). Resultados expresados como la media del % de adherencia o invasividad con respecto al inóculo  $\pm$  la desviación estándar para N=2, n=2.

Se debe mencionar que antes de llevar a cabo este estudio, se observó que las condiciones de incubación a las que sería sometida la cepa *C. jejuni* LP1 durante las pruebas de adherencia e invasividad no afectan de manera significativa ( $p > 0,05$ ) la viabilidad de la bacteria (Tabla A.1.). De manera similar, se determinó la concentración mínima de gentamicina (GTM) necesaria a emplear para asegurar la eliminación de las células de *C. jejuni* LP1 que no han logrado invadir los cultivos de Caco-2 durante las pruebas de invasividad (Tabla A.4.). Se estudió también el efecto de la máxima concentración de gentamicina empleada para ensayos de invasividad a lo largo de este estudio (500 mg/mL) sobre la viabilidad de las células Caco-2 y se vió que la misma no se ve significativamente afectada ( $p > 0,05$ ) (Tabla A.5.) al emplear dicho compuesto.

A pesar de que se han realizado numerosos estudios en los cuales se emplean *Campylobacter* spp. y células Caco-2, no existe un consenso en cuanto al tiempo de incubación a utilizar, aunque se suelen usar períodos entre 1 y 5 h (Hänel *et al.*, 2004; Szymanki *et al.*, 1995). Russell y Blake (1994) encontraron que la adherencia máxima de *C. jejuni* a cultivos de Caco-2 se logra entre las 1 y 2,5 h de realizada la inoculación, sin embargo, dicho estudio no excedió las 2,5 h. De manera similar, el equipo de Konkel (1992) describió que los valores máximos de invasividad de *C. jejuni* a células Caco-2 se logran a las 4 h de incubación. Por otra parte, se ha observado que al emplear la línea celular INT 407, la adherencia de *C. jejuni* aumenta de manera lineal durante el tiempo de incubación, hasta alcanzar su máximo a las 4 h, momento en el cual este parámetro declina rápidamente (McSeegan y Walker, 1986).

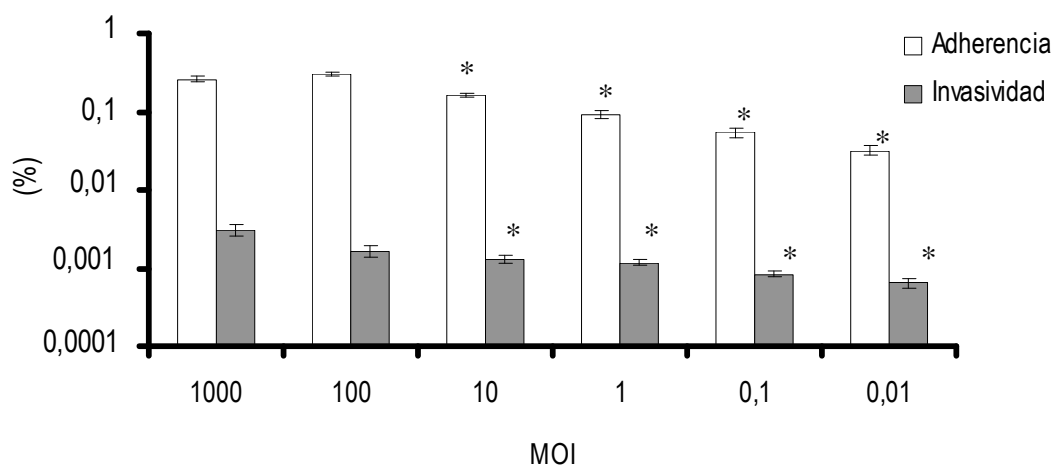
Para la selección de los tiempos de incubación a emplear en este estudio se tomaron en cuenta como referencia, además de lo anteriormente mencionado, los valores medios del tiempo de tránsito intestinal en pollos. A pesar de que dicho tiempo depende de muchas variables, tales como la edad (Petersen *et al.*, 1999), la temperatura ambiental (Gordon y Roland, 1997), la viscosidad de la dieta y la complementación del alimento con enzimas (Almirall y Esteve-García, 1994; Wang *et al.*, 1992), se ha visto que el promedio se encuentra entre los  $155,6 \pm 16,1$  min en pollos de 14 días de crecimiento y los  $175,0 \pm 44,5$  min en los de 26 días (Juarez Estrada *et al.*, 2007).

Se debe mencionar que se se evitó el empleo de tiempos de incubación mayores a 5 h, ya que se ha determinado que *Campylobacter* spp. tiene un período limitado de vida dentro de la vacuola de las células eucariotas (De Melo *et al.*, 1989).

Los resultados obtenidos muestran que tanto la adherencia como la invasividad no varían de manera significativa al emplear los diferentes tiempos de incubación seleccionados para este estudio ( $p > 0,05$ ). Debido a lo anterior y a la falta de homogeneidad en los protocolos recogidos en la bibliografía, se optó por emplear en adelante períodos de incubación de 1 h, ya que permiten reducir el tiempo del estudio y obtener valores de adherencia e invasividad similares a los logrados utilizando lapsos mayores de tiempo. En estudios similares que realizamos con otras cepas de *Campylobacter* se obtuvieron resultados semejantes (datos no mostrados), permitiéndose por todo ello admitir que en las condiciones utilizadas en los estudios de adherencia e invasión a células Caco-2, 1 h es un tiempo suficiente para lograr la adherencia máxima de *Campylobacter* a las monocapas celulares.

### 2.3.2. Influencia de la concentración del inóculo de *Campylobacter* en ensayos de adherencia e invasividad

Otra variable fundamental a tomar en cuenta a la hora de realizar estudios de adherencia e invasividad, es la relación existente entre la concentración del inóculo bacteriano utilizado y la densidad celular de los cultivos celulares, variable denominada comúnmente MOI (de sus siglas en inglés "Multiplicity of Infection"). Con el fin de homogeneizar el MOI a utilizar en los estudios posteriores, se estudió la adherencia de *Campylobacter* a células de Caco-2 usando diferentes concentraciones de inóculo bacteriano (Figura 2.2.).



**Figura 2.2.** Adherencia e invasividad de *C. jejuni* LP1 a cultivos de células epiteliales Caco-2 empleando diferentes MOI (1000; 100; 10; 1; 0,1; y 0,01). Resultados expresados como la media del % de adherencia o invasividad con respecto al inóculo  $\pm$  la desviación estándar para N=2, n=2. (\*) Significativamente diferente con respecto al MOI inmediatamente superior ( $p \leq 0,05$ ).

Los resultados muestran que los niveles de adherencia e invasividad aumentan significativamente ( $p \leq 0,05$ ) y de manera proporcional a la concentración del inóculo microbiano empleado hasta alcanzar un MOI de 100. Resultados similares se han descritos en estudios previos en los que se ha visto que la invasividad de *C. upsaliensis* a cultivos celulares aumenta de manera gradual a medida que se incrementa la concentración de inóculo empleada (Mooney *et al.*, 2003). En nuestras condiciones experimentales, cuando se alcanza un MOI de 100, parece ocurrir una saturación de la superficie de las células epiteliales, por lo cual, al aumentar el inóculo bacteriano, no se observa un incremento en el número de bacterias adheridas o invasoras. Debido a esto, se determinó emplear un

MOI de 100 para los estudios subsiguientes. Resultados similares se obtuvieron para el resto de las cepas utilizadas en este estudio (datos no mostrados).

Varios autores han propuesto diferentes MOI para lograr niveles de adherencia e invasividad óptimos con *Campylobacter* en diferentes tipos de cultivos celulares, los cuales varían entre 20 y 2000 (Friis *et al.*, 2005; Batchelor *et al.*, 2004; Mooney *et al.*, 2003; Hu y Kopecko, 1999). Es probable que el alto nivel de variabilidad entre los resultados obtenidos por los distintos autores se deba a las diferencias entre las cepas bacterianas empleadas, las líneas celulares y las condiciones experimentales.

Además de esto, se han descrito diferencias de invasividad al emplear una única línea celular y la misma cepa de *Campylobacter* en diferentes laboratorios, debidas posiblemente a la alta variabilidad genética que existe entre cepas (Karlyshev *et al.*, 2004; Wassenaar *et al.*, 1991), que han sido atribuidas a la existencia de secuencias hipervariables en su genoma (Parkhill *et al.*, 2000).

### **2.3.3. Influencia del pH en ensayos de adherencia e invasividad de *Campylobacter***

A lo largo de su tránsito intestinal, tanto en pollos como en humanos, *C. jejuni*, debe enfrentarse a distintos niveles de pH, característica que podría resultar decisiva en el proceso de colonización.

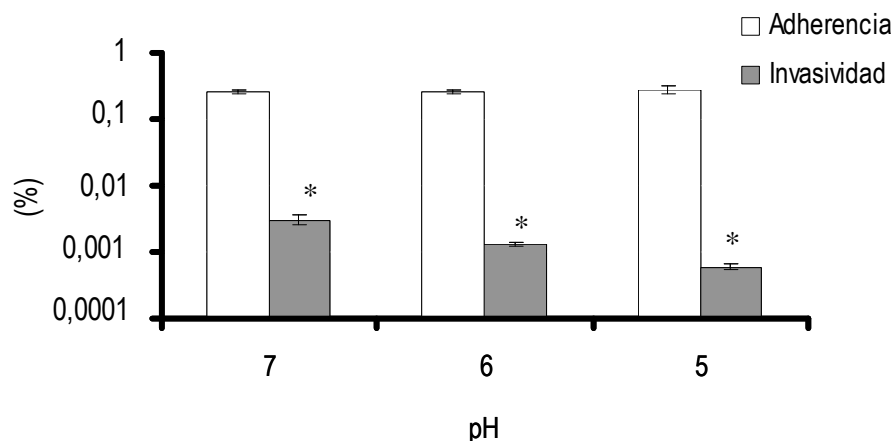
En la actualidad existen pocas referencias bibliográficas acerca de los mecanismos que emplea este patógeno para sobrevivir al tránsito a través del estómago en su camino hacia los intestinos, aunque recientemente se ha demostrado que *Campylobacter* se encuentra equipado genéticamente para detectar y responder ante los descensos bruscos de pH (Reid *et al.*, 2008).

Con anterioridad se ha relacionado el pH del medio con la capacidad de adherencia de diversos patógenos. Se ha visto, por ejemplo, que el pH ácido estimula la adherencia de *Streptococcus pneumoniae* a células epiteliales del tracto respiratorio humano (Ishizuka *et al.*, 2001) y del patógeno *Helicobacter pylori*, estrechamente relacionado con *Campylobacter* (Maddocks, 1990), a tejidos gástricos (Cortéis-Theulaz *et al.*, 1996).

Después de demostrar que la viabilidad de las células Caco-2 y de *C. jejuni* LP1 no se ve afectada por la exposición a diferentes pH (pH 5, 6 y 7) durante el período de tiempo utilizado en

nuestro estudio (Tabla A.2.), se determinó el efecto de este parámetro sobre la adherencia e invasividad de *C. jejuni* LP1 a células de Caco-2 (Figura 2.3.).

En los resultados obtenidos se observa que la invasividad se reduce significativamente ( $p > 0,05$ ) y de manera progresiva a medida que disminuye el pH del medio de cultivo de 5 a 7, aunque la adherencia no varía significativamente entre los rangos de pH estudiados. Se decidió, por tanto, utilizar un pH 7 en el trabajo experimental, con el fin de maximizar la capacidad de invasividad.



**Figura 2.3.** Adherencia e invasividad de *C. jejuni* LP1 a cultivos de células epiteliales Caco-2 a diferentes pH (5, 6 y 7). Resultados expresados como la media del % de adherencia o invasividad con respecto al inóculo  $\pm$  la desviación estándar para  $N=2$ ,  $n=2$ . (\*) Significativamente diferente con respecto al pH inmediatamente superior ( $p \leq 0,05$ ).

En la Tabla A.3. se establece una relación entre los valores medios del pH de diferentes secciones del tracto gastrointestinal de pollos, y la capacidad de colonización de *C. jejuni* descrita para cada una de dichas secciones. En dicha tabla se observa que la mayor capacidad de colonización en intestinos de pollos se logra en las regiones de mayor pH, lo que sugiere una influencia directa de este parámetro sobre la capacidad de adherencia y/o colonización del patógeno.

En estudios previos se ha determinado que el pH del tracto intestinal del pollo es más bajo que el de humanos, lo que ha sido relacionado con las diferencias en los niveles de virulencia observados en ambos casos (Denbow, 2000)

Por otra parte, Szymanski y colaboradores (1995) vieron que a pH inferiores a 5 disminuye notablemente la motilidad de *C. jejuni*. A pesar de que se ha descrito previamente que esta propiedad se debe a la presencia de uno o dos flagelos polares, se ha observado que a dichos niveles de acidez

la estructura flagelar permanece intacta y que al incrementarse nuevamente el pH recobra su función motil, por lo que se intuye que la disminución en la motilidad no es debida a una depolimerización flagelar. Se ha demostrado también que la disminución de la motilidad de *Campylobacter* afecta su capacidad de adherirse e invadir epitelios celulares, y aunque los mecanismos no se conocen, se cree que la motilidad facilita el contacto necesario entre la célula epitelial y la bacteria para lograr su posterior internalización (Szymanski *et al.*, 1995).

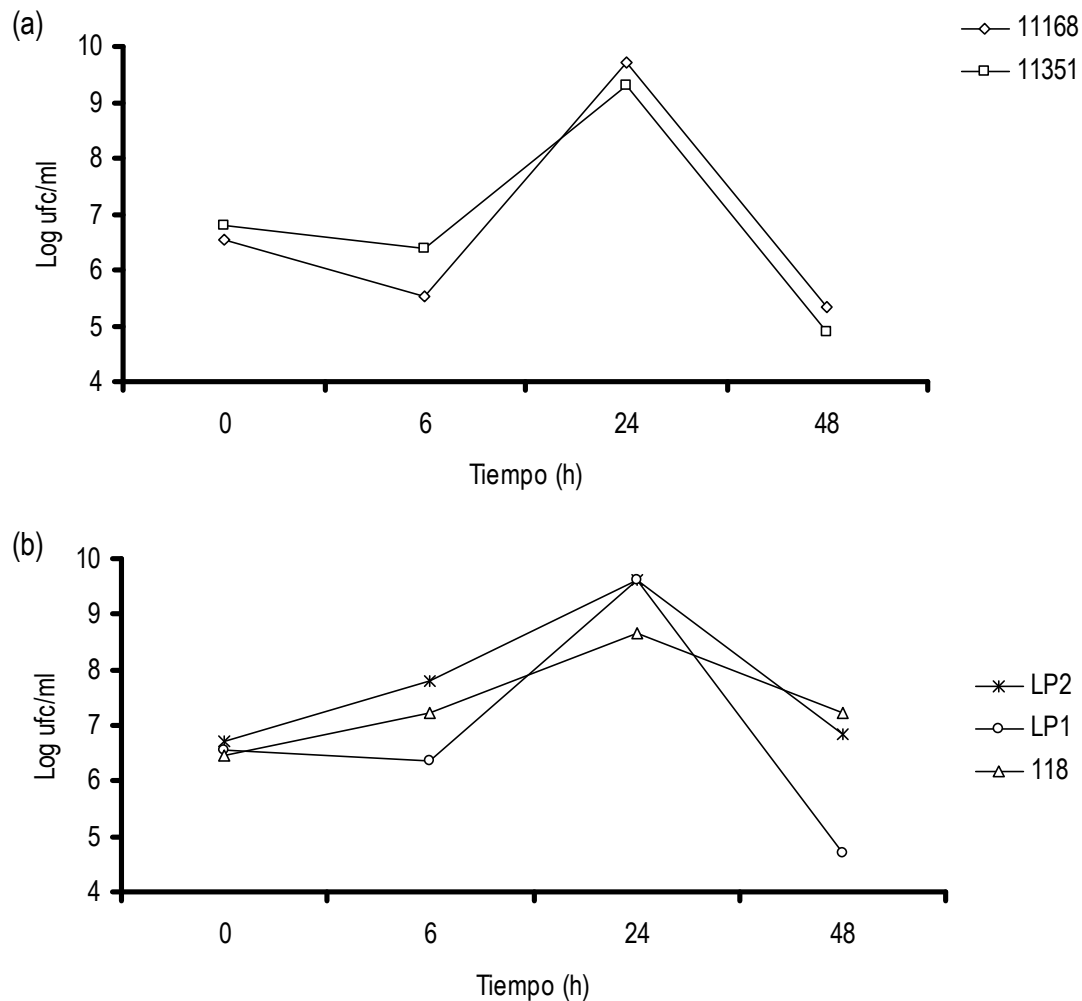
Se ha propuesto que la disminución de la actividad flagelar a pH bajo puede ser responsable de que, a pesar de que *Campylobacter* sobrevive en ambientes ácidos como el del estómago, no sea capaz de iniciar un proceso infeccioso en este tipo de entornos (Szymanski *et al.*, 1995). También se ha demostrado la implicación del flagelo y la motilidad en la iniciación del proceso de invasividad de *Campylobacter* a las células epiteliales (Grant *et al.*, 1993; Wassenaar *et al.*, 1993).

A pesar de que en un principio se pensaba que el flagelo podía actuar como adhesina, en estudios realizados con mutantes flagelares se ha visto que esta estructura no es responsable de la adhesión de *Campylobacter* spp. a células epiteliales (Wassenaar *et al.*, 1993). De hecho, en nuestros experimentos se ha podido comprobar que la adherencia de *Campylobacter* a las células Caco-2 no se ve afectada significativamente con la disminución del pH. Sin embargo, se ha observado que el flagelo podría intervenir en el proceso de invasividad de este patógeno, mediando la unión inicial y permitiendo a otras adhesinas establecer las uniones irreversibles requeridas para la invasividad (Szymanski *et al.*, 1995; Grant *et al.*, 1993; McSweeney y Walker, 1986). Los resultados del presente trabajo muestran una disminución en la capacidad de invasión de *Campylobacter* spp. a medida que baja el nivel de pH.

#### **2.3.4. Estudio de la fisiología de crecimiento de *Campylobacter***

La determinación de los patrones de crecimiento de los microorganismos es uno de los primeros pasos en casi cualquier estudio microbiológico, ya que permite determinar el comportamiento del microorganismo a lo largo de un tiempo determinado y bajo las condiciones específicas en las que se llevan a cabo los ensayos. Se estudiaron durante 48 h las curvas de crecimiento de las 5 cepas de *Campylobacter* spp. empleadas a lo largo de este trabajo: *C. jejuni* NCTC 11351, *C. jejuni* NCTC 1116 (ambas procedentes de colecciones internacionales), *C. jejuni* LP1 y *C. jejuni* 118, y *C. coli* LP2 (provenientes de aislados clínicos) (Figura 2.4.).

Los resultados muestran una primera etapa de crecimiento en la que las distintas cepas estudiadas presentan poblaciones iniciales cercanas a las  $10^7$  ufc/mL. La fase exponencial abarca aproximadamente desde las 6 h a las 24 h, punto en el que las cepas alcanzan poblaciones máximas cercanas a las  $10^{10}$  ufc/mL. Una vez llegado este momento, los microorganismos entran en la fase estacionaria y las curvas de crecimiento varían según la cepa de *Campylobacter*.



**Figura 2.4.** Curvas de crecimiento de las cepas de colección *C. jejuni* 11168 y 11351 (a), y de los aislados clínicos *C. coli* LP2, *C. jejuni* LP1 y *C. jejuni* 118 (b). Resultados expresados como la media de Log ufc/mL  $\pm$  la desviación estándar para N=2, n=2.

En el caso de las cepas provenientes de la colección NCTC (*C. jejuni* NCTC 11351 y *C. jejuni* NCTC 11168) y de *C. jejuni* LP1, a partir de las 24 h se presenta un período en que la viabilidad disminuye de manera drástica, hasta alcanzar las  $10^5$  ufc/mL a las 48 h, sin registrarse diferencias significativas entre las cepas ( $p > 0,05$ ). Esta disminución en la viabilidad es debida probablemente a la



acumulación de metabolitos tóxicos y al agotamiento de nutrientes en el medio. Resultados similares se han obtenido con anterioridad (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2004; Kelly *et al.*, 2003) para las cepas 11168 y 11351, trabajando en condiciones similares a las utilizadas en el presente trabajo, lo que demuestra una vez más la sensibilidad de estas cepas ante las condiciones de estrés propias de la fase estacionaria.

A diferencia de las cepas anteriores, *C. jejuni* 118 y *C. coli* LP2 parecen ser más resistentes ante la entrada en fase estacionaria, ya que sus poblaciones experimentaron menores reducciones entre las 24 h y las 48 h, con poblaciones finales cercanas a las  $10^7$  ufc/mL.

Para la mayor parte de las bacterias, cuando se alcanza la fase estacionaria se activan una serie de respuestas genéticamente reguladas, cuya finalidad es aumentar la resistencia del microorganismo ante condiciones de estrés. En *E. coli*, por ejemplo, la respuesta general al estrés está controlada por el factor sigma  $\sigma_s$ , un producto del gen *rpoS*, que controla la expresión de más de 50 genes. De manera similar, se han encontrado ortólogos a *rpoS* en muchas otras bacterias Gram negativas (Hengge-Aronis, 2000). A pesar de esto, *Campylobacter* carece de  $\sigma_s$  o cualquier otro factor sigma asociado con la adaptación a la fase estacionaria (Park, 2002).

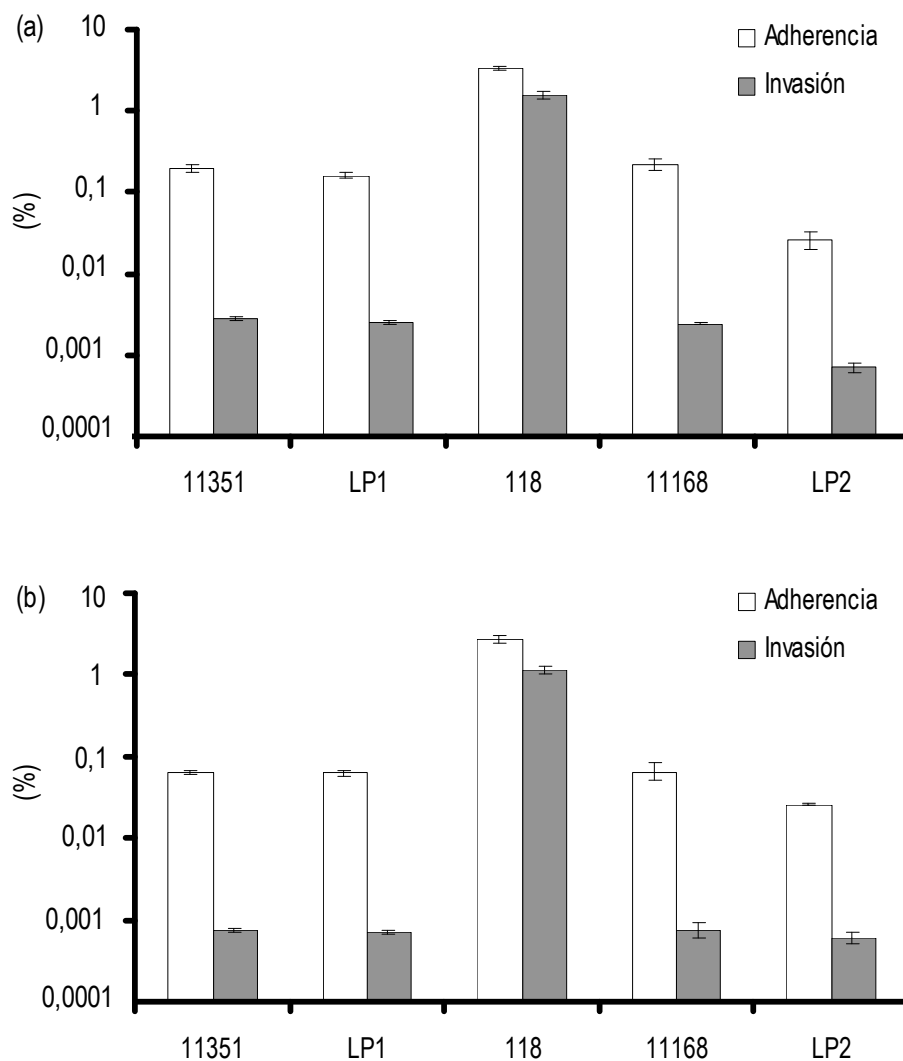
Sin embargo, se ha descrito que en ausencia de otros mecanismos de adaptación al estrés, se pueden generar cambios fisiológicos y producir nuevas cepas con fenotipos modificados, como vías alternativas para sobrevivir ante situaciones estresantes en la llegada a la fase estacionaria en los microorganismos con capacidad limitada para la regulación y adaptación genéticas al ambiente, como ocurre en el caso de *Campylobacter* (Martínez-Rodríguez y Mackey, 2005; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos en este trabajo no permiten relacionar con los datos disponibles la capacidad de adaptación al estrés producido durante la fase estacionaria con el origen de la cepa de *Campylobacter* empleada.

### **2.3.5. Adherencia e invasividad de *Campylobacter* en fase exponencial y estacionaria a células Caco-2**

Debido a las diferencias observadas en los patrones de crecimiento entre las diferentes cepas de *Campylobacter* estudiadas, se determinaron los perfiles de adherencia e invasividad de los aislados

clínicos y de las cepas de colección tanto en fase exponencial (18 h de crecimiento) como en fase estacionaria (40 h) (Figura 2.5.). Antes de llevar a cabo estos ensayos, se determinó la influencia de las condiciones de incubación empleadas en las pruebas de adherencia e invasividad (5% de CO<sub>2</sub> durante 1 ó 3 h, respectivamente) sobre las cepas de *Campylobacter* estudiadas, confirmándose además que la viabilidad de éstas no varía con respecto a la observada bajo condiciones convencionales de incubación (microaerofilia) (Tabla A.1.).



**Figura 2.5.** Adherencia e invasividad de las cepas *C. jejuni* 11168, 11351, LP1, 118, y *C. coli* LP2 en (a) fase exponencial (18 h de crecimiento) y en (b) fase estacionaria (40 h de crecimiento) a cultivos de células epiteliales Caco-2. Resultados expresados como la media del % de adherencia o invasividad con respecto al inóculo  $\pm$  la desviación estándar para N=3, n=2.

Para los ensayos de invasividad se emplearon las concentraciones mínimas de GTM necesarias para inhibir completamente el crecimiento de las bacterias extracelulares, determinadas en los ensayos de optimización, cuyos resultados se encuentran en la Tabla A.4.

En los experimentos en que se utilizaron cultivos en fase exponencial, los niveles de adherencia e invasividad de las células Caco-2 fueron significativamente mayores para *C. jejuni* 118 que para el resto de las cepas estudiadas. Las otras tres cepas de *C. jejuni* (11351, LP1 y 11168) presentaron menores valores. La cepa con menor capacidad para adherirse e invadir las células Caco-2 fue *C. coli* LP2.

En el estudio llevado a cabo en fase estacionaria, nuevamente *C. jejuni* 118 tuvo los mayores niveles de adherencia e invasividad, sin presentar diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) con respecto a los resultados obtenidos en la fase exponencial. De manera similar, el comportamiento de LP2 no resultó significativamente distinto ( $p > 0,05$ ) al observado en fase exponencial, siendo la cepa de menor adherencia e invasividad entre las estudiadas.

Las cepas restantes (11351, LP1 y 11168) se comportaron de manera similar entre sí y presentaron una disminución significativa en su capacidad de adherencia e invasividad con respecto a la registrada en fase exponencial. Estos resultados, junto con los obtenidos en el estudio de la tolerancia al estrés en fase estacionaria de crecimiento (Figura 2.4.), parecen indicar que estas cepas son más sensibles a las condiciones de estrés presentes en la fase estacionaria, lo que podría afectar su capacidad para adherirse e invadir las células Caco-2. Por el contrario, tal como se observa en la Figura 2.4., las cepas LP2 y 118 parecen poseer mecanismos más efectivos para controlar el estrés, lo que podría influenciar su capacidad de adherencia e invasividad durante la fase estacionaria.

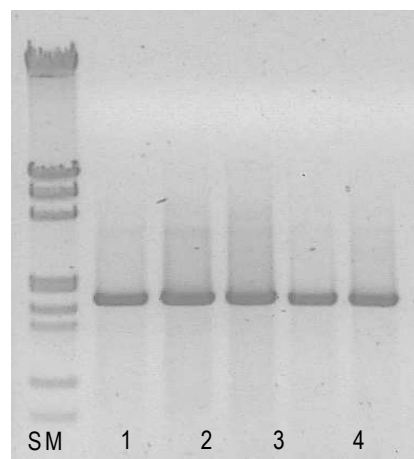
A pesar de la gran importancia que tiene la fase estacionaria para la supervivencia de *Campylobacter* en el ambiente y en los alimentos, la mayoría de los estudios previos sobre la capacidad de adherencia e invasividad de *Campylobacter* a células Caco-2 no han tomado en cuenta el efecto de la fase de crecimiento sobre estos parámetros. En este sentido, únicamente se ha publicado un estudio en el que se analiza la relación entre la exposición al estrés ambiental y la capacidad de adherencia e invasividad de *Campylobacter*. En el mismo, se observó que la carencia de nutrientes afecta de manera significativa la adherencia e invasividad de las cepas de *C. jejuni* estudiadas, aunque se vió que el estrés oxidativo no ejerce el mismo efecto (Mihaljevic *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la adherencia e invasividad a células Caco-2 dependen directamente de las características de la cepa de *Campylobacter* utilizada, las cuales pueden ser o no modificadas con la fase de crecimiento, en dependencia de la capacidad de la cepa para soportar situaciones de estrés e independientemente de su virulencia en fase exponencial.

### 2.3.6. Estudio de la presencia del gen *flaA*

Los resultados anteriores parecen indicar que las diferencias en la tasa de adherencia e invasividad entre las distintas cepas de *Campylobacter* se deben a factores que van más allá del origen de la cepa. Debido a esto, se estudió la presencia de algunos genes que determinan la expresión de diferentes factores de virulencia y que se han relacionado con los procesos de adherencia e invasividad de este patógeno.

El factor de virulencia más estudiado en *Campylobacter* es la flagelina, codificada, entre otros, por el gen *flaA* (Wassenaar *et al.*, 1991). Es por ello que se estudió la presencia de este gen en las diferentes cepas de *Campylobacter* empleadas en este estudio (Figura 2.6.). Con tal fin, se extrajo el ADN cromosómico de cada una de las cepas y se analizó la presencia del gen mediante PCR.



**Figura 2.6.** Estudio de la presencia del gen *flaA* por medio de la extracción del ADN cromosómico, amplificación por PCR y migración en gel de agarosa. (SM) marcador molecular, (1) *C. jejuni* LP1, (2) *C. coli* LP2, (3) *C. jejuni* 118, (4) *C. jejuni* NCTC 11168, (5) *C. jejuni* NCTC 11351.

Los resultados muestran que el gen *flaA* está presente en todas las cepas estudiadas, independientemente de su origen y de su capacidad de adherencia e invasividad, por lo que debe

admitirse que las diferencias en la tasa de adherencia encontradas entre ellas no se podrían relacionar directamente con la ausencia del gen en ninguna de las cepas.

En numerosos estudios se ha enfatizado la importancia del flagelo en la infectividad de *Campylobacter* spp. (Aguero-Rosenfeld *et al.*, 1990; Ueki *et al.*, 1987; Newell *et al.*, 1985). Además de su papel como coadyuvante en el proceso de tropismo hacia los tejidos eucariotas y en el transporte hacia las células epiteliales a través de la capa mucosa (Szimanski *et al.*, 1995), tal como se ha indicado con antelación, se cree que el flagelo puede tener otras funciones en el proceso de patogénesis, actuando como iniciador en el proceso de invasividad de la bacteria a las células epiteliales (Grant *et al.*, 1993; Wassenaar *et al.*, 1993).

### **2.3.7. Comparación de digestiones enzimáticas del gen *flaA***

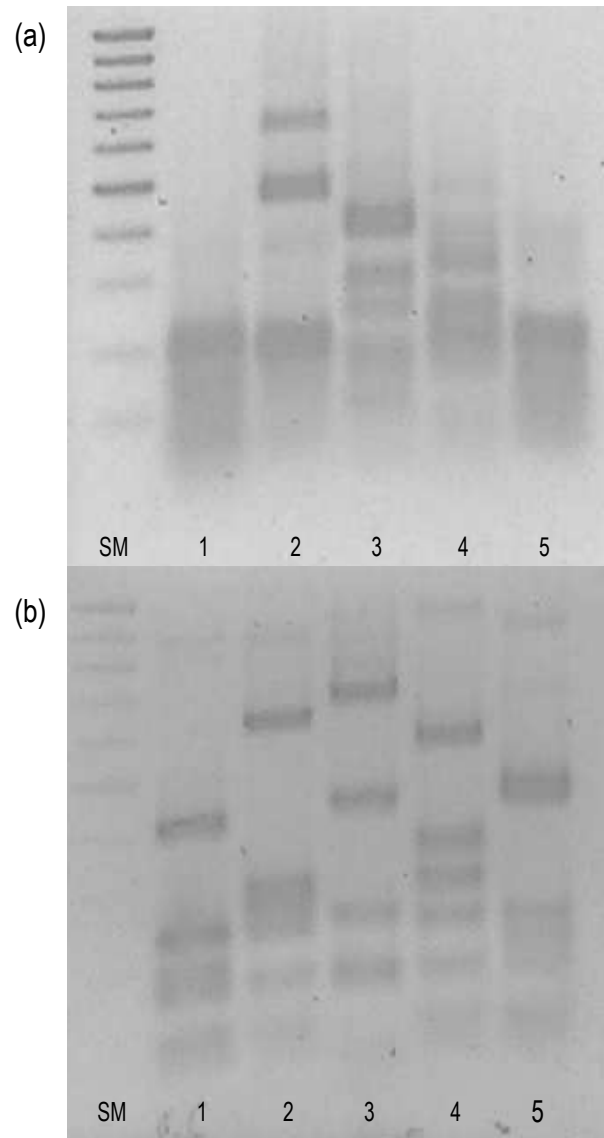
Se ha descrito que los distintos alelos de *flaA* se pueden diferenciar mediante la comparación de los fragmentos obtenidos después de su digestión con enzimas de restricción específicas (Wassenaar y Newell, 2000). Basándose en lo anterior, se compararon los alelos del gen *flaA* de las especies de *Campylobacter* estudiadas, empleando las enzimas *AluI* y *DdeI* (Figura 2.7.).

Se observó que en el caso de la restricción realizada empleando la enzima *AluI*, las cepas LP1 y 11351 tuvieron un patrón indistinguible entre ellas. Sin embargo, mediante la digestión con la enzima *DdeI* se observaron diferencias entre los alelos de ambas cepas. Los diferentes patrones de bandas para cada cepa y enzima empleadas sugieren que todas las cepas presentan distintos alelos para el gen *flaA*, lo que podría explicar al menos en parte las diferencias en sus niveles de adherencia e invasividad.

La idoneidad del gen *flaA* para ser empleado en este tipo de pruebas radica principalmente en que, además de estar relacionado con la patogenicidad de *Campylobacter*, posee tanto regiones altamente conservadas, como variables (Meinersmann *et al.*, 1997).

Se ha visto además, que el análisis de restricción del gen *flaA* con la enzima *DdeI* podría ser una herramienta útil para estudios epidemiológicos, ya que permite clasificar diferentes cepas de *Campylobacter* spp. según su origen, debido a que las especies más relacionadas entre sí parecen tener un mayor grado de semejanza en el patrón de ruptura al ser digeridos con dicha enzima (Ayling *et al.*, 1996). La digestión del gen *flaA* utilizando ambas enzimas, *AluI* y *DdeI*, se ha utilizado

principalmente como medio para discriminar el origen de distintas cepas de *Campylobacter* spp. (Hald *et al.*, 2001; Petersen y Newell, 2001; Petersen y Wedderkopp, 2001; Nielsen *et al.*, 2000).



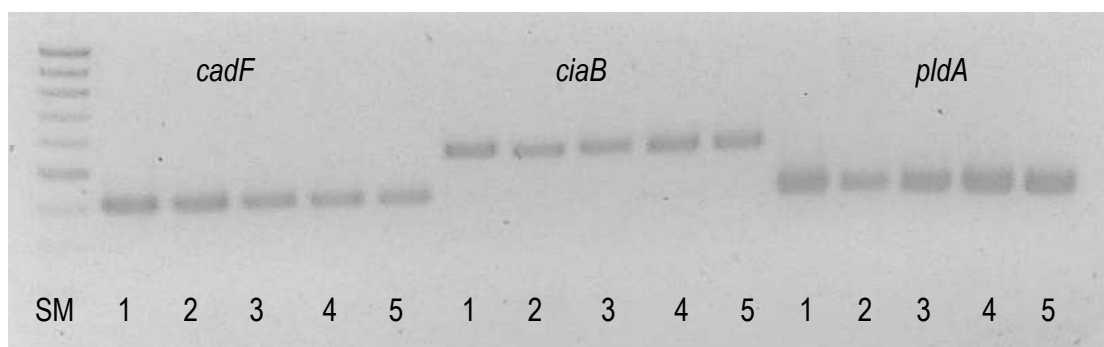
**Figura 2.7.** Digestión enzimática del gen *flaA*. (a) enzima *AluI*, (b) enzima *DdeI*, (SM) marcador molecular, (1) *C. jejuni* LP1, (2) *C. coli* LP2, (3) *C. jejuni* 118, (4) *C. jejuni* NCTC 11168, (5) *C. jejuni* NCTC 11351.

### 2.3.8. Estudio de la presencia de los genes *cadF*, *ciaB* y *pldA*

Además de *flaA*, otros genes como *cadF*, *ciaB* y *pldA*, se han relacionado con la capacidad de adherencia e invasividad de *Campylobacter* spp. Al igual que se hizo en el caso de *flaA*, se estudió la presencia de los genes anteriores en las diferentes cepas de *Campylobacter* estudiadas (Figura 2.8.).

Los resultados obtenidos muestran que los tres genes estudiados (*cadF*, *ciaB* y *pldA*) se encuentran presentes en las cinco cepas del patógeno, lo que indica que, al igual que ocurre con el gen *flaA*, las diferencias en la tasa de adherencia encontradas entre las distintas cepas de *Campylobacter* spp. no parecen ser debidas a la ausencia del gen en ninguna de ellas.

Como se ha mencionado, se sabe que los tres genes estudiados en este apartado participan en los procesos de adherencia e invasividad de *Campylobacter* spp. En este sentido se ha visto que el gen *ciaB* se ha asociado con la invasión celular, ya que codifica para la secreción de una proteína necesaria para la invasión de las células epiteliales (Rivera-Amill *et al.*, 2001).



**Figura 2.8.** Estudio de la presencia de los genes *cadF*, *ciaB* y *pldA* por medio de la extracción del ADN cromosómico, amplificación por PCR y migración en gel de agarosa. (SM) marcador molecular, (1) *C. jejuni* LP1, (2) *C. coli* LP2, (3) *C. jejuni* 118, (4) *C. jejuni* NCTC 11168, (5) *C. jejuni* NCTC 11351.

El gen *cadF*, por su parte, codifica para una proteína que interactúa con la matriz proteica de fibronectina del hospedador y es necesaria para la colonización de la superficie celular (Monteville *et al.*, 2003). De manera similar, el gen *pldA*, también relacionado con la invasión, codifica para una proteína con actividad fosfolipasa, enzima que hidroliza los fosfolípidos de la membrana celular del hospedador, ocasionando su lisis (Zhu *et al.*, 2006; Ziprin *et al.*, 2001, Grant *et al.*, 1997).

### 2.3.9. Secuenciación de los genes *flaA*, *cadF*, *ciaB* y *pldA*

En los apartados anteriores no se encontró una relación entre la presencia/ausencia de los genes estudiados y la capacidad de adherencia e invasividad de las distintas cepas de *Campylobacter* spp. Por otra parte, las reestricciones enzimáticas del gen *flaA* resultaron útiles para poder diferenciar

distintos patrones de bandas para cada cepa. Estos resultados permiten admitir como hipótesis que, a pesar de que los cuatro genes que codifican para los factores de virulencia están presentes en todas las cepas estudiadas, es posible que existan diferencias en las secuencias de dichos genes.

Basándose en lo anterior, se llevó a cabo la secuenciación del fragmento de cada gen y la comparación entre las distintas cepas por medio de la determinación del porcentaje de homología entre los alelos de dichos genes, el cual indica el grado de identidad que presentan entre sí los diferentes alelos de un mismo gen (Tabla 2.2.). Las secuencias de los genes para cada cepa se encuentran especificadas en las Figuras A.1.-A.4.

**Tabla 2.2.** % de identidad entre secuencias de los genes *flaA*, *ciaB*, *cadA*, *pldA* entre las cepas *C. jejuni* NCTC 11168, *C. jejuni* NCTC 11351, *C. jejuni* LP1, *C. coli* LP2 y *C. jejuni* 118.

Gen	Cepa	Cepa			
		11168	11351	LP1	LP2
<i>flaA</i>	118	85	85	84	85
	LP2	96	98	97	-
	LP1	97	97	-	-
	11351	96	-	-	-
<i>cadF</i>	118	100	98	99	87
	LP2	87	87	86	-
	LP1	99	98	-	-
	11351	98	-	-	-
<i>pldA</i>	118	100	99	99	100
	LP2	100	99	99	-
	LP1	99	99	-	-
	11351	99	-	-	-
<i>ciaB</i>	118	100	98	99	77
	LP2	77	77	77	-
	LP1	99	98	-	-
	11351	98	-	-	-

La comparación de las secuencias del gen *flaA* confirmó los resultados obtenidos mediante la digestión con las enzimas *AluI* y *DdeI*, es decir, las cepas analizadas presentan distintos alelos para el fragmento analizado de *flaA*. Al realizar la comparación de las secuencias obtenidas con las incluidas en las bases de datos, se determinó que la cepa LP1 presenta el alelo 233, la cepa LP2 el alelo 67, la cepa 118 el alelo 190, la cepa 11168 el alelo 285 y finalmente, la cepa 11351 el alelo 156 del locus *flaA*



A pesar de que hasta la fecha se han descrito 1120 alelos diferentes para el gen *flaA* de *Campylobacter*, que a su vez codifican para 287 flagelinas diferentes, todavía no se conoce la variabilidad que presentan los distintos alelos de los genes *ciaB*, *cadF*, y *pldA* en esta especie. En los resultados obtenidos se observó que cada uno de estos loci estudiados presenta diferentes alelos. Los loci *ciaB* y *cadF* tienen cuatro alelos diferentes, cada uno de los cuales se encuentra compartido por las cepas 118 y 11168. En el caso del locus *pldA*, únicamente se encontraron 3 alelos distintos entre las cepas estudiadas, presentando las cepas LP2, 118 y 11168 el mismo alelo para este locus.

A partir de las secuencias obtenidas, se estableció el porcentaje de identidad entre diferentes alelos de un mismo locus. Se observó que para el locus *flaA* todas las cepas, a excepción de 118, presentaron un alto grado de identidad entre sí (96-98%). Sin embargo, el locus *flaA* de la cepa 118 sólo compartió un 84-85% de identidad con el resto de las cepas analizadas en este estudio. Resultados similares se registraron en la cepa LP2 para los loci *ciaB* y *cadF*. Los loci *ciaB* y *cadF* de LP2 presentaron únicamente 77 ó 86-87% de identidad, respectivamente, mientras que dichos loci presentaron un alto nivel de identidad (98-100%) en el resto de las cepas analizadas (11168, 11351, LP1 y 118).

Los resultados obtenidos en este apartado se pueden relacionar con el comportamiento observado frente a la adherencia e invasividad de las células epiteliales Caco-2 descritos en el apartado anterior. Las cepas 11168, 11351 y LP1 presentaron un patrón similar de adherencia e invasividad, mientras que 118 y LP2, se comportaron de manera diferente, correspondiendo la cepa 118 a la más adherente e invasora y LP2 a la de menor adherencia e invasividad.

Las cepas 118 y 11168 comparten el mismo alelo para los loci *ciaB*, *cadF*, *ciaB*, *cadF* y *pldA*, y la única diferencia entre los genes estudiados correspondió al alelo del locus *flaA*. Lo anterior parece indicar que entre los factores de virulencia estudiados, la existencia de distintos alelos en el locus *flaA* sería la única diferencia que podría relacionarse, al menos en parte, con el comportamiento observado. Los resultados obtenidos podrían sugerir que la composición de la flagelina de la cepa 118, codificada por el alelo 190 del locus *flaA*, podría influir de manera positiva en la virulencia de esta cepa, incrementando su capacidad de adherencia e invasividad, sin que esta propiedad se vea significativamente afectada por la fase estacionaria de crecimiento.

Del mismo modo, los resultados obtenidos excluyen a las proteínas codificadas por los genes *ciaB*, *cadF* y *pldA*, como factores implicados en la diferente adherencia e invasividad mostrada por las cepas 118 y 11168, a pesar de que el alelo 67 del locus *flaA* podría estar involucrado en la disminución

de las capacidades de adherencia e invasividad de la cepa LP2. A pesar de esto, la posibilidad de que los alelos presentes en los loci *ciaB*, *cadF* y *pldA* de la cepa LP2 pudieran estar relacionados con dicha disminución, tampoco debe ser descartada. Además, otros genes o factores de virulencia no estudiados en este trabajo podrían también contribuir a las diferencias observadas.

A pesar de que muchos genes relacionados con la patogenicidad de *C. jejuni* han sido descritos, la relación entre éstos y el origen de cepas no está todavía claro. En este sentido, Datta *et al.* (2003) estudiaron la presencia de genes relacionados con la patogenicidad en 111 aislamientos de muestras clínicas humanas, carne de pollo y heces de pollo y de ternera. En el caso de los genes *flaA*, *cadF*, *pldA* y *ciaB* no se observaron diferencias significativas en cuanto al origen del microorganismo.

De manera similar, en otro estudio se seleccionaron, entre otros marcadores genéticos, los genes *flaA* y *cadF* como responsables de la expresión de la adherencia, y los genes *ciaB* y *pldA* para la determinación de la expresión de la invasión. De entre 300 aislados de *C. jejuni* y *C. coli* obtenidos de pacientes con enteritis, los genes *flaA*, *cadF* y *pldA* se detectaron en el 100% de los casos, mientras que *ciaB* se observó en el 95%, no siendo posible establecer una relación entre el origen de la cepa y la presencia de los genes (Talukder *et al.*, 2008).

Por otra parte, Zheng *et al.* (2006) estudiaron la capacidad para adherirse e invadir células T84 de diferentes aislados de *C. jejuni* y *C. coli* obtenidos a partir de pollo, pavo, cerdo y ternera y las compararon con las del aislado clínico *C. jejuni* 81-176. Observaron que todos los aislados poseen *flaA*, *cadF*, *pldA* y que el 91% también contiene *ciaB*. Este último gen no se detectó en aquellas cepas de invasión pobre del epitelio intestinal. Se vio también que a pesar de presentar todos los genes de virulencia, no todos los aislados fueron capaces de invadir las células, probablemente debido a que existen otros genes implicados en el proceso.

En resumen, se puede decir que la capacidad de adherencia e invasividad de *Campylobacter* está estrechamente relacionada con la cepa empleada y se encuentra condicionada por múltiples factores, pudiendo verse afectada por los mecanismos de resistencia al estrés observados durante la fase estacionaria de crecimiento. De manera similar, la composición de la flagelina podría influir en la capacidad de adherencia e invasividad del patógeno.

## 2.4. CONCLUSIONES

La adherencia y la invasividad de *C. jejuni* LP1 a células Caco-2 no varían de manera significativa al emplear 1, 2, 3 y 4 h de incubación, por lo cual se determinó utilizar un período de 1 h en el protocolo experimental de incubación.

La adherencia e invasividad de *C. jejuni* LP1 a células Caco-2 aumentan de manera proporcional a la concentración del inóculo microbiano empleado hasta alcanzar un MOI de 100, punto en que ocurre la saturación de las células, según las condiciones experimentales utilizadas. Por ello se seleccionó emplear en adelante un MOI = 100 para el trabajo experimental.

A pesar de que la adherencia de *Campylobacter* no se ve afectada significativamente por valores de pH de 5, 6 y 7, la invasividad se reduce significativamente y de manera progresiva a medida que disminuye este parámetro, por lo que se eligió emplear pH =7.

La fisiología del crecimiento de las cepas clínicas LP2 y 118 es similar entre sí, mientras que las cepas de colección 11168 y 11351 y la cepa clínica LP1 se comportan de manera diferente de las anteriores pero semejante entre sí. Las cepas LP2 y 118 parecen ser más resistentes que las cepas restantes ante las condiciones de estrés propias de la entrada en fase estacionaria. Las cepas más resistentes ante condiciones de estrés (118 y LP2) presentan la misma capacidad de adherencia e invasión a células epiteliales en fase exponencial y estacionaria de crecimiento, mientras que la adherencia e invasividad de las cepas 11168, 11351 y LP1 disminuye con la entrada en fase estacionaria.

Las 5 cepas de *Campylobacter* estudiadas presentaron alelos idénticos para los loci *ciaB*, *cadF* y *pldA*, cuyos genes codifican para factores de virulencia. Sin embargo, el alelo *flaA* fue distinto en las cepas 118 y 11168, las cuales difieren del resto en cuanto a su capacidad de adherencia e invasividad. Estos resultados podrían demostrar que la composición de la flagelina podría estar relacionada con la capacidad de adherencia y/o de invasión a las células Caco-2 por parte de *Campylobacter*.

## 2.5. BIBLIOGRAFÍA

Agüero-Rosenfeld, M.E., Yang, X.H., Nachamkin, I. 1990. Infection of adult Syrian hamsters with flagellar variants of *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunology* 58: 2214-2219.

Almirall, M., Esteve-García, E. 1994. Rate of passage of barley diets with chromium oxide: Influence of age and poultry strain and effect of B-glucanase supplementation. *Poultry Science* 73: 1433-1440.

Ayling, R.D., Woodward, M.J., Evans, S., Newell, D.G. 1996. Restriction fragment length polymorphism of polymerase chain reaction products applied to the differentiation of poultry campylobacters for epidemiological investigations. *Research in Veterinary Science* 60: 168-172.

Batchelor, R.A., Pearson, B.M., Friis, L.M., Guerry, P., Wells, J.M. 2004. Nucleotide sequences and comparison of two large conjugative plasmids from different *Campylobacter* species. *Microbiology* 150: 3507-3515.

Cortés-Theulaz, I., Porta, N., Pringault, E., Racine, L., Bogdanova, A., Kraehenbuhl, J.P., Blum, A.L., Michetti, P. 1996. Adhesion of *Helicobacter pylori* to polarized T84 human intestinal cell monolayers is pH dependent. *Infection and Immunity* 64: 3827-3832.

Datta, S., Niwa, H., Itoh, K. 2003. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. *Journal of Medical Microbiology* 52: 345-348.

De Melo, M. A., Gabbiani, G., Pechere, J.C. 1989. Cellular events and intracellular survival of *Campylobacter jejuni* during infection of Hep-2 cells. *Infection and Immunology* 57: 2214-2222.

Denbow, D.M. 2000. Gastrointestinal anatomy and physiology. En: *Sturkie's Avian Physiology*. Whittow, C.G. (Ed). Academic Press. San Diego. P. 299-326.

Friis, L.M., Pin, C., Pearson, B.M., Wells, J.M. 2005. *In vitro* cell culture methods for investigating *Campylobacter* invasion mechanisms. *Journal of Microbiological Methods* 61: 145-160.

Gordon, R.W., Roland, D.A. 1997. The influence of environmental temperature on *in vivo* limestone solubilization, feed passage rate, and gastrointestinal pH in laying hens. *Poultry Science* 76: 683-688.

Grant, C.C.R., Konkel, M.E., Cieplak, W., Tompkins, L.S. 1993. Role of flagella in adherence, internalization, and translocation of *Campylobacter jejuni* in nonpolarized and polarized epithelial cell cultures. *Infection and Immunology* 61: 1764-1771.

Grant, K.A., Ubarretxena Belandia, I., Dekker, N., Richardson, P.T., Park, S.F. 1997. Molecular characterization of *pldA*, the structural gene for a phospholipase A from *Campylobacter coli*, and its contribution to cell-associated hemolysis. *Infection and immunity* 65: 1172-1180.

Hald, B., Knudsen, K., Lind, P., Madsen, M. 2001. Study of the infectivity of slaine-stored *Campylobacter jejuni* for day-old chicks. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2388-2392.

Hänel, I., Müller, J., Müller, W., Schulze, F. 2004. Correlation between invasion of Caco-2 eukaryotic cells and colonization ability in the chick gut in *Campylobacter jejuni*. *Veterinary Microbiology* 101: 75-82.

Hengge-Aronis, R. 2000. The general stress response in *Escherichia coli*. En: *Bacterial Stress Responses*. Storz, G., Hengge-Aronis, R. (Ed). ASM Press. Washington D.C., p. 161-178.

Hu, L., Kopecko, D.J. 1999. *Campylobacter jejuni* 81-176 associates with microtubules and dynein during invasion of human intestinal cells. *Infection and Immunology* 67: 4171-4182.

- Ishizuka, S., Yamaya, M., Suzuki, T., Nakayama, K., Kamanaka, M., Ida, S., Sekizawa, K., Sasaki, H. 2001. Effects on platelet-activating factor receptor expression on CHO cell motility. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 24: 459-468.
- Juarez Estrada, M.A., Nava Morales, G.M., Merino Guzmán, R. 2007. Anticoccidial vaccine effect on physiological and immunological parameters in broiler chickens. *Veterinaria México* 38: 303-318.
- Karlyshev, A.V., Everest, P., Linton, D., Cawthraw, S., Newell, D.G., Wren, B.W. 2004. The *Campylobacter jejuni* general glycosylation system is important for attachment to human epithelial cells and in the colonization of chicks. *Microbiology* 150: 1957-1964.
- Kelly, A.F., Martínez-Rodríguez, A., Bovil, R.A., Mackey, B.M. 2003. Description of a “Phoenix” phenomenon in the growth of *Campylobacter jejuni* at temperatures close to the minimum for growth. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4975-4978.
- Konkel, M.E., Mead, D.J., Hayes, S.F., Cieplak, J.W. 1992. Translocation of *Campylobacter jejuni* across human polarized epithelial cell monolayer cultures. *Journal of Infectious Diseases* 166: 308-315.
- Maddocks, A.C. 1990. *Helicobacter pylori* (formerly *Campylobacter pyloridis/pylori*) 1986-1989: a review *Journal of Clinical Pathology* 43: 353-356.
- Martinez-Rodriguez, A., Kelly, A.F., Park, S.F., Mackey, B.M. 2004. Emergence of variants with altered survival properties in stationary phase cultures of *Campylobacter jejuni*. *International Journal of Food Microbiology* 90: 321-329.
- Martínez-Rodríguez, A., Mackey, B.M. 2005. Physiological changes in *Campylobacter jejuni* on entry into stationary phase. *International Journal of Food Microbiology* 101: 1-8.
- McSweegan, E., Walker, R. 1986. Identification and characterization of two *Campylobacter jejuni* adhesins for cellular and mucous substrates *Infection and Immunity* 53: 141-148.
- Meinersmann, R.J., Hesel, L.O., Fields, P.I., Hiett, K.L. 1997. Discrimination of *Campylobacter jejuni* isolates by *fla* gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology* 35:2810-2814.
- Mihaljevic, R.R., Sikic, M., Klancnik, A., Brumini, G., Mozina, S.S., Abram, M. 2007. Environmental stress factors affecting survival and virulence of *Campylobacter jejuni*. *Microbial Pathogenesis* 43: 120-125.
- Monteville, M.R., Yoon, J.E., Konkel, M.E. 2003. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. *Microbiology* 149: 153-165.
- Mooney, A., Byrne, C., Clyne, M., Johnson-Henry, K., Sherman, P., Bourke, B. 2003. Invasion of human epithelial cells by *Campylobacter upsaliensis*. *Cellular Microbiology* 5: 835-847.
- Newell, D.G., McBride, H., Dolby, J.M. 1985. Investigations on the role of flagella in the colonization of infant mice with *Campylobacter jejuni* and attachment of *Campylobacter jejuni* to human epithelial cell lines. *Journal of Hygiene* 95: 217-227.
- Nielsen, E.M., Enberg, J., Fussing, V., Petersen, L., Brogren, C.H., On, S.L.W. 2000. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry and cattle. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 3800-3810.

Park, S.F. 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogen. *International Journal of Food Microbiology* 74: 177-188.

Parkhill, J., Wren, B.W., Mungall, K., Kettle, J.M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R.M., Felewell, T., Holroyds, S., Jagels, K., Karlyshev, A.V., Moule, S., Palen, M.J., Penn, C.W., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rutherford, K.M., van Vliet, A.H., Whitehead, S., Barrell, B.G. 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 403: 665-668.

Petersen, S.T., Wiseman, J., Bedford, M.R. 1999. Effects of age and diet on the viscosity of intestinal contents in broiler chicks. *British Journal of Poultry Science* 40: 364-370.

Petersen, L., Newell, D.G. 2001. The ability of fla-typing schemes to discriminate between strains of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Applied Microbiology* 91: 217-224.

Petersen, I., Wadderkopp, A. 2001. Evidence that certain clones of *Campylobacter jejuni* persist during successive broiler flock rotations. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2739-2745.

Reid, A.N., Pandey, R., Palyada, K., Naikare, H., Stintzi, A. 2008. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in the response to acidic pH and stomach transit. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 1583-1597.

Rivera-Amill, V., Kim, B.J., Seshu, J., Konkel, M.E. 2001. Secretion of the virulence-associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. *Journal of Infectious Diseases* 183: 1607-1616.

Russell, R.G., Blake, D.C. 1994. Cell association and invasion of Caco-2 cells by *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity* 62: 3773-3779.

Szymanski, C. M., King, M., Haardt, M., Armstrong, G.D. 1995. *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 cells. *Infection and Immunity* 63: 4295-4300.

Talukder, K.A., Aslam, M., Islam, Z., Azmi, I.J., Dutta, D.K., Hossain, S., Nur-E-Kamal, A., Nair, G.B., Cravioto, A., Sack, D.A., Endtz, H.P. 2008. Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. *Journal of Clinical Microbiology* 46: 1485-1488.

Ueki, Y., Umeda, A., Fujimoto, S., Mitsuyama, M., Amako, K. 1987. Protection against *Campylobacter jejuni* infection in suckling mice by anti-flagellar antibody. *Microbiology and Immunology* 31: 1161-1171.

Wang, L., Newman, R.K., Newman, C.W., Hofer, P.J. 1992. Barley B-Glucans alter intestinal viscosity and reduce plasma cholesterol concentrations in chicks. *Journal of Nutrition* 122: 2292-2297.

Wassenaar, T.M., Bleumink-Pluym, N.M., Van Der Zeijst, B.A. 1991. Inactivation of *Campylobacter jejuni* flagellin genes by homologous recombination demonstrates that *flaA* but not *flaB* is required for invasion. *The European Molecular Biology Organization Journal* 10: 2055-2061.

Wassenaar, T.M., Van Der Zeust, B.A.M., Ayling, R., Newell, D.G. 1993. Colonization of chicks by motility mutants of *Campylobacter jejuni* demonstrates the importance of flagellin A expression. *Journal of General Microbiology* 139: 1171-1175.

Wassenaar, T.M., Newell, D.G. 2000. Genotyping of *Campylobacter* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1-9.

Wright, J.A., Grant, A.J., Hurd, D., Harrison, M., Guccione, E.J., Kelly, D.J., Maskell, D.J. 2009. Metabolite and transcriptome analysis of *Campylobacter jejuni* *in vitro* growth reveals a stationary-phase physiological switch. *Microbiology* 155: 80-94.

Zheng, J., Jianghong, M., Shaohua, Z., Ruby, S., Wenxia, S. 2006. Adherence to and invasion of human intestinal epithelial cells by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from retail meat products. *Journal of Food Protection* 69: 768-774.

Zhu, J., Hua, X., Wu, Z., Yi, M. 2006. Molecular mechanisms of pathogenesis of *Campylobacter jejuni*. *Reviews in Medical Microbiology* 17: 39-43.

Ziprin, R.L., Young, C.R., Byrd, J.A., Stanker, L.H., Hume, M.E., Gray, S.A., Kim, B.J., Konkel, M.E. 2001. Role of *Campylobacter jejuni* potential virulence genes in cecal colonization. *Avian Diseases* 45: 549-557.

Los oligosacáridos pécticos (POS), se han propuesto como agentes reductores de la adherencia de algunos patógenos. En este trabajo se estudió el efecto de un extracto de POS obtenido a partir de cáscara de naranja sobre la adherencia e invasividad de *C. jejuni* a cultivos de Caco-2 con diferente grado de diferenciación celular. Se demostró que los POS son capaces de reducir la invasividad del patógeno en cultivos no diferenciados (ND) y diferenciados (DF), incluso a concentraciones de 0,005 mg/mL, tanto si se lleva a cabo una incubación previa de la bacteria con el extracto, como si ambos son inoculados simultáneamente a las células Caco-2. Este compuesto podría ser considerado un antiinvasivo potencial para lograr la erradicación o la disminución de *C. jejuni* en la cadena alimentaria humana.



## Capítulo

# 3

## Efecto de extractos de oligosacáridos pécticos sobre la adherencia e invasividad de *Campylobacter*

*El trabajo de investigación descrito en este capítulo se llevó a cabo como parte de una colaboración entre el departamento de Food Biosciences de la Universidad de Reading (Reading, Inglaterra), y el Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), y se realizó bajo la supervisión del Dr. Robert Rastall y la Dra. Michelle Collins.*

### 3.1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En el mundo se producen cada año cerca de 70 millones de toneladas de naranjas (FAO, 2004). En España, la producción anual es cercana a los 7 millones de toneladas, la mayor parte de las cuales es destinada a la industria de zumos (Intercitrus, 2009). El residuo de la naranja que queda después de la extracción del zumo representa aproximadamente la mitad de la masa de la fruta, y la mitad de dicho residuo corresponde a la cáscara (Braddock, 1999).

A nivel mundial, más de 2 millones de toneladas de pulpas de cítricos obtenidas a partir de residuos industriales son destinados a la alimentación de ganado, por ser considerado un producto de bajo valor añadido (Manderson *et al.*, 2005). La pectina fabricada a partir de cáscara de cítricos constituye un producto de valor añadido de estos residuos, principalmente dado a su uso en la industria alimentaria como gelificante, texturizador, emulsificante y estabilizador (Liu *et al.*, 2006). A pesar de esto, su demanda en el mercado es baja en comparación con su potencial de producción a partir de los residuos industriales y a su bajo costo (Manderson *et al.*, 2005).

Los oligosacáridos pécticos (POS) presentes en la cáscara de la naranja, obtenidos tras la eliminación de la pectina, se han propuesto como potenciales prebióticos humanos y como posibles agentes reductores de la adherencia de algunos patógenos (Manderson *et al.*, 2005; Hotchkiss *et al.*, 2003); sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado su efecto sobre *Campylobacter*. En este capítulo se determinará el efecto de un extracto de oligosacáridos pécticos provenientes de cáscara de naranja, sobre la capacidad de colonización de *Campylobacter*, con miras a su posible inclusión como complemento alimentario en piensos para pollos o como ingrediente funcional en alimentación humana para lograr la disminución de este patógeno de la cadena alimentaria.

Para llevar a cabo estos estudios se utilizarán cultivos de células epiteliales Caco-2, que como se comentó con antelación, constituyen un modelo *in vitro* reconocido para simular las condiciones tanto del epitelio intestinal humano (Everest *et al.*, 1992), como del pollo (Hänel *et al.*, 2004). Las células Caco-2 pueden presentar diferentes características y propiedades de acuerdo con su grado de diferenciación. Su morfología después de 6 días de cultivo se caracteriza por la formación de bordes de cepillo con microvellos y una forma celular compacta. Entre los días 16 y 22 de incubación, se obtienen células diferenciadas que poseen características de enterocitos maduros (Friis *et al.*, 2005; Everest *et al.*, 1992). A pesar de que ambos modelos han sido utilizados de manera alterna en diferentes trabajos, no se conoce aún la manera en que el nivel de diferenciación puede influir sobre la línea celular como modelo para estudiar la colonización de *Campylobacter*.

De manera similar, no existe uniformidad en cuanto a la metodología a emplear para la incubación de *Campylobacter* con sustancias potencialmente antiadherentes o antiinvasoras, ya que en algunos estudios se ha preincubado el patógeno con el compuesto de interés antes de su adición al cultivo celular (Wittschier *et al.*, 2007; Lee y Newell, 2006), mientras que en otros se inoculan ambos simultáneamente a las células epiteliales (Shoaf *et al.*, 2006).

Debido a lo mencionado anteriormente, el objetivo principal de este capítulo es estudiar el efecto de un extracto de POS sobre la adherencia e invasividad de *C. jejuni* a células epiteliales Caco-2. Para cumplir con este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

Obtener y caracterizar un extracto de POS.

Determinar las diferencias entre la capacidad de adherencia e invasividad de *Campylobacter* en cultivos de células Caco-2 no diferenciados y en cultivos diferenciados.

Estudiar el efecto del extracto de POS y de su concentración sobre la capacidad de adherencia e invasividad de *Campylobacter* a cultivos celulares diferenciados y no diferenciados de células Caco-2.

Determinar la influencia del método de incubación (con o sin incubación previa del POS con el cultivo bacteriano) sobre la adherencia e invasividad de *Campylobacter* a células Caco-2.

## **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1. Extracto de POS**

#### **3.2.1.1. Obtención del extracto de POS**

Se obtuvo un extracto de oligosacáridos pécticos (POS) a partir de cáscara de naranja por medio de extracción por flash con inyección de vapor siguiendo la metodología descrita por Fishman *et al.* (2007). Brevemente, la solución obtenida después de la precipitación de la pectina y su remoción por filtración, se evaporó bajo presión reducida para eliminar el alcohol isopropílico. El precipitado floculado obtenido se colectó por decantación y se conservó en congelación a  $-20^{\circ}$  C hasta el momento de su uso. Posteriormente, esta fracción se nanofiltró como se ha descrito con antelación (Manderson *et al.*, 2005) y se preparó una solución madre (10 mg/mL) con el extracto diluido en PBS-Ca/Mg. Seguidamente, se esterilizó por filtración (0,2  $\mu$ m) y se almacenó a  $-20^{\circ}$  C hasta el momento de su uso.

#### **3.2.1.2. Caracterización de la fracción glucídica del extracto de POS**

La composición total del contenido de carbohidratos y el contenido de ácido galacturónico, presentes en el extracto de POS se determinaron empleando el método del fenol sulfúrico (DuBois *et al.*, 1956) y colorimetría (Filisetti-Cozzi y Carpita, 1991), respectivamente. La composición de monosacáridos se determinó siguiendo la metodología descrita por Manderson *et al.* (2005). Brevemente, se llevó a cabo una metanolisis de la muestra y, tras la evaporación del metanol, se resuspendió en agua y se filtró (0,25  $\mu$ m). Se analizaron los hidrolizados por cromatografía de intercambio iónico de alto desempeño, con detección de pulsos amperométricos (HPAEC-PAD).

### **3.2.2. Células eucariotas**

#### **3.2.2.1. Material plástico, medios, reactivos, obtención y condiciones de cultivo**

Los materiales y métodos utilizados en este capítulo para el cultivo y mantenimiento de las células epiteliales Caco-2 se encuentran descritos en los apartados 2.2.1.1.-2.2.1.4.

#### **3.2.2.2. Ensayos de viabilidad de células Caco-2**

Para evaluar el efecto de la presencia del extracto de POS en los ensayos de adherencia e invasividad sobre la viabilidad de las células Caco-2, las células epiteliales se lavaron dos veces con 1

mL PBS<sup>-Ca/Mg</sup> y se incubaron con 500 µL de POS (2,5 mg/mL) durante 1 h en 5% CO<sub>2</sub>. Como control se empleó PBS<sup>-Ca/Mg</sup>. Se lavó dos veces con 1 mL de PBS<sup>-Ca/Mg</sup> y se añadieron 200 µL/pozo de tripsina/EDTA, se incubó durante 3 min y se añadieron 800 µL/pozo de DEMEM. Se centrifugó por 10 min a 5000 rpm, se añadieron 50 µL de DMEM y 50 µL de colorante azul tripán al pellet obtenido y se incubó 5 min. Se realizó el recuento de células al microscopio, utilizando un hematocitómetro convencional.

Usando la siguiente fórmula se calculó el porcentaje de viabilidad de las células:

$$\text{Porcentaje de viabilidad} = 100 \times \frac{\text{células viables}}{\text{células totales}}^{-1}$$

### **3.2.3. Células bacterianas**

#### **3.2.3.1. Medios, reactivos, cepas y condiciones de cultivo**

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizó la cepa *C. jejuni* NCTC 11351, que constituye la cepa tipo de *C. jejuni* y cuya capacidad de adherirse e invadir células epiteliales Caco-2 ha sido estudiada por nosotros con anterioridad (Figura 2.5.). Los medios y la metodología empleada para la preparación de los inóculos se han descrito previamente en 2.2.2.1 y 2.2.2.3.

#### **3.2.3.2. Ensayos de viabilidad bacteriana**

Para la determinación del efecto del extracto de POS sobre la viabilidad de *Campylobacter*, se lavó dos veces el inóculo bacteriano y se resuspendió en PBS<sup>-Ca/Mg</sup>. Posteriormente, dicho inóculo se incubó en condiciones de microaerofilia con el POS a una concentración final 2,5 mg/mL y en agitación durante 2 h, que corresponde al tiempo de incubación de los microorganismos con los compuestos durante los ensayos de adherencia e invasividad. Como control se empleó PBS<sup>-Ca/Mg</sup>. Se realizaron diluciones seriadas y se sembró en agar MHS para realizar el recuento bacteriano.

### **3.2.4. Ensayos de adherencia e invasividad a células Caco-2**

#### **3.2.4.1. Comparación de la capacidad de adherencia e invasividad de *Campylobacter* a células Caco-2 ND y DF**

Para comparar la capacidad de adherencia e invasividad de *C. jejuni* NCTC 11351 a cultivos de Caco-2 ND y DF, se empleó la metodología descrita en 2.2.3.1., utilizando ambos tipos de cultivos celulares. El tiempo de incubación de la bacteria en contacto con las células epiteliales fue de 1 h y se

empleó un MOI de 100 y un pH de 7. Estas condiciones de trabajo se optimizaron en el desarrollo del Capítulo 2 y se comprobó su validez con la cepa utilizada (datos no mostrados).

#### **3.2.4.2. Efecto del extracto de POS sobre la adherencia e invasividad de *Campylobacter* a células Caco-2 ND y DF**

Para determinar el efecto del extracto de POS sobre la adherencia e invasividad de *C. jejuni* NCTC 11351 a células Caco-2, el inóculo bacteriano se lavó dos veces con PBS<sup>-Ca/Mg</sup> y se resuspendió en PBS<sup>-Ca/Mg</sup> + 1% de SFB. La densidad óptica leída a 600 nm se ajustó a 0,5 (MOI=100). Se agregó el POS (concentración final 2,5 mg/mL) y se incubó en agitación durante 1 h en condiciones de microaerofilia. Después de este tiempo, se añadieron alícuotas de 500 µL a las monocapas de las células epiteliales Caco-2 y se incubó durante 1h a 37° C con 5% CO<sub>2</sub>.

Después de la incubación, se lavaron las células epiteliales dos veces con PBS<sup>-Ca-Mg</sup> y se siguió la metodología descrita en 2.2.3.1. Los resultados se expresaron como las bacterias adheridas comparadas con el control (ARC) o invasoras con respecto al control (IRC). Dichos valores se calcularon según las siguientes fórmulas:

$$\text{ARC} = 100 \times \text{bacterias adheridas en la muestra (ufc/mL)} \times \text{bacterias adheridas en el control (ufc/mL)}^{-1}$$

$$\text{IRC} = 100 \times \text{bacterias invasoras en la muestra (ufc/mL)} \times \text{bacterias invasoras en el control(ufc/mL)}^{-1}$$

#### **3.2.4.3. Efecto de la concentración de POS sobre la invasión de *Campylobacter* a células Caco-2**

Para la determinación del efecto de la concentración de POS sobre la invasión de *C. jejuni* NCTC 11351 a las células Caco-2, se empleó el método descrito en el apartado anterior, utilizando concentraciones finales de POS de 2,50; 1,50; 1,00; 0,50 y 0,05 mg/mL.

#### **3.2.4.3. Efecto del método de incubación empleado para ensayos de adherencia e invasividad de *Campylobacter* a células Caco-2**

Se compararon los resultados obtenidos al emplear dos métodos diferentes de incubación. El método I es el detallado en el apartado 3.2.4.2. y empleado a lo largo de este estudio. A diferencia del anterior, en el método II no se realizó el paso de preincubación del inóculo bacteriano con el extracto de POS, ya que ambos se añadieron al cultivo celular de manera simultánea (volumen final 500 µL),

después del lavado de las células. Posteriormente se incubó durante 1 h a 37° C con 5% CO<sub>2</sub>. Una vez realizada la incubación, se lavaron dos veces las células epiteliales con PBS<sup>-Ca/Mg</sup> y se siguió la metodología descrita en 2.2.3.1. Los resultados se expresaron como se indica en 3.2.4.2.

### **3.2.5. Análisis estadístico**

Los datos experimentales se analizaron utilizando el programa Minitab versión 14.1 (Minitab 14, State College, PA). Para el análisis de datos se empleó la prueba t de Student. Las diferencias entre muestras se consideraron significativas cuando  $p \leq 0,05$ . En las Tablas y Figuras, N se refiere al número de experimentos realizados y n al número de muestras analizadas.

### 3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.3.1. Caracterización del extracto de POS

Se realizó la caracterización del extracto de polisacáridos pécticos (POS) obtenido a partir de albedo de cáscara de naranja, determinando su contenido de glucosa, arabinosa, galactosa, xilosa, ramnosa, fucosa y ácido galacturónico (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1.** Composición porcentual de monosacáridos en la muestra de POS. Resultados expresados como la media del % con respecto al total de monosacáridos presentes en la muestra.

<b>Monosacáridos</b>	<b>% POS</b>
Glucosa.....	58,10
Arabinosa.....	18,81
Galactosa.....	5,44
Xilosa.....	3,36
Ramnosa.....	7,09
Fucosa.....	0,19
Ácido galacturónico.....	7,01

La glucosa fue el azúcar mayoritario en la composición del extracto de POS (58,1%), seguida por la arabinosa (18,81%). En menores concentración se encontró la ramnosa (7,09%), el ácido galacturónico (7,01), la galactosa (5,44%), la xilosa (3,36%) y la fucosa (0,19%).

En los resultados obtenidos se observa que las concentraciones de ácido galacturónico y de ramnosa son similares, lo que sugiere la presencia de una estructura de ramnogalacturonano I (Figura A.5.), con base de ramnosa y ácido galacturónico unidos de manera alterna y con residuos de arabinosa y galactosa, unidas a la ramnosa en cadenas laterales (Ridley *et al.*, 2001).

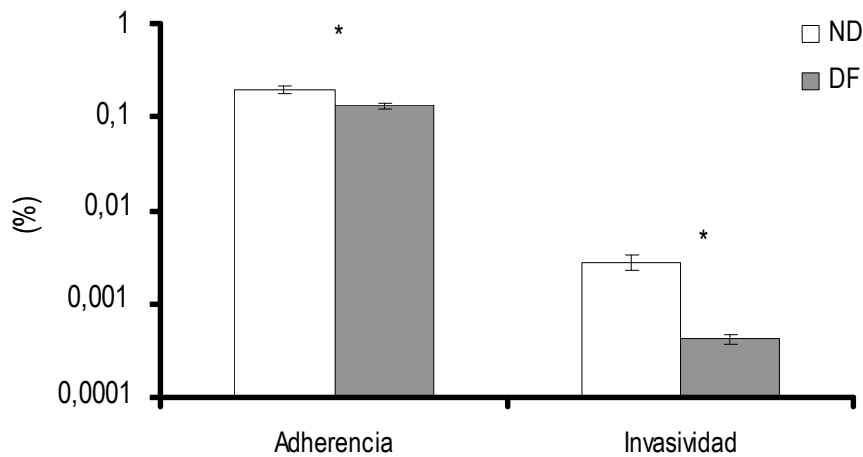
A diferencia de lo anterior, en un estudio realizado por Manderson *et al.* (2005) en el que se caracterizó un extracto similar de POS, extraído también de albedo de naranja y utilizando la misma metodología empleada en el presente trabajo, se obtuvo una relación ácido galacturónico-ramnosa mucho mayor, que se atribuyó a la presencia de xilogalacturano.

En ambos estudios, sin embargo, el azúcar mayoritario fue la glucosa, cuya presencia es probablemente debida a la glucosa libre proveniente de la cáscara de la naranja (Manderson *et al.*, 2005).



### 3.3.2. Adherencia e invasividad de *Campylobacter* a células Caco-2 ND y DF

En general, se sabe que las lectinas bacterianas presentan una gran especificidad en cuanto al hospedador y al tejido al que son capaces de adherirse (Fernández y Berenguer, 2000). Considerando esto, se determinó el perfil de adhesión e invasividad de *C. jejuni* NCTC 11351 a cultivos de Caco-2 no diferenciados (ND) y diferenciados (DF), con el fin de establecer si se observan diferencias en la capacidad de colonización con respecto al grado de diferenciación celular (Figura 3.1). Previamente se estudió el efecto del antibiótico empleado en las pruebas de invasividad sobre la viabilidad de las células Caco-2 ND y DF (Tabla A.5.) y se determinó que esta propiedad no se ve afectada por la concentración de gentamicina utilizada en este ensayo (500 mg/mL).



**Figura 3.1.** Adherencia e invasividad de *C. jejuni* NCTC 11351 a cultivos de células epiteliales Caco-2 ND y DF. Resultados expresados como la media del % de adherencia o invasividad con respecto al inóculo  $\pm$  la desviación estándar para N=3, n=2. (\*) Significativamente diferentes entre sí ( $p \leq 0,05$ ).

Únicamente una pequeña proporción de las bacterias presentes en el inóculo tuvieron la capacidad de adherirse o invadir las células epiteliales Caco-2. Tanto la adherencia como la invasividad resultaron significativamente mayores ( $p \leq 0,05$ ) en las células ND que en las DF, lo que sugiere un mayor tropismo hacia las primeras.

Resultados similares a los obtenidos en este trabajo se han descrito recientemente por Van Deun *et al.* (2008), quienes describieron que las células Caco-2 DF son menos susceptibles a ser invadidas por *C. jejuni* que las células ND. Sin embargo, existe una gran heterogeneidad en cuanto al

grado de diferenciación de las células Caco-2 empleadas en estudios de adherencia e invasividad de *Campylobacter* hasta el momento. Mientras algunos autores utilizan células ND en sus trabajos (Ashgar et al., 2007; Hänel et al., 2004), otros emplean cultivos DF (MacCallum et al., 2005; Karlyshev et al., 2004; Szymanski et al., 1995).

Los resultados obtenidos por nosotros demuestran que el comportamiento observado depende del grado de diferenciación de las células Caco-2, lo que parece ser un punto clave para la obtención de resultados comparables entre diferentes autores y laboratorios.

### **3.3.3. Influencia del extracto de POS sobre la adherencia e invasividad de *Campylobacter* a células Caco-2 ND y DF**

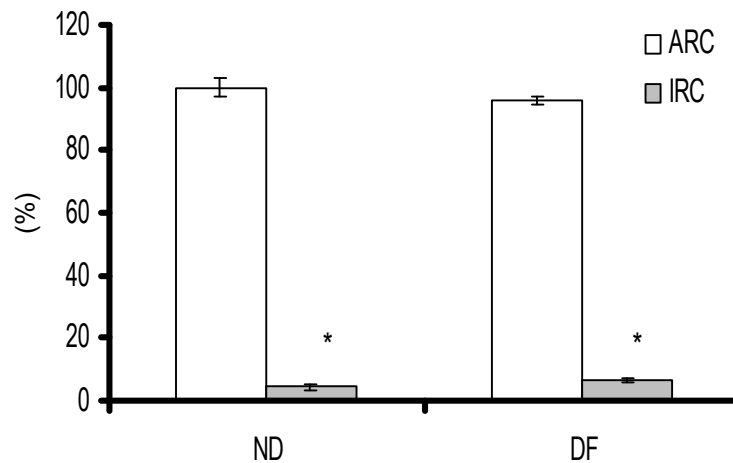
Se estudió el efecto del extracto de oligosacáridos pécticos obtenidos a partir de cáscara de naranja (POS) sobre la capacidad de adherencia e invasividad de *C. jejuni* NCTC 11351 a células Caco-2 ND y DF. Antes de realizar estos ensayos, se determinó el efecto del compuesto sobre ambos tipos de células (Tabla A.5.). Para ello, las células se incubaron durante 1 h con el extracto de POS (2,5 mg/mL) y se obtuvo que la viabilidad de las mismas no se afecta de manera significativa ( $p \leq 0,05$ ) por la presencia de dicho compuesto, a la concentración empleada. De igual manera, se determinó que la presencia de POS (2,5 mg/mL) no afecta de manera significativa ( $p \leq 0,05$ ) a la viabilidad de *C. jejuni* NCTC 11351 (Tabla A.6.).

Para las pruebas de adherencia e invasividad, los POS se preincubaron con el cultivo bacteriano (1 h) con el fin de maximizar el bloqueo de las lectinas del microorganismo, antes de su contacto con las células Caco-2. Posteriormente, se inoculó la mezcla a las células ND y DF, y se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 3.2.

En comparación con el control, el extracto de POS no afectó de manera significativa ( $p > 0,05$ ) la adherencia de *C. jejuni* LP1 a las células Caco-2 ND y DF. Sin embargo, la invasividad se redujo significativamente ( $p \leq 0,05$ ) con respecto al control en presencia del extracto de POS tanto en células ND como DF, con valores de IRC de 4,3 y 6,4%, respectivamente. No se observaron diferencias ( $p > 0,05$ ) en el efecto producido por el extracto de POS al emplear células ND y DF.

En los últimos años se han atribuido diversos efectos beneficiosos a los POS, principalmente a los extraídos de la piel de naranja. Entre dichos efectos, los POS se han propuesto como prebióticos

potenciales, siendo fermentados sus oligosacáridos de manera más selectiva que las pectinas de las cuales se derivan (Olano-Martín *et al.*, 2002).



**Figura 3.2.** Influencia del extracto de POS (2,5 mg/mL) sobre la adherencia e invasividad de *C. jejuni* NCTC 11351 a cultivos de células epiteliales Caco-2 ND y DF. Resultados expresados como la media de las bacterias adheridas comparadas con el control (ARC) o invasoras con respecto al control (IRC)  $\pm$  la desviación estándar para N=3, n=2. (\*) Significativamente diferente al control ( $p \leq 0,05$ ).

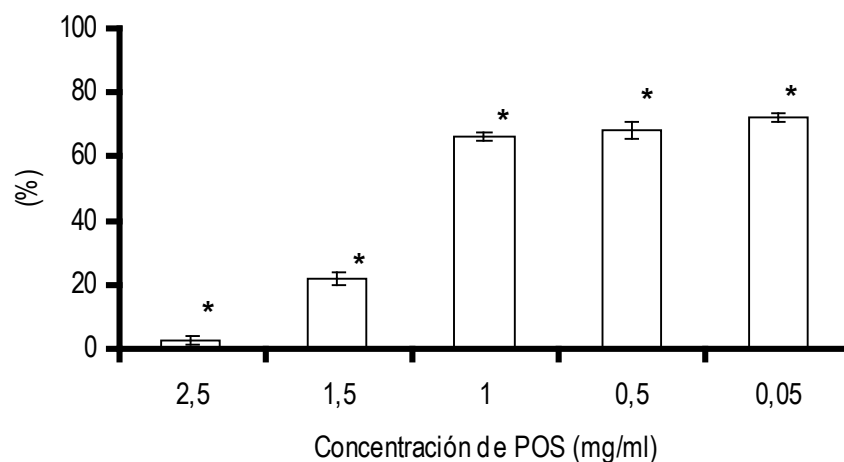
Los POS pueden también tener un efecto beneficioso sobre la microbiota intestinal, ya que son capaces de ocasionar un aumento en las poblaciones de bifidobacterias y *Eubacterium rectale* (Manderson *et al.*, 2005). Recientemente se ha visto que también pueden proteger contra infecciones producidas por *E. coli* (Rhoades *et al.*, 2008) y contra las toxinas producidas por *E. coli* 0157:H7 (Olano-Martín *et al.*, 2003). Aunque se desconoce el mecanismo exacto, se puede asumir que la neutralización de la toxina se debe a su unión al POS, interacción que se asemeja a la que debe ocurrir con el azúcar receptor.

Un mecanismo similar podría explicar los resultados obtenidos en este trabajo, en los que los POS parecen interferir con el proceso de invasión celular, afectando la eficiencia de la adhesión. Como se ha mencionado con antelación, una adherencia efectiva es un pre-requisito fundamental para la invasión celular y es uno de los factores principales que permiten la iniciación de una colonización exitosa (Zopf y Roth, 1996). La adherencia efectiva entre bacterias y células requiere de múltiples puntos de unión (McSweegan y Walker, 1986) y la adsorción de oligosacáridos podría prevenir que se establezcan dichas uniones por la saturación de los receptores o por impedimentos estéricos.

### 3.3.4. Influencia de la concentración de POS sobre la invasividad de *Campylobacter*

Dado el efecto antiinvasivo de los POS sobre *C. jejuni* NCTC 11351 a células Caco-2, se estudió la influencia de la concentración de este compuesto (0,05-2,5 mg/mL) sobre la invasión de *Campylobacter* a cultivos Caco-2 (Figura 3.3.). Debido a que dicho efecto parece ser similar al usar células ND y DF, se empleó únicamente el primer tipo, por requerir menos tiempo de incubación, al igual que en el resto de los experimentos presentados en adelante a lo largo de este trabajo.

El efecto antiinvasivo de los POS fue significativamente dependiente de la concentración empleada, a pesar de que todas las concentraciones estudiadas fueron capaces de inhibir la invasión de *Campylobacter* a las células Caco-2. La inhibición máxima se obtuvo al emplear la mayor concentración (2,5 mg/mL) de POS, con un IRC de 4%. Al disminuir la concentración de POS a 1,5 mg/mL, se observó una reducción en la actividad antiinvasora (IRC=23,8%). Concentraciones entre 0,05 y 1 mg/mL tuvieron un efecto similar en la invasión, y ofrecieron valores de IRC entre 62 y 70%.



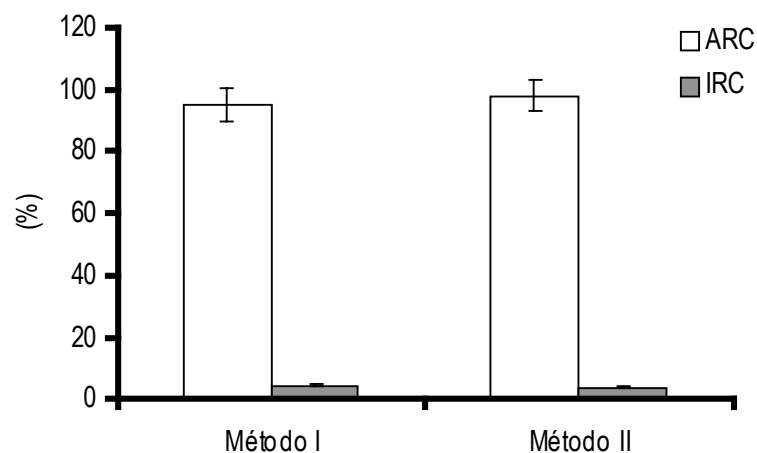
**Figura 3.3.** Influencia de la concentración de POS sobre la invasividad de *C. jejuni* NCTC 11351 a cultivos de células epiteliales Caco-2 ND. Resultados expresados como la media de las bacterias que han logrado invadir con respecto al control (IRC)  $\pm$  la desviación estándar para N=3, n = 2. (\*) Significativamente diferente al control ( $p \leq 0,05$ ).

Otros autores han descrito una respuesta dependiente de la dosis de oligosacáridos contra la adherencia celular de algunos patógenos asociados a alimentos (Lee y Newell, 2006; Shoaf *et al.*, 2006; Rhoades *et al.*, 2005), pero no existen estudios que incluyan datos de invasividad.

### 3.3.5. Influencia de la preincubación de POS con *Campylobacter* en la adherencia e invasividad de células Caco-2

Se ha observado que la habilidad de algunos oligosacáridos para desplazar patógenos que se encuentran adheridos a células es muy baja, e incluso inefectiva, en comparación con el grado de inhibición observado cuando las células han sido previamente incubadas con el oligosacárido antes de la infección bacteriana (Shoaf *et al.*, 2006).

Por otra parte, algunos autores han logrado la inhibición de la adherencia de patógenos a la superficie celular al preincubar los oligosacáridos con la bacteria antes de la infección (Wittschier *et al.*, 2007; Lee y Newell, 2006; Ruiz-Palacios *et al.*, 2003; Cinco *et al.*, 1984). En contraste, otros autores han demostrado que al añadir de manera simultánea el microorganismo y el oligosacárido es posible observar un efecto inhibitorio en la adherencia bacteriana (Shoaf *et al.*, 2006; Rhoades *et al.*, 2005; Naughton *et al.*, 2001). En nuestro estudio se comparó el efecto de la preincubación de *Campylobacter* con los POS sobre la adherencia e invasividad a células Caco-2 ND (Figura 3.4.).



**Figura 3.4.** Efecto del método de incubación sobre la adherencia e invasividad de *C. jejuni* NCTC 11351 a cultivos de células epiteliales Caco-2 ND. En el método I, el inóculo de *Campylobacter* se preincubó con el extracto de POS durante una hora antes de ser añadido a las células epiteliales y en el método II, el inóculo bacteriano y el extracto de POS se agregaron simultáneamente al cultivo celular. Resultados expresados como la media de las bacterias adheridas (ARC) o invasoras (IRC) con respecto al control  $\pm$  la desviación estándar para N=3, n=2.

La preincubación del inóculo de *Campylobacter* con los POS durante una hora antes de su adición a los cultivos celulares (método I) no parece tener influencia sobre el efecto inhibitorio observado, ya que no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) al comparar los resultados

obtenidos al emplear este método con respecto a los logrados sin emplear el paso de preincubación previa (método II). Además de solventar la controversia metodológica planteada con antelación, los resultados aquí obtenidos presentan una utilidad potencial relevante, ya que indicarían que los POS podrían llegar a ser utilizados como aditivos alimentarios de pollos para disminuir la invasividad de *Campylobacter* sin la necesidad de realizar el paso previo de pre-incubación, difícil de implementar *in vivo*.

Esta investigación ha demostrado que los oligosacáridos pécticos derivados de la cáscara de la naranja, un subproducto de la industria alimentaria, pueden tener utilidad potencial como compuestos antimicrobianos contra *Campylobacter*. En futuros trabajos se pretende valorar su empleo como aditivo nutricional en pollos o como componente funcional en las dietas de humanos, con el fin de contribuir a la disminución o erradicación de *Campylobacter* en la cadena alimentaria.

### 3.4. CONCLUSIONES

Al realizar la caracterización del extracto de POS obtenido, se determinó que la glucosa es el azúcar mayoritario, seguida por la arabinosa. En menores concentraciones se encontró ramnosa, ácido galacturónico, galactosa, xilosa, fucosa.

Tanto el porcentaje de adherencia como el de invasividad de *C. jejuni* NCTC 11351 fue significativamente mayor al emplear cultivos de células Caco-2 ND que en cultivos de células Caco-2 DF, por lo que consideramos que las células ND son un modelo más apropiado para el estudio de la capacidad de adherencia e invasión de *Campylobacter* a epitelios celulares Caco-2 y proponemos su empleo con estos fines.

El extracto de POS disminuyó de manera significativa invasividad de *C. jejuni* NCTC 11351 a células Caco-2. Dicho efecto fue dependiente de la concentración del extracto empleada.

La respuesta obtenida sobre la adherencia e invasividad de *C. jejuni* NCTC 11351 a cultivos celulares Caco-2 no se ve afectada de manera significativa por el método de incubación empleado (incubación previa o no del patógeno con POS).

### 3.3. BIBLIOGRAFÍA

- Ashgar, S.S.A., Oldfield, N.J., Wooldridge, K.G., Jones, M.A., Irving, G.J., David, L., Turner, P.J., Ala'Aldeen, D.A.A. 2007. *CapA*, an autotransporter protein of *Campylobacter jejuni*, mediates association with human epithelial cells and colonization of the chicken gut. *Journal of Bacteriology* 189: 1856-1865.
- Braddock, R.J. 1999. The citrus industry. En: Handbook of citrus by-products and processing technology. Braddock, R.J. (Ed). John Wiley & Sons Inc. Nueva York. 15-36 pp.
- Cinco, M., Banfi, E., Ruaro, E., Crevatin, D., Crotti, D. 1984. Evidence for L-fucose-(6-deoxy-L-galactopyranose) mediated adherence of *Campylobacter* ssp. to epithelial cells. *FEMS Microbiology Letters* 21: 347-351.
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Annals of Chemistry* 28: 350-356.
- Everest, P.H., Goosens, H., Butzler, J.P., Lloyd, D., Knutton, S., Ketley, J.M., Williams, P.H. 1992. Differentiated Caco-2 cells as a model for enteric invasion by *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Journal of Medical Microbiology* 37: 319-325.
- FAO. 2004. Perspectivas a plazo medio de los productos básicos agrícolas, proyecciones al año 2010 de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma.
- Fernandez, L.A., Berenguer, J. 2000. Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 21-44.
- Filissetti-Cozzi, T.M., Carpita, C.C.N.C. 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Annals of Biochemistry* 197: 157-172.
- Fishman M.L., Cooke, P. H., Chau, H.K., Coffin, D.R., Hotchkiss, A.T. 2007. Global structures of high methoxyl pectin from solution and in gels. *Biomacromolecules* 8: 573-578.
- Friis, L.M., Pin, C., Pearson, B.M. and J.M. Wells. 2005. *In vitro* cell culture methods for investigating *Campylobacter* invasion mechanisms. *Journal of Microbiology Methods* 61: 145-160.
- Hänel, I., Müller, J., Müller, W., Schulze, F. 2004. Correlation between invasion of Caco-2 eukaryotic cells and colonization ability in the chick gut in *Campylobacter jejuni*. *Veterinary Microbiology* 101: 75-82.
- Hotchkiss, A.T., Olano-Martín, E., Grace, W.E., Gibson, G.R., Rastall, R.A. 2003. Pectic oligosaccharides as prebiotics. *ACS Symposium Series* 849: 54-62.
- Intercitrus. 2009. Consumo de cítricos en la Unión Europea [en línea]. Referencia de 3 de marzo de 2009. Disponible en: <http://www.intercitrus.org>.
- Karlyshev, A.V., Everest, P., Linton, D., Cawthraw, S., Newell, D.G., Wren, B.W. 2004. The *Campylobacter jejuni* general glycosylation system is important for attachment to human epithelial cells and in the colonization of chicks. *Microbiology* 150: 1957-1964.
- Lee, M. D., Newell, D.G. 2006. *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. *Avian Diseases* 50: 1-9.
- Liu, Y., Shi, J., Langrish, T.A.G. 2006. Water-based extraction of pectin from flavedo and albedo of orange peels. *Chemical engineering Journal* 120: 203-209.



- MacCallum, A., Haddock, G., Everest, P.H. 2005. *Campylobacter jejuni* activates mitogen-activated protein kinases in Caco-2 cell monolayers and in vitro infected primary human colonic tissue. *Microbiology* 151: 2765-2772.
- Manderson, K., Pinart, M., Tuohy, K.M., Grace, W.E., Hotchkiss, A.T., Widmer, W., Yadhav, M.P., Gibson, G.R., Rastall, R.A. 2005. *In vitro* determination of prebiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacturing by-product stream *Applied and Environmental Microbiology* 71: 8383-8389.
- McSweegan, E., Walker, R. 1986. Identification and characterization of two *Campylobacter jejuni* adhesins for cellular and mucous substrates. *Infection and Immunity* 53: 141-148.
- Naughton, P. J., Grant, G., Bardocz, S., Allen-Vercoe, E., Woodward, M.J., Pusztai, A. 2001. Expression of type 1 fimbriae (SEF 21) of *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* in the early colonisation of the rat intestine. *Journal of Medical Microbiology* 50: 191-197.
- Olano-Martin, E., G. R. Gibson, Rastall, R.A. 2002. Comparison of the *in vitro* bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology* 93:505-511.
- Olano-Martin, E., M. R. Williams, G. R. Gibson, Rastall, R.A. 2003. Pectins and pectic-oligosaccharides inhibit *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin as directed towards the human colonic cell line HT29. *FEMS Microbiology Letters* 218: 101-105.
- Rhoades, J.R., Gibson, G.R., Formentin, K., Beer, M., Greenberg, N., Rastall, R.A. 2005. Caseinoglycomacropeptide inhibits adhesion of pathogenic *Escherichia coli* strains to human cells in culture. *Journal of Dairy Science* 88: 3455-3459.
- Rhoades, J., Manderson, K., Wells, A., Hotchkiss, A.T., Gibson, G.R., Formentin, K., Beer, M., Rastall, R.A. 2008. Oligosaccharide-mediated inhibition of the adhesion of pathogenic *Escherichia coli* strains to human gut epithelial cells *in vitro*. *Journal of Food Protection* 71: 37-42.
- Ridley, B.L., O'Neil, M.A., Mohnen, D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis and oligogalacturonide-related signalling. *Phytochemistry* 57: 929-967.
- Ruiz-Palacios, G. M., Cervantes, L.E., Ramos, P., Chavez-Munguis, B., Newburg, D.S. 2003. *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc  $\alpha$ 1, 2Gal  $\beta$ 1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *Journal of Biological Chemistry* 278: 14112-14120.
- Shoaf, K., George, L., Mulvey, G., Armstrong, D., Robert, W. 2006. Hutkins prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. *Infection and Immunity* 74: 6920-6928.
- Szymanski, C. M., King, M., Haardt, M., Armstrong, G.D. 1995. *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 cells. *Infection and Immunity* 63: 4295-4300.
- Van Deun, K., Pasmans, F., Van Immerseel, F., Ducatelle, R., Haesebrouck, F. 2008. Butyrate protects Caco-2 cells from *Campylobacter jejuni* invasion and translocation. *British Journal of Nutrition* 100: 480-484.
- Wittschier, N., Lengsfeld, C., Vortheims, S., Stratman, U., Ernst, J.F., Verspohl, E.J., Hensel, A. 2007. Large molecules as anti-adhesive compounds against pathogens. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 59: 777-786.
- Zopf, D., Roth, S. 1996. Oligosaccharide anti-infective agents. *Lancet* 347: 1017-1021.

La manosa y algunos productos ricos en ésta como las levaduras, pueden ser efectivos en el control de ciertos patógenos intestinales en animales de granja. Se estudió la influencia de levaduras (*S. cerevisiae*), de sus paredes celulares y de fracciones de manoproteínas extraídas de éstas por métodos térmicos o enzimáticos, sobre la adherencia e invasividad de *Campylobacter* a células epiteliales Caco-2. Las levaduras y las paredes celulares de éstas fueron capaces de reducir de manera significativa la adherencia de *Campylobacter* a cultivos de Caco-2, aunque no parecieron influir en su invasividad. El método empleado para preparar los extractos de manoproteínas influyó en su composición y en su eficacia para disminuir la adherencia e invasividad de *Campylobacter* a células Caco-2. Tanto la fracción proteica de las manoproteínas como la disponibilidad de los residuos de manosa parecen intervenir en la inhibición de la adherencia de *Campylobacter* a células epiteliales Caco-2. Las manoproteínas de levaduras también fueron capaces de disminuir la invasividad de otras bacterias patógenas asociadas a los alimentos y de favorecer selectivamente la adherencia de algunas bacterias lácticas que pueden ser potencialmente probióticas para pollos y humanos, por lo que podrían ser consideradas como potenciales agentes moduladores de la microbiota intestinal y como un medio para la disminución de *Campylobacter* en la cadena alimentaria.

Capítulo

4

Influencia de las manoproteínas de levadura sobre la adherencia e invasividad de *Campylobacter*

#### 4.1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Como se ha comentado previamente en los capítulos anteriores, en los últimos años ha ganado relevancia el empleo de agentes antiadhesivos como alternativa al uso de antibióticos para el control de patógenos en la alimentación animal. Se ha visto que para poder adherirse y desencadenar los fenómenos de patogénesis, algunas bacterias patógenas se unen específicamente a las glicoproteínas con extremos de D-manosa presentes en las superficies de las células eucariotas (Santin *et al.*, 2001; Pan *et al.*, 1997; Firon *et al.*, 1984; Ofek *et al.*, 1977). Tomando este argumento como premisa, se ha determinado que es posible bloquear las lectinas de ciertos patógenos con D-manosa exógena para impedir la adhesión de las bacterias a las mucosas del intestino y evitar de este modo su unión a los receptores y por tanto, la colonización bacteriana (Santin *et al.*, 2001; Zopf y Roth, 1996; Russell y Blake, 1994).

Algunos autores han demostrado que la introducción en la dieta de algunos animales y aves de corral de D-manosa y de productos ricos en ésta, como las levaduras, los manoligosacáridos y el metil-alfa-D-manósido, puede ser efectiva en el control de patógenos bacterianos intestinales como *Salmonella* (Spring *et al.*, 2000; Line *et al.*, 1998; Oyoyo *et al.*, 1989a; Oyoyo *et al.*, 1989b).

Además de su efecto potencial en el control de patógenos intestinales, se ha observado que los carbohidratos como la D-manosa, que no son digeribles por las enzimas de los mamíferos, pueden influenciar positivamente la composición y la actividad metabólica de la microbiota intestinal, actuando como prebióticos, y por tanto pueden resultar de gran interés como complemento alimentario para la formulación de dietas veterinarias específicas y comida para mascotas (Zentek *et al.*, 2002). Además, estas propiedades hacen que pueda tener también una utilidad potencial para el consumo humano, teniendo en cuenta que la D-manosa es un producto de grado alimentario. Sin embargo, el alto precio de la D-manosa hace que la inclusión de este compuesto como complemento en la dieta de los animales no resulte una estrategia rentable.

La pared celular de las levaduras constituye aproximadamente un 30% del peso seco de estos microorganismos y es rica en proteínas altamente glicosiladas unidas covalentemente a polisacáridos de D-manosa, denominadas manoproteínas (Lipke y Ovalle, 1998; Klis, 1994). Las levaduras, en especial *Saccharomyces cerevisiae*, conforman un importante porcentaje de los residuos industriales de diversas industrias alimentarias, principalmente en la vinícola y la panadera, por lo que su inclusión

como complemento en la dieta de animales podría ser una estrategia eficaz y rentable tanto para el control de patógenos como para estimular la proliferación de bacterias beneficiosas.

A pesar de que existen diversos estudios sobre el efecto de los productos ricos en D-manosa en la adherencia intestinal de diferentes enteropatógenos, tanto *in vitro* como *in vivo* (White *et al.*, 2002; Line *et al.*, 1998; Schoeni y Wong, 1994), apenas se conoce su efecto sobre *Campylobacter* spp., y los únicos datos disponibles muestran resultados contradictorios, ya que en ocasiones el uso de dichos productos parece disminuir la adhesión de esta bacteria (Schoeni y Wong, 1994), mientras que en otros casos no parecen influir en esta capacidad (Line *et al.*, 1998).

Debido a lo anteriormente mencionado, el objetivo principal de este capítulo es estudiar la influencia de diferentes extractos derivados de la pared celular de *S. cerevisiae* sobre la adherencia e invasividad de *Campylobacter* spp. a cultivos de células epiteliales de Caco-2, valorando también su influencia sobre otros patógenos de interés alimentario y sobre algunas bacterias potencialmente probióticas. Para lograr lo anterior, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

Estudiar el efecto de levaduras y de paredes celulares de las mismas sobre la adherencia e invasividad de *Campylobacter* a células Caco-2.

Realizar la extracción, mediante métodos térmicos y enzimáticos, y posterior caracterización de dos extractos de manoproteínas provenientes de paredes celulares de levaduras, y estudiar su efecto sobre la adherencia e invasividad del patógeno a las células epiteliales.

Determinar la influencia de la composición en proteínas y azúcares de los extractos obtenidos sobre la adherencia e invasividad de *Campylobacter* a células epiteliales Caco-2

Seleccionar el extracto de manoproteínas más efectivo y estudiar su actividad sobre la adherencia e invasividad de otros patógenos y de algunas especies bacterianas que pueden ser probióticos potenciales tanto en pollos como en humanos.

## **4.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.2.1. Extracción y caracterización de fracciones de manoproteínas**

#### **4.2.1.1. Levaduras y paredes celulares**

Para el desarrollo del siguiente capítulo se emplearon: *S. cerevisiae* (Laffort, Guipúzcoa, España), paredes de *S. cerevisiae* (Laffort, Guipúzcoa, España) y D-manosa (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Las levaduras y las paredes de levaduras se resuspendieron (30 mg/mL) en PBS-Ca/Mg y se calentaron durante 10 min a 85° C, para inactivar las enzimas y para eliminar las estructuras vegetativas presentes (baño de agua Precistern Barcelona, España). La D-manosa se resuspendió en (30 mg/mL) en PBS-Ca/Mg y se esterilizó por filtración (0,22 µm). Todas las soluciones se mantuvieron en congelación hasta el momento de su uso. En adelante, las muestras serán denominadas LEC (levaduras calentadas), PAC (paredes de levaduras calentadas) y MAN (manosa).

#### **4.2.1.2. Obtención de manoproteínas**

Para la obtención de manoproteínas de levadura se partió de las paredes de levadura (Laffort, Guipúzcoa, España). Cada procedimiento de extracción (enzimático y térmico) se llevó a cabo por triplicado de la manera en que se explica a continuación.

##### **4.2.1.2.1. Extracción enzimática**

Para la extracción enzimática se suspendieron 2 g de paredes celulares de levadura en 100 mL de tampón citrato-fosfato pH 7,2. Las paredes se lavaron y centrifugaron 3 veces a 5000 rpm por 10 min a 4° C (Beckman Avanti J-25, rotor JA-14, California, EE.UU.). La suspensión obtenida se incubó a 40° C durante 5 h con Glucanex 200G, una preparación enzimática comercial constituida por exo 1,3 β-glucanasas obtenidas a partir de extractos purificados y concentrados producidos por la especie de hongo filamentoso *Trichoderma harzianum* (Novozymes, Dittingen, Suiza). Posteriormente, el sobrenadante se separó del pellet por centrifugación (5000 g durante 10 min a 4° C). El sobrenadante se ultrafiltró a través de una membrana de 10 KDa de tamaño de poro (Minitan Millipore, Maryland, EE.UU.). El ultrafiltrado obtenido se colectó y se mantuvo en congelación (-20° C) hasta su utilización. Las manoproteínas obtenidas mediante este procedimiento enzimático en adelante serán designadas como ME.

Las ME se resuspendieron en una concentración final de (30 mg/mL) en PBS<sup>-Ca/Mg</sup>. Se esterilizaron por filtración (0,22 µm) y se mantuvieron en congelación (-20° C) hasta el momento de su uso.

#### **4.2.1.2.2. Extracción térmica**

Para llevar a cabo la extracción térmica de manoproteínas, se preparó una suspensión de pared de levaduras según las condiciones descritas anteriormente, y se calentó a 80-85° C en un baño termostático con agitación (Mammert, Schwabach, Alemania) durante 24 h. Al igual que en el caso anterior, el sobrenadante se separó del pellet por centrifugación (5000g durante 10 min a 4° C) y posteriormente se ultrafiltró (tamaño de poro 10 KDa) y se mantuvo en congelación (-20° C) hasta su utilización. Las manoproteínas obtenidas mediante este procedimiento de extracción térmica en adelante serán designadas como MT.

Las MT se resuspendieron en una concentración final de 30 mg/mL en PBS<sup>-Ca/Mg</sup>. Se esterilizaron por filtración (0,22 µm) y se mantuvieron en congelación (-20° C) hasta el momento de su uso.

#### **4.2.1.3. Tratamientos aplicados a la fracción de MT**

Con el fin de determinar la influencia de la composición de MT (fracción más activa) sobre el comportamiento observado en los ensayos de adherencia e invasividad, se llevaron a cabo los tratamientos que se describen a continuación.

##### **4.2.1.3.1. Hidrólisis de las proteínas presentes en la fracción de MT**

Para lograr la proteólisis de la fracción de proteínas presentes en las manoproteínas, se utilizó Pronasa (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), que es una preparación comercial formada por una mezcla de proteinasas exocelulares del hongo filamentoso *Streptomyces griseus*. Dicha preparación es activa frente a proteínas nativas y a proteínas desnaturadas, provocando una digestión completa de las mismas en aminoácidos individuales.

Para llevar a cabo la proteólisis se añadió una concentración de 50 Mm de Pronasa a una suspensión de MT (30 mg/mL) y se incubó en agitación durante 40 h a 37° C. Transcurrido este tiempo, la muestra se colocó en un baño de agua (Precisterm Barcelona, España) a 85° C durante 10 minutos

para desactivar la enzima. La muestra, denominada en adelante MTP, se mantuvo en congelación (-20° C) hasta el momento de su uso.

Como control se empleó una muestra sometida a las mismas condiciones descritas con anterioridad, pero empleando la enzima previamente inactivada por calor (85° C x 10 minutos). Esta muestra será denominada en adelante MTPI.

#### **4.2.1.3.2. Hidrólisis ácida de los oligosacáridos presentes en MT**

Con el fin de lograr la separación de los oligosacáridos ricos en manosa del cuerpo de las manoproteínas, se llevó a cabo una hidrólisis ácida. Para ello se preparó una solución de MT en agua destilada estéril (150 mg/mL). A continuación se agregaron volúmenes iguales de la solución anterior y de ácido trifluoroacético (2 N) en viales de vidrio, que se sellaron con la llama de un mechero. Los viales se incubaron durante 24 h a 110° C (Belenguer, Madrid, España). Pasado este tiempo, se ajustó el pH a 7 utilizando NaOH. Luego la concentración de manoproteínas se estableció con PBS<sup>-Ca-Mg</sup> en 30 mg/mL y la solución se esterilizó por filtración (0,22 µm). La muestra de MT, después de realizada la hidrólisis ácida, se denominó MTH.

#### **4.2.1.4. Caracterización de MT y ME**

Se realizó un estudio de caracterización de las fracciones de manoproteínas con el fin de determinar su contenido en proteínas y azúcares y, dentro de estos últimos, la proporción de glucosa y manosa.

##### **4.2.1.4.1. Fracción proteica**

La caracterización de las proteínas de las manoproteínas extraídas (MT y ME) se determinó según el método Bradford (Bradford, 1976), basado en la reacción de las proteínas con Azul de Coomassie G-250 (Pierce Chemical Co., Rockford, EE.UU.). La absorbancia se determinó a 595 nm 15 min después de la adición del reactivo (espectrofotómetro Boeco S-22 UV/vis, Neubauer, Alemania). Los resultados se expresaron como mg de albúmina sérica bovina por litro (BSA/L).

##### **4.2.1.4.2. Polisacáridos**

La fracción de polisacáridos totales se determinó por el método del fenol sulfúrico (DuBois *et al.*, 1956). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 490 nm (espectrofotómetro Boeco S-22 UV/vis, Neubauer, Alemania). Los resultados se expresaron como mg de manosa/L.



Para el aislamiento la fracción coloidal en la que se encuentran presentes los polisacáridos, se siguió el procedimiento descrito por Segarra *et al.* (1995). Un total de 5 mL de etanol (96% v/v) y 50 mL de HCl (1 N) se añadieron a 1 mL de la muestra. Después de 18 h de incubación a 22° C, los tubos se centrifugaron (1800 g durante 20 min), el sobrenadante se eliminó y las muestras se lavaron 3 veces con etanol (96% v/v).

Para llevar a cabo la hidrólisis de los polisacáridos y la obtención de los azúcares individuales, las muestras obtenidas se hidrolizaron a 100° C durante 24 h en un vial cerrado que contenía 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 2 M y 0,5 mL de mioinositol (0,1% p/v, estándar interno).

Después de la hidrólisis, la mezcla se evaporó a sequedad en estufa. El residuo hidrolizado seco se silió siguiendo el procedimiento descrito por Troyano *et al.* (1991). La muestra se disolvió en 100 µL de piridina anhídrica, 100 µL de trimetilsilil imidazol, 100 µL de trimetilclorosilano, 100 µL de n-hexano y 200 µL de agua desionizada, los cuales se añadieron secuencialmente, con agitación de la muestra.

Los derivados siliados presentes en la fase orgánica se inyectaron inmediatamente en el cromatógrafo de gases. Los derivados del trimetilsilil imidazol se analizaron en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 (Cambridge Scientific Products, Cambridge, UK), equipado con un detector de ionización de llama (FID) y con un inyector split/splitless. La separación se llevó a cabo en una columna Carbowax 20M de 30 m de longitud x 0,25 mm de diámetro interno (Alltech Associates, Deerfield, EE.UU.). La temperatura del inyector y del detector fue de 220° C. El horno se calentó a 40° C por 10 min, luego la temperatura se incrementó 7° C/min hasta alcanzar los 150° C, seguido de un incremento de 30° C/min hasta alcanzar los 210° C. El gas portador fue helio (12,5 psi, split 1/15). Los factores de respuesta se calcularon con una serie de patrones puros a diferentes concentraciones, usando mioinositol como patrón interno. La identificación de los compuestos presentes en las muestras se llevó a cabo por medio de la comparación de los tiempos de retención de los picos con respecto a los patrones puros.

#### **4.2.2. Células eucariotas**

##### **4.2.2.1. Material plástico, medios, reactivos, obtención y condiciones de cultivo**

Los materiales y métodos utilizados en este capítulo para el cultivo y mantenimiento de las células epiteliales Caco-2 se encuentran descritos en los apartados 2.2.1.1.-2.2.1.4. En este capítulo se emplearon células no diferenciadas (ND), que como se ha descrito previamente, representan un

modelo celular de gran utilidad para simular el comportamiento tanto el epitelio intestinal humano como el del pollo.

#### **4.2.2.2. Ensayos de viabilidad de células Caco-2**

Para los ensayos de viabilidad de células eucariotas, se siguió la metodología descrita en el apartado 3.2.3.2., incubándose las células con 500  $\mu$ L del compuesto de interés, a una concentración final de 15 mg/mL.

#### **4.2.3. Células bacterianas**

##### **4.2.3.1. Medios y reactivos**

Para el cultivo de las cepas de *Campylobacter*, se emplearon los medios especificados en el apartado 2.2.2.1. Para el cultivo de las otras especies estudiadas en este capítulo se emplearon los siguientes medios de cultivo: para cultivos en medio líquido: caldo (LB) o caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) como medio líquido y agar MH o agar Man Rogosa Sharpe (MRS) como medio sólido (todos de Oxoid, Basingstoke, Reino Unido).

##### **4.2.3.2. Cepas**

Se utilizó la cepa *C. jejuni* LP1, suministrada por el Departamento de Microbiología del Hospital La Paz. Se seleccionó esta cepa ya que tanto la fisiología de su crecimiento, como su capacidad para adherirse e invadir cultivos de células Caco-2 se asemejan a los de la cepa tipo de *Campylobacter* (*C. jejuni* NCTC 11351) (Figuras 2.4. y 2.5., respectivamente), teniendo la peculiaridad de corresponder a un aislamiento clínico de enteritis humana, por lo que su empleo resulta de especial interés.

Se usaron también las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 1428, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, y *Lactobacillus plantarum* ATCC 10241, todas ellas pertenecientes a la Colección Norteamericana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection; ATCC, Manassas, EE.UU.). Las cepas *Shigella sonnei* CECT 457 y *Lactobacillus casei* CECT 475, se adquirieron en la Colección Española de Cultivo Tipo (Colección Española de Cultivos Tipo, CECT, Valencia, España). *Pediococcus damnosus* DSM 20331 se adquirió en la Colección Alemana de Microorganismos (Deutsche SammlLung von Mikroorganismen, DSM, Braunschweig, Alemania). Las cepas *Lactobacillus salivarius* IFa, *Klebsiella* spp. IFb y *Enterococcus faecium* BIFI-58, se aislaron en nuestro instituto.

#### **4.2.3.3. Condiciones de cultivo de cepas bacterianas**

Las condiciones empleadas para el cultivo de *Campylobacter* se especifican en 2.2.2.3. Las cepas de *E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium* ATCC 1428, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. sonnei* CECT 457, *Klebsiella* spp. IFb y *S. aureus* ATCC 25923 se cultivaron en agar LB y se incubaron en aerofilia a 37° C durante 24 h. Se seleccionaron colonias aisladas, se inocularon en 50 mL de medio LB y se incubaron en aerofilia durante 24 h a 37° C y en agitación (240 rpm). Las cepas de *L. casei* CECT 475, *L. salivarius* IFa, *E. faecium* BIFI-58, *L. plantarum* ATCC 10241, y *P. damnosus* DSM 20331 se cultivaron en caldo MRS y se incubaron a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub> (estufa Inco 2, Memmert, Alemania), durante 48 h (*L. casei*) o 24 h (cepas restantes).

Se realizó una dilución 1/10 de los cultivos en LB o MRS fresco y se incubó el cultivo preparado en las condiciones descritas anteriormente. Posteriormente, se realizó una dilución 1/100 de los cultivos en medio fresco. Estos últimos cultivos constituyeron el inóculo bacteriano utilizado para los ensayos experimentales.

#### **4.2.3.4. Efecto de las condiciones de incubación sobre la viabilidad bacteriana**

Se realizaron estudios para determinar si la viabilidad de las cepas bacterianas empleadas es afectada por las condiciones de incubación a las que los cultivos bacterianos se someten durante las pruebas de adherencia e invasividad. Las cepas *E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium* ATCC 1428, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. sonnei* CECT 457, *Klebsiella* spp. IFb y *S. aureus* ATCC 25923, se cultivaron tanto en 5% CO<sub>2</sub> a 37° C, como según se indica en 4.2.3.3. Se tomaron muestras a 1 h y 3 h, que equivale al tiempo de incubación empleado para los ensayos de adherencia e invasividad, respectivamente. Se realizaron diluciones seriadas y se sembró en agar LB para el recuento bacteriano.

#### **4.2.3.5. Ensayos de viabilidad bacteriana**

Para determinar el efecto de los diferentes compuestos empleados en este estudio sobre la viabilidad de las diferentes especies y cepas bacterianas, los microorganismos se cultivaron según 4.2.3.3. y se siguió la metodología descrita en 2.2.2.6.

#### **4.2.4. Ensayos de adherencia e invasividad a células Caco-2**

##### **4.2.4.1. Efecto de los extractos de manoproteínas sobre la adherencia e invasividad bacteriana a células Caco-2**

Para estudiar el efecto de las levaduras y sus fracciones sobre la adherencia e invasividad de *Campylobacter* spp. a cultivos de células Caco-2, se utilizó la metodología descrita en 2.2.3.1., empleando una concentración final del compuesto de interés de 15 mg/mL.

En el caso de las especies bacterianas restantes, los inóculos bacterianos obtenidos como se indica en 4.2.3.3., se lavaron con PBS pH 7, y se ajustó la concentración celular a una densidad óptica de 0,5; obtenida a una longitud de onda de 600 nm. Los inóculos estandarizados se incubaron i en matraces de 50 mL durante 1 h, con el compuesto a probar a una concentración final de 15 mg/mL. Las condiciones de incubación empleadas fueron las adecuadas para cada bacteria.

Utilizando los cultivos mencionados, se llevaron a cabo estudios de adherencia e invasividad. Para ello, se realizaron diluciones seriadas, se sembró en placas de agar MHS y se incubó a 38° C durante 48 h en condiciones de microaerofilia, en el caso de *Campylobacter* spp.. En el caso de *E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium* ATCC 1428, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. sonnei* CECT 457, *Klebsiella* spp. IFb y *S. aureus* ATCC 25923 se utilizó agar MH, y las placas se incubaron durante 24 h a 37°C. Las cepas de *L. casei* CECT 475, *L. salivarius* IFa, *E. faecium* BIFI-58, *L. plantarum* ATCC 10241, y *P. damnosus* DSM 20331) se cultivaron en agar MRS con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 o 48 h, en dependencia de la cepa utilizada, y como se describió previamente.

##### **4.2.4.2. Determinación del efecto de la concentración de manoproteínas sobre la adherencia e invasividad de *Campylobacter***

Se realizaron ensayos de invasividad de *Campylobacter* para determinar el efecto de la concentración del extracto de manoproteínas sobre este parámetro. Para ello se siguió el procedimiento descrito en el apartado anterior, empleando concentraciones de 15; 10; 5; 2,5; 1 y 0,5 mg/mL del compuesto de interés.

#### **4.2.5. Análisis estadístico**

Los datos experimentales se analizaron utilizando el programa Minitab versión 14.1 (Minitab 14, State College, PA). Para el análisis de datos se empleó la prueba t de Student. Las diferencias entre

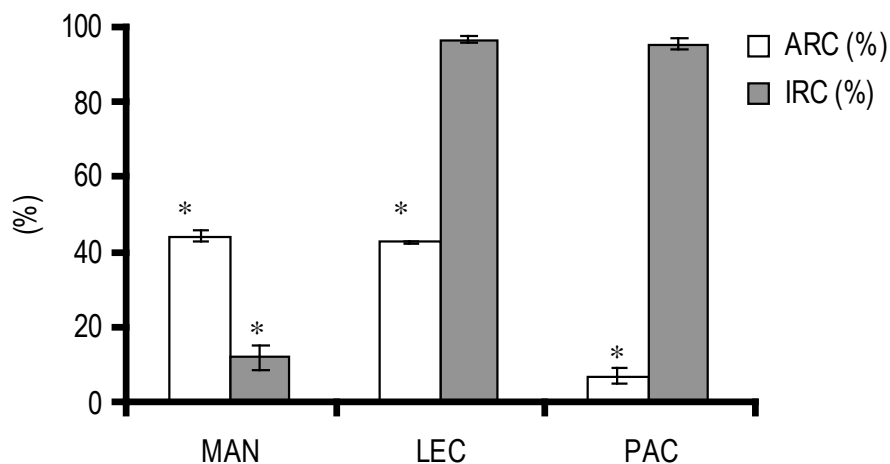
muestras se consideraron significativas cuando  $p \leq 0,05$ . En las Tablas y Figuras, N se refiere al número de experimentos realizados y n al número de muestras analizadas.

## 4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.3.1. Influencia del empleo de *S. cerevisiae* y sus paredes sobre la adherencia e invasividad de *Campylobacter* a células Caco-2

Como se ha comentado previamente, el empleo de manosa (MAN) para el control de la adherencia de patógenos a los epitelios intestinales puede ser una estrategia interesante desde el punto de vista práctico, pero poco rentable económicamente. Sin embargo, existen alternativas que podrían ser económicamente viables, como son las levaduras y las paredes de levaduras, que representan una parte importante de los subproductos derivados de diferentes procesos industriales para la obtención de vino, cerveza o pan. Dichos productos contienen manosa polimérica en su estructura y constituyen una fuente económica de este compuesto.

Tomando lo anterior como premisa, se determinó el efecto de levaduras inactivas de la especie *S. cerevisiae* (LEC) y de paredes celulares (PAC) obtenidas a partir de levaduras de esta misma especie, sobre la adherencia e invasividad de *C. jejuni* LP1 a células epiteliales Caco-2 (Figura 4.1.), empleando D-manosa como control. Este estudio se realizó tras determinar que ninguno de estos compuestos afecta ni a la viabilidad de los cultivos de células Caco-2 ni a cultivos de *Campylobacter* (Tablas A.5. y A.6., respectivamente).



**Figura 4.1.** Influencia de la presencia de MAN, LEC y PAC (15 mg/mL) sobre la adherencia e invasividad de *C. jejuni* LP1 a cultivos de células Caco-2 no diferenciadas. Los resultados representan los valores medios de las bacterias adheridas con respecto al control (ARC) o invasoras con respecto al control (IRC)  $\pm$  la desviación estándar para N=3, n=2. (\*) Recuentos significativamente diferentes al control ( $p \leq 0,05$ ).

Tanto las levaduras como las paredes de levaduras se sometieron a un tratamiento térmico, con el fin de incrementar la eficiencia del proceso inhibitorio. En ensayos previos, se comprobó que este tipo de tratamiento incrementa los sitios disponibles de adsorción (datos no mostrados). Lo anterior puede ser debido a que las condiciones utilizadas en el tratamiento térmico ocasionan la desnaturalización de las proteínas y contribuyen a la liberación de monómeros glucídicos. Esta liberación de monómeros glucídicos contribuye a ampliar el número de sitios de adsorción disponibles con respecto a los presentes en levaduras o paredes intactas, y de esta manera aumentar la superficie de unión a las lectinas bacterianas (Nunez *et al.*, 2008; Bejaoui *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos indican que la manosa y las levaduras son capaces de inhibir la adherencia de *C. jejuni* de manera similar, en un 44% y 42,3% de ARC, respectivamente. Sin embargo, las paredes de las levaduras parecen ser más efectivas para inhibir la adherencia del microorganismo, ya que presentaron el menor valor medio para ARC (7%).

A pesar del grado de inhibición de la adherencia de *Campylobacter* a las células Caco-2 observado, ni las levaduras, ni sus paredes tuvieron un significativo efecto reductor ( $p \leq 0,05$ ) sobre su capacidad de invasividad, ya que presentaron valores de IRC mayores al 95%, lo que indica que las bacterias adheridas lograron, en su mayoría, invadir las células.

Por el contrario, se vió que la manosa reduce de manera significativa la invasión de las células Caco-2 por *C. jejuni*, lo que viene representado por un valor de IRC de 12%. Estos resultados muestran que la manosa puede ser potencialmente más efectiva que las levaduras y paredes de levaduras tratadas en controlar la invasión de *C. jejuni* a las células epiteliales Caco-2.

#### **4.3.2. Extracción y caracterización de fracciones de manoproteínas a partir de paredes de levaduras**

Se extrajo la fracción soluble de las manoproteínas presentes en la pared celular de *S. cerevisiae* para estudiar su influencia sobre la adherencia e invasividad de *C. jejuni* LP1 a células epiteliales Caco-2. Para ello se emplearon dos métodos de extracción: uno térmico y otro enzimático. Con el fin de caracterizar ambos extractos, se determinó el contenido global de proteínas y polisacáridos presentes en cada caso. De forma adicional, se estudió la composición en azúcares de las manoproteínas para cada uno de los extractos obtenidos (Tabla 4.1.).

La composición de cada extracto resultó ser dependiente del método de extracción empleado. El extracto enzimático (ME) presentó una proporción mayor de polisacáridos (90,9%) que el obtenido por el método térmico (MT) (66,1%), mientras que la fracción proteica fue mayor en MT (31,3%) que en ME (9,9%). En ambos casos, la manosa fue el azúcar mayoritario presente en las glicoproteínas, lo que permite admitir que a pesar del método de extracción empleado, las manoproteínas fueron el componente principal de ambos extractos.

**Tabla 4.1.** Composición porcentual de proteínas y polisacáridos de ME y MT de paredes celulares de *S. cerevisiae*. Datos expresados como la media del %  $\pm$  la desviación estándar para N=3, n= 3.

Método de extracción	Proteínas	Polisacáridos	Manosa	Glucosa
ME	9,9 $\pm$ 0,2	90,9 $\pm$ 0,5	78,0 $\pm$ 0,4	10,9 $\pm$ 0,3
MT	31,3 $\pm$ 0,1	66,1 $\pm$ 1,6	61,3 $\pm$ 1,2	4,9 $\pm$ 0,3

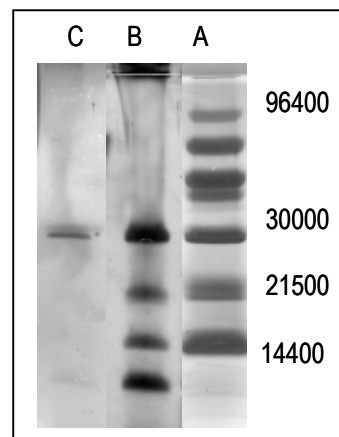
Tal como se ha visto aquí, en estudios previos se ha descrito que los métodos de extracción empleados para obtener manoproteínas a partir de las levaduras podrían influir en su composición y sus propiedades tecnológicas (Freimund *et al.*, 2003; Dupin *et al.*, 2000), En este apartado hemos comprobado cómo la composición del extracto de manoproteínas varía en dependencia del método de extracción utilizado.

En la Figura 4.2. se muestran los resultados obtenidos en la caracterización molecular de los extractos de manoproteínas obtenidos (ME y MT) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Ambos extractos presentaron una banda proteica correspondiente a una masa molecular relativa de 30 KDa. Además de esto, se detectaron tres bandas en el extracto térmico, con masas moleculares relativas entre 10 y 21,5 KDa, las cuales no estaban presentes en el extracto obtenido enzimáticamente.

Los resultados obtenidos muestran que la extracción térmica produce fracciones proteicas más heterogéneas que las obtenidas mediante procedimientos enzimáticos. Esto puede ser debido a que los métodos enzimáticos son capaces de cortar en un punto específico del anclaje de las manoproteínas en la pared celular, mientras que el procedimiento térmico utilizado facilita una ruptura



menos específica de los enlaces no covalentes, lo que produce una fracción proteica más heterogénea que la obtenida con procedimientos enzimáticos (Dupin *et al.*, 2000).



**Figura 4.2.** Análisis por electroforesis SDS-PAGE de ME y MT. Columna A: marcador de peso molecular; B: extracto térmico (MT) y C: extracto enzimático (ME). Los pesos moleculares de los estándares se encuentran en el lado derecho del gel.

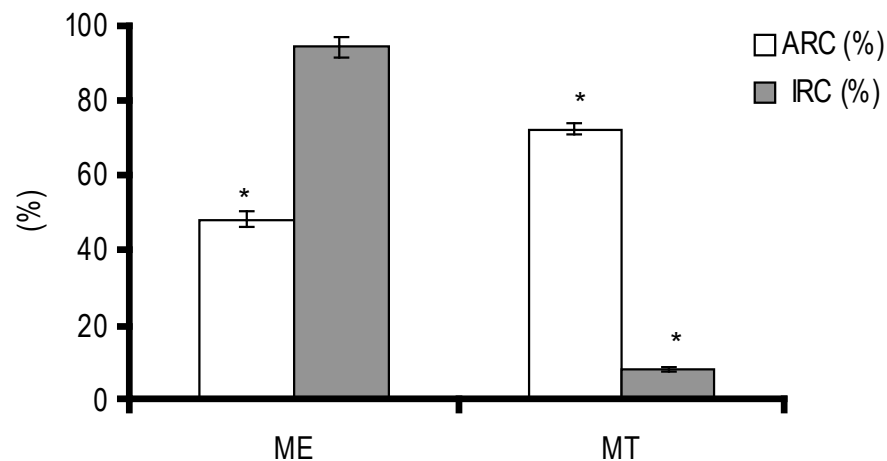
#### 4.3.3. Efecto de MT y ME sobre la adherencia e invasividad de *Campylobacter*

Se determinó el efecto de los extractos MT y ME sobre la viabilidad de cultivos no diferenciados de Caco-2 (Tabla A.5.) y de *C. jejuni* LP1 (Tabla A.6.), utilizando una concentración de 15 mg/mL, y no se encontraron variaciones significativas en este parámetro en presencia de los extractos de manproteínas ( $p>0,05$ ).

De igual manera, se estudió la influencia ME y MT sobre la adherencia e invasividad de *C. jejuni* LP1 a células Caco-2 (Figura 4.3.). La ME fue capaz de inhibir la adherencia de *Campylobacter* a las células Caco-2 y presentó un valor medio de ARC de 48,1%, similar al obtenido para la manosa (44%). Sin embargo, la fracción de ME apenas influyó en la invasión celular, obteniéndose un valor medio para IRC (94%), muy superior al observado con la manosa (12%). La fracción de MT presentó una menor capacidad para inhibir la adherencia, con un ARC de 72,3%; sin embargo fue capaz de inhibir significativamente la invasión de *C. jejuni* a las células Caco-2, en una proporción del 91,9%, lo que corresponde a un IRC de 8,1%.

Los resultados obtenidos muestran que las diferencias de composición entre los dos extractos se reflejan en su capacidad de interferir en los procesos de adherencia e invasividad de *C. jejuni* LP1.

El hecho de que el extracto ME haya presentado una cantidad de manosa polimérica más alta podría explicar su mayor poder antiadherente, tal como ha sido descrito por otros autores al emplear manosa (Sharon, 2006; Fernandez *et al.*, 2002). Además de contener polímeros de manosa, el extracto MT es rico en proteínas, lo que podría estar relacionado con la inhibición de la invasividad observada al emplear este compuesto.

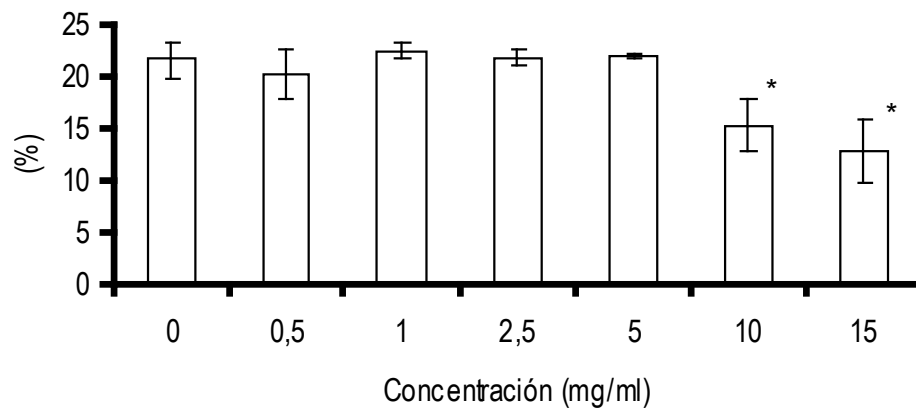


**Figura 4.3.** Influencia de ME y ME (15 mg/mL) sobre la adherencia e invasividad de *C. jejuni* LP1 a cultivos de células epiteliales Caco-2 no diferenciadas. Resultados expresados como la media de las bacterias adheridas con respecto al control (ARC) o de bacterias invasoras con respecto al control (IRC)  $\pm$  la desviación estándar para N=3, n=2. (\*) Significativamente diferente al control ( $p \leq 0,05$ ).

Debido a la efectividad presentada por el extracto MT sobre la invasividad de *C. jejuni* a cultivos de Caco-2, se determinó el efecto de la concentración del mismo (Figura 4.4.).

Se observó que el efecto del extracto de MT sobre la invasividad de *C. jejuni* LP1 es dependiente de la concentración del compuesto y que al emplear concentraciones de 10 y 15 mg/mL del extracto MT se obtiene una disminución significativa de la invasión con respecto al control.

En estudios previos realizados con otros carbohidratos que presentan actividad antiadhesiva se ha visto que el efecto observado resulta directamente proporcional a la concentración utilizada del compuesto (Strickling *et al.*, 2000).



**Figura 4.4.** Influencia de diferentes concentraciones (0; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 15 mg/mL) de MT sobre la invasividad de *C. jejuni* LP1 a cultivos de células epiteliales Caco-2 no diferenciadas. Resultados expresados como la media de las bacterias invasoras con respecto al control (IRC)  $\pm$  la desviación estándar para N=3, n = 2. (\*) Significativamente diferente al control ( $p \leq 0,05$ ).

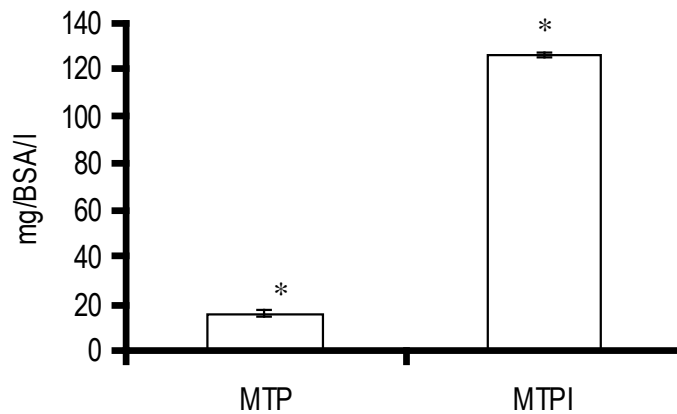
#### 4.3.4. Influencia de la fracción proteica y efecto de la hidrólisis ácida de MT sobre la adherencia e invasividad de *Campylobacter*

Los resultados obtenidos previamente indican que la fracción proteica presente en el extracto de MT podría tener un papel significativo en el efecto observado sobre la adherencia e invasividad de *C. jejuni* LP1. Con el fin de estudiar la influencia de su fracción proteica, las MT se hidrolizaron enzimáticamente empleando una mezcla comercial de proteasas (Pronasa) capaz de actuar tanto sobre las proteínas nativas como sobre las desnaturalizadas, sin afectar la fracción glucídica de las manoproteínas.

Para confirmar la acción proteolítica de la mezcla de enzimas, se determinó el perfil proteico de la fracción de manoproteínas obtenidas por extracción térmica (MT) tras ser tratada con la mezcla activa (MTP) y después de ser inactivada por calor (MTPI) como control (Figura 4.5.).

Se observó que la mezcla de proteasas es capaz de hidrolizar la mayor parte de las proteínas presentes en la fracción MT, dado que la fracción MTP presentó una concentración de proteínas de

15,57 ± 1,28 mg/BSA/L, mientras que la concentración de proteínas de MTPI resultó significativamente mayor, con una media de 126,59 ± 0,77 mg/BSA/L.



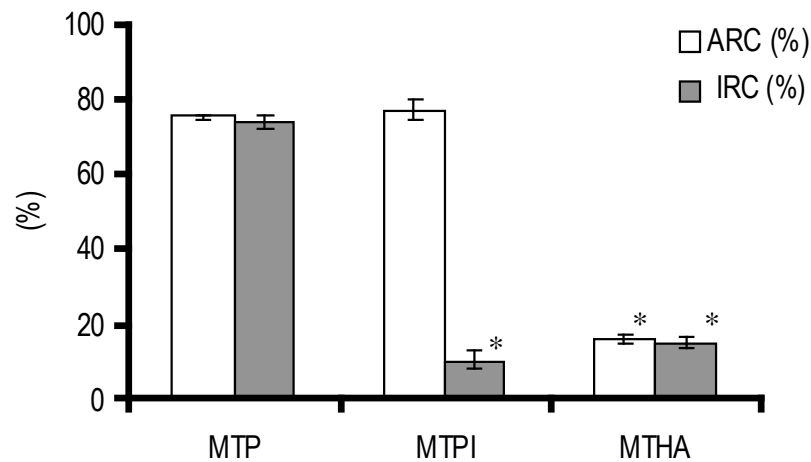
**Figura 4.5.** Perfil proteico de la fracción de MTP (manoproteína térmica con pronasa) y MTPI (manoproteína térmica con pronasa inactiva). Resultados expresados como mg/BSA/L ± la desviación estándar para N=3, n=2. (\*) Significativamente diferentes entre sí ( $p \leq 0,05$ ).

Además de la posible influencia de la fracción proteica de las manoproteínas sobre la adherencia e invasividad de *C. jejuni* LP1, la disponibilidad de los grupos de D-manosa podría constituir otra variable importante. Para estudiar el efecto del grado de disponibilidad de los grupos manosa en el extracto MT, se llevó a cabo una hidrólisis ácida del extracto (MTHA), con el fin de aumentar la presencia de monómeros de manosa disponibles para competir por los sitios de adherencia celular.

Seguidamente, se estudió la influencia de MTHA, MTP y MTPI (15 mg/mL) sobre la adherencia e invasividad de *C. jejuni* LP1 a cultivos de Caco-2 no diferenciados (Figura 4.6). Antes de esto, se determinó que ninguno de los tres extractos empleados (MTHA, MTP y MTPI) afectan de manera significativa la viabilidad de cultivos de Caco-2 no diferenciados (Tabla A.5.), ni de *C. jejuni* LP1 (Tabla A.6.) ( $p > 0,05$ ).

Los extractos MTP y MTPI presentaron valores semejantes de adherencia con respecto al control, con unos valores de ARC de 75,3 % y 77 %, respectivamente, sin mostrar diferencias significativas entre sí ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, la hidrólisis de la porción proteica de las manoproteínas sí afectó la capacidad de invasión a las células epiteliales Caco-2, lo que se refleja en que al utilizar MTPI se obtuvieron valores de IRC significativamente menores ( $p \leq 0,05$ ) que al usar MTP, lo que sugiere que

las fracciones proteicas de las manoproteínas juegan un rol fundamental en el efecto antiinvasivo del extracto MT.



**Figura 4.6.** Influencia de los extractos de manoproteínas térmicas (15 mg/mL) sometidos a hidrólisis ácida (MTHA), e hidrolizados con pronasa (MTP) y su control preparado con pronasa inactiva (MTPI) sobre la adherencia e invasividad de *C. jejuni* LP1 a cultivos de células epiteliales Caco-2 no diferenciadas. Resultados expresados como la media de las bacterias adheridas con respecto al control (ARC) o de bacterias invasoras con respecto al control (IRC)  $\pm$  la desviación estándar para N=3, n = 3. (\*) Significativamente diferente al control ( $p \leq 0,05$ ).

Estos resultados parecen indicar que la fracción proteica de las manoproteínas interviene en el efecto observado, interfiriendo en la adherencia efectiva de *C. jejuni* LP1 a las células epiteliales e impidiendo la internalización del patógeno. Se ha descrito previamente que la fracción proteica de las glicoproteínas puede promover el establecimiento de uniones débiles con la célula, debidas principalmente a enlaces hidrofóbicos y a fuerzas de Van der Waals (Tuomola *et al.*, 1998).

Aunque entre las fracciones de manoproteínas estudiadas MT presentó la mayor capacidad para inhibir la invasión de *C. jejuni* a células epiteliales Caco-2, sus propiedades antiadherentes fueron menores que las observadas para el extracto enzimático de manoproteínas (ME) y para la manosa. Estos resultados podrían indicar que no todas las unidades de manosa presentes en las manoproteínas se encontraban disponibles para competir con *Campylobacter* por los sitios de unión a la célula. Se llevó a cabo entonces la hidrólisis ácida de MT, con el propósito de aumentar la disponibilidad de monómeros activos de manosa capaces de competir por la adherencia a la célula.

En los resultados obtenidos se puede observar que, después de la hidrólisis (MTHA), se produjo una disminución significativa ( $p \leq 0,05$ ) en la adherencia de *C. jejuni* a las células Caco-2, lo que

confirma la importancia de la manosa expuesta y no polimerizada para el proceso de adherencia del patógeno. El valor medio obtenido para ARC fue de 16%, lo que representa el mínimo obtenido para esta variable en los experimentos realizados. Sin embargo, la hidrólisis ácida afectó en cierto grado el valor de IRC, que presentó un valor medio del 15%.

#### **4.3.5. Efecto de MTHA sobre la adherencia e invasividad de otros patógenos bacterianos asociados a pollos**

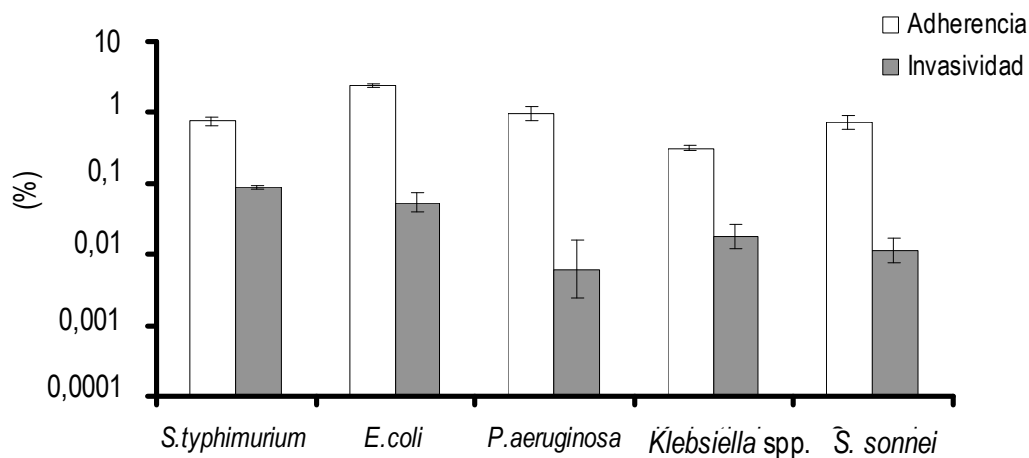
Aunque el objetivo principal de este capítulo es el estudio del efecto de las manoproteínas sobre *Campylobacter*, resulta también de interés conocer si la fracción de manoproteínas que presentó más actividad frente a *Campylobacter* puede ser de utilidad potencial para el control de otros patógenos intestinales. Tal es el caso de *Salmonella* spp., *E. coli*, *Clostridium* spp., *Shigella* spp. y *Klebsiella* spp., bacterias que al igual que *Campylobacter* spp., son considerados patógenos bacterianos causantes de enfermedades gastrointestinales asociadas a alimentos (Cardoso *et al.*, 2006; Ibrahim *et al.*, 2004; Schroeder *et al.*, 2003; Sackey *et al.*, 2001; Wasfy *et al.*, 2000; Kottom *et al.*, 1995).

Otras especies, como *P. aeruginosa*, pueden actuar como patógenos oportunistas y se han asociado a enfermedades en humanos (Kunert *et al.*, 2007; Sadikot *et al.*, 2005; Aoki *et al.*, 2004), causando también infecciones en pollos y otras aves, y provocando una alta tasa de mortalidad en animales contaminados (Hebat-Allah y Halim, 2004; Walker *et al.*, 2001; Bapat *et al.*, 1985).

Por tratarse de bacterias patógenas, y dado a que la habilidad de adherirse y de penetrar en las células epiteliales es común a gran cantidad de microorganismos patógenos (Finlay y Falkow, 1989a), se estudiaron las diferencias en cuanto al nivel de adherencia e invasividad de *E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium* ATCC 1428, *Klebsiella* spp., *S. sonnei* CECT 457 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 a células Caco-2 (Figura 4.7.).

Para los ensayos de invasividad se emplearon las concentraciones mínimas de gentamicina necesarias para inhibir completamente el crecimiento de las bacterias extracelulares, determinadas en las pruebas de optimización cuyos resultados se encuentran en la Tabla A.4. De igual manera, antes de la realización de estas pruebas, se determinó que las condiciones de incubación a las que son sometidas las bacterias durante las pruebas de adherencia/incubación, no afectan de manera significativa la viabilidad de ninguna de las cepas (Tabla A.1.).

En la Figura 4.7. se puede observar que todas las cepas estudiadas tienen la capacidad de adherirse e invadir las células epiteliales Caco-2, y que solamente una parte de las células adheridas tiene la capacidad de invadir las mismas, observándose una gran variabilidad entre el comportamiento de las diferentes cepas estudiadas. El mayor porcentaje de adherencia a los cultivos de Caco-2 fue alcanzado por *E. coli* ATCC 25922, mientras que *Klebsiella* spp. IFb correspondió a la de menor adherencia. *S. typhimurium* ATCC 1428, por otra parte, presentó la mayor tasa de invasividad, mientras que *P. aeruginosa* ATCC 27853 fue la cepa menos invasora.



**Figura 4.7.** Adherencia e invasividad de *S. typhimurium* ATCC 1428, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella* spp. IFb y *S. sonnei* CECT 457 a cultivos de células epiteliales Caco-2 no diferenciadas. Resultados expresados como la media del porcentaje de adherencia o invasividad  $\pm$  la desviación estándar para N=3, n=2.

Se han llevado a cabo numerosos trabajos de investigación empleando cultivos de Caco-2 para estudiar fenómenos de adherencia e invasividad en *E. coli* (Guo y Xu Zi, 2004; Coconnier *et al.*, 1993; Darfeuille-Michaud *et al.*, 1990; Knutton *et al.*, 1987), *Salmonella* (Kottom *et al.*, 1995; Coconnier *et al.*, 1993; Finlay y Falkow, 1990), *P. aeruginosa* (Kim y Wei, 2007; Hirakata *et al.*, 1998), *Klebsiella* (Di Martino *et al.*, 1997; Darfeuille-Michaud *et al.*, 1992) y *Shigella* (Pédron *et al.*, 2003), demostrando que diferentes cepas de estas especies tienen la capacidad de adherirse e invadir epitelios celulares Caco-2 con mayor o menor efectividad.

Como se comentó previamente, la adhesión de patógenos a las células epiteliales del hospedador requiere de dos factores fundamentales: un receptor celular y una adhesina bacteriana (Falkow, 1991; Finlay y Falkow, 1989b).

Los resultados obtenidos por nosotros muestran que el nivel de adherencia no se relaciona de manera directa con los resultados de invasividad y que no todas las bacterias que se adhieren a la superficie de las células epiteliales, son capaces de invadir a las mismas.

En todas estas especies estudiadas se han detectado también cepas que presentan resistencia a antibióticos, como es el caso de *Salmonella* spp. (Mandal *et al.*, 2006; Duffy *et al.*, 1999; Boonmar *et al.*, 1998; Brisabois *et al.*, 1997), *E. coli* (Kose *et al.*, 2007; Wiener *et al.*, 1999; Nijsten *et al.*, 1996), *Klebsiella* spp. (Paterson *et al.*, 2004; Wiener *et al.*, 1999; Darfeuille-Michaud *et al.*, 1992), *Shigella* spp. (Merino *et al.*, 2004; Aseffa *et al.*, 1997; Lima *et al.*, 1997; Materu *et al.*, 1997) y *P. aeruginosa* (Georges *et al.*, 2006; Brown e Izundu, 2004; Carmeli *et al.*, 1999). Por tanto, el hecho de disponer de alternativas naturales a los antibióticos presenta un gran interés desde el punto de vista práctico.

Debido a la efectividad presentada por el extracto de manoproteínas MTHA como agente antiadherente y antiinvasivo contra *Campylobacter* spp., se estudió el efecto de este extracto sobre *S. typhimurium* ATCC 1428, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella* spp. IFb y *S. sonnei* CECT 457. Para ello, en primer lugar se estudió la influencia de la fracción de manoproteínas sobre la viabilidad de las diferentes especies bacterianas (Anexo A.6.), lo que permitió determinar que la viabilidad no se afecta de manera significativa en ninguno de los casos ( $p > 0,05$ ).

Antes de llevar a cabo estos ensayos, se determinó la influencia de las condiciones de incubación empleadas en las pruebas de adherencia e invasividad (5% de CO<sub>2</sub> durante 1 ó 3 h, respectivamente) sobre las cepas bacterianas estudiadas, y se determinó que la viabilidad de éstas no varía con respecto a la observada bajo las condiciones aerobias de incubación (Anexo A.1.). Los resultados obtenidos con respecto al efecto del extracto de MTHA sobre la adherencia e invasividad a células Caco-2 de las cepas comentadas se presentan en la Tabla 4.2.

Los resultados muestran que cada especie bacteriana se ve afectada de manera diferente por el extracto de MTHA utilizado. En el caso de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Klebsiella* spp., se observa un incremento de la adherencia en presencia de MTHA ( $p \leq 0,05$ ), en especial en el caso de ésta última. Sin embargo, MTHA parece disminuir de manera significativa ( $p \leq 0,05$ ) la adherencia de *S. typhimurium* ATCC 1428 y *S. sonnei* CECT 457.



**Tabla 4.2.** Influencia del extracto de MTHA (15 mg/mL) sobre la adherencia e invasividad de *S. typhimurium* ATCC 1428, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella* spp. IFb y *S. sonnei* CECT 457 a cultivos de células epiteliales Caco-2 no diferenciadas. Resultados expresados como la media de las bacterias adheridas con respecto al control (ARC) o de bacterias invasoras con respecto al control (IRC)  $\pm$  la desviación estándar para N=3, n = 3. (\*) Significativamente diferente al control ( $p \leq 0,05$ ).

Bacteria	% ARC	% IRC
<i>S. typhimurium</i> ATCC 1428	9,70 $\pm$ 2,45*	19,85 $\pm$ 6,72*
<i>E. coli</i> ATCC 25922	140,40 $\pm$ 10,82*	0,24 $\pm$ 0,00*
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	115,2 $\pm$ 13,51*	81,76 $\pm$ 24,09*
<i>Klebsiella</i> spp. IFb	255,38 $\pm$ 92,44*	1,06 $\pm$ 0,00*
<i>S. sonnei</i> CECT 457	33,53 $\pm$ 6,17*	1,26 $\pm$ 0,00*

Con anterioridad se ha observado que algunas sustancias son capaces de promover la adhesión de algunos enteropatógenos a cultivos de células epiteliales. Por ejemplo, Lee y Puong (2002a), observaron que algunos carbohidratos como glucosa, galactosa, fucosa, fructosa y sacarosa pueden aumentar la adherencia de *E. coli* y *Salmonella* spp. a cultivos de Caco-2.

Uno de los sistemas de adherencia bacteria-célula que más se ha estudiado y que se encuentra mejor caracterizado es el de las fimbrias tipo I, presente en varios miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, y que incluye a *E. coli* (Elliott y Kaper, 1997; Adlerberth *et al.*, 1995; Salit y Gotschlich, 1977), *Salmonella* (De Buck *et al.*, 2003; Naughton *et al.*, 2001; Dibb-Fuller *et al.*, 2000; Dibb-Fuller *et al.*, 1999; Ewen *et al.*, 1997; Korhonen *et al.*, 1980), *Klebsiella* (Huang *et al.*, 2006; Tarkkanen *et al.*, 1997; Fader *et al.*, 1982) y *Shigella* (Snellings *et al.*, 1997; Gbarah *et al.*, 1993; Deguid y Old, 1980). En numerosos estudios se ha demostrado que la adherencia a células epiteliales de patógenos que presenten fimbrias tipo I es inhibida por oligosacáridos que contienen D-manosa (Pan *et al.*, 1997; Craven *et al.*, 1992; Oyofe *et al.*, 1989c; Jones y Richardson, 1981).

No obstante, se ha visto que cada bacteria puede exhibir más de un mecanismo de adherencia. En este sentido se ha determinado que los microorganismos pueden presentar diferentes adhesinas que se expresan bajo distintas condiciones ambientales y según las características del tejido del hospedador (Ensgraber y Loos, 1992; Collinson *et al.*, 1991; Vaisanen, 1984). Lo anterior podría explicar las diferencias en el nivel de adhesividad de las cepas *E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium* ATCC 1428, *Klebsiella* spp. IFb y *S. sonnei* CECT 457 observadas en este estudio.

Además de esto, se ha observado que existe una heterogeneidad significativa en la afinidad de adherencia de las fimbrias tipo I por determinados compuestos manosilados entre diferentes géneros e incluso dentro de una misma especie (Sokurenko *et al.*, 1995; Sokurenko *et al.*, 1994), lo que podría justificar las diferencias observadas entre las tasas de adherencia en las distintas especies con fimbrias tipo I estudiadas.

A diferencia de lo que ocurre con *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* y *Klebsiella*, se ha visto que *P. aeruginosa* se une a las células epiteliales intestinales del hospedador principalmente mediante fimbrias de tipo IV. A pesar de que la naturaleza de los receptores de dichas fimbrias en el hospedador no ha sido esclarecida hasta el momento (Thomas y Brooks, 2004; Stone y Kwaik, 1998), se ha visto que la adherencia de este patógeno oportunista a las células epiteliales no es afectada por la presencia de D-manosa (Beuth *et al.*, 1987).

En nuestros resultados se observa que la invasividad de todas las cepas estudiadas disminuye de manera significativa ( $p \leq 0,05$ ) en presencia de MTHA, siendo las más afectadas *E. coli*, *Klebsiella* spp. y *S. sonnei*, con una disminución de 0,24%; 1,06% y 1,26%, respectivamente.

De nuestro estudio se puede deducir que un aumento de la adherencia no necesariamente conlleva un mayor grado de invasión de los epitelios celulares. En este sentido se ha visto que para que *Salmonella* y otros patógenos sean capaces de invadir células eucariotas se requiere de la síntesis de varias proteínas bacterianas, denominadas invasinas, y que dicha síntesis se puede llevar a cabo únicamente si la adherencia a la superficie de la célula del hospedador ha ocurrido de manera irreversible (Finlay y Falkow, 1989b). Lo anterior constituye otro ejemplo para demostrar que una adherencia efectiva es esencial para que ocurra la invasión celular, y que no siempre la adherencia se lleva a cabo de una manera efectiva.

Aunque se necesitan más estudios en este sentido en los que se aborden variables como el efecto cepa, de los resultados obtenidos en este apartado mediante el empleo de MTHA se puede deducir que los extractos de manoproteínas ricos en manosa podrían constituir una alternativa eficaz para disminuir la adherencia y/o la invasividad de otros patógenos intestinales como *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella* y *Shigella*, y de algunos patógenos oportunistas como *P. aeruginosa*.

#### 4.3.6. Efecto de MTHA sobre bacterias potenciales probióticas para pollos

La microbiota residente en el tracto gastrointestinal del hospedador juega un rol importante como inhibidora de la colonización por parte de patógenos, ya sea por medio de la competencia específica por los receptores celulares, por la producción de metabolitos antimicrobianos o debido al mejoramiento de la respuesta inmune del hospedador (Neeser *et al.*, 2000).

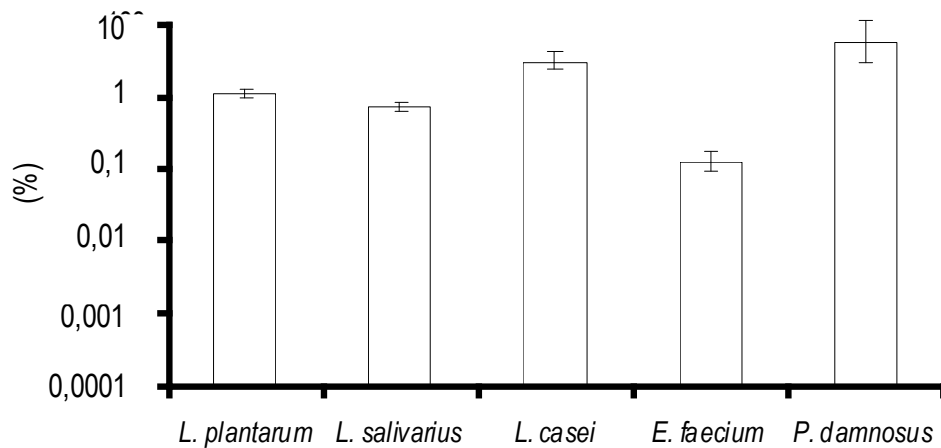
Se han llevado a cabo numerosos estudios en los que se emplean bacterias pertenecientes a la microbiota de pollos con el fin de evitar su colonización por bacterias patógenas. Dichos microorganismos constituyen potenciales probióticos e incluyen algunas cepas de *Bifidobacterium* spp. (Jung *et al.*, 2008; Willis y Reid, 2008), *Pediococcus* spp. (Lee *et al.*, 2007), *E. faecium* (Willis y Reid, 2008; SamLi *et al.*, 2007; Audisio *et al.*, 2000; Netherwood *et al.*, 1999; Morishita *et al.*, 1997), y *Lactobacillus* spp., entre los que se encuentran cepas como *L. plantarum* (Heres *et al.*, 2004; Heres *et al.*, 2003), *L. salivarius* (Wolfenden *et al.*, 2007; Lan *et al.*, 2004; Rada y Rychly, 1995), *L. casei* y *L. acidophilus* (Willis y Reid, 2008).

Al igual que en el caso de los enteropatógenos estudiados en este capítulo, el modelo de células epiteliales Caco-2 se ha empleado extensivamente para el estudio de la adherencia de bacterias lácticas al intestino (Lee *et al.*, 2003; Lee y Puong, 2002; Granato *et al.*, 1999; Bernet-Camard *et al.*, 1997; Bernet *et al.*, 1994). Tomando en cuenta esta premisa, y considerando que la habilidad de adherirse a la mucosa intestinal es un requisito importante para los microorganismos que se consideran probióticos, ya que permite al menos una colonización temporal del tracto intestinal animal y humano (Alander *et al.*, 1999; Ouwehand *et al.*, 1999), se estudió la adherencia e invasividad a células Caco-2 no diferenciadas de cinco potenciales bacterias probióticas de pollos (Figura 4.8.).

Ninguna de las cepas estudiadas logró invadir de manera efectiva los cultivos de células Caco-2 (datos no mostrados), lo que podría interpretarse como un indicador de su ausencia de patogenicidad, característica de interés a la hora de seleccionar bacterias probióticas.

A pesar de lo anterior, todas las cepas se adhirieron a los cultivos epiteliales, correspondiendo las mayores tasas de adherencia a *P. damnosus*, *L. casei* y *L. plantarum*. Con antelación se ha visto que la adherencia de las bacterias ácido lácticas a las mucosas intestinales depende más de la cepa bacteriana que del hospedador (Rinkinen *et al.*, 2003), lo que indica que las cepas de *P. damnosus*, *L. casei* y *L. plantarum* empleadas en nuestro estudio cumplen con este requisito que es de utilidad para ser consideradas como potenciales probióticos tanto en pollos como en humanos.

Al igual que ocurre con otros microorganismos, la adherencia de los lactobacilos a las células epiteliales intestinales está mediada por mecanismos múltiples. Además, las adhesinas involucradas varían de una cepa a otra (Craven *et al.*, 1998; Adlerberth *et al.*, 1996), lo que podría explicar las diferencias encontradas entre las distintas cepas estudiadas.

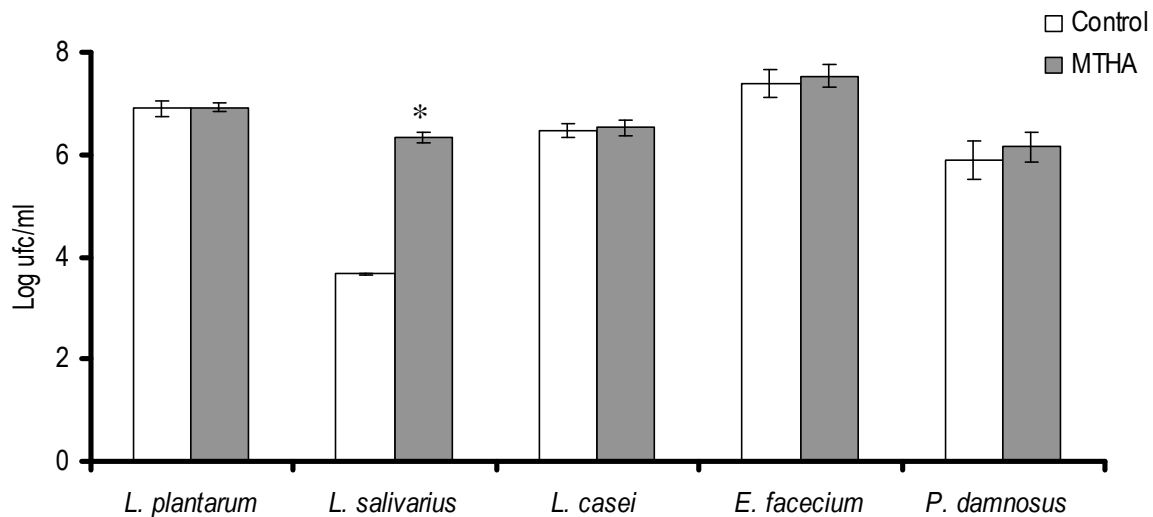


**Figura 4.8.** Adherencia e invasividad de *L. plantarum* ATCC 10241, *L. salivarius* IFa, *L. casei* CECT 475, *E. faecium* BIFI-58 y *P. damnosus* DSM 20331 a cultivos de células epiteliales Caco-2 no diferenciadas. Resultados expresados como media del % de adherencia o invasividad  $\pm$  la desviación estándar para N=3, n=2.

Una vez determinado el perfil de adherencia de las cepas potencialmente probióticas para pollos, se estudió el efecto de la presencia del extracto de manoproteínas MTHA (15 mg/mL) sobre su crecimiento (Figura 4.9.). Se obtuvo que si bien el compuesto no afecta la viabilidad de *L. plantarum*, *L. casei*, *E. faecium* y *P. damnosus*; las poblaciones de *L. salivarius* se ven favorecidas de manera significativa ( $p \leq 0,05$ ) en su presencia.

Los manooligosacáridos y algunas proteínas no son hidrolizados por las enzimas digestivas endógenas en el intestino delgado, y sí lo son por algunas cepas de lactobacilos y bifidobacterias de manera preferencial en el intestino grueso, lo que permitiría considerar algunos de estos compuestos como potenciales candidatos a prebióticos (Lyons, 1994; Miles, 1993; Cummings y Macfarlane, 1991). Lo anterior, podría explicar el incremento en la población de *L. salivarius* observado en nuestros resultados. Este aumento podría ser beneficioso para la salud gastrointestinal de pollos y humanos, ya que en otros estudios se ha visto que la presencia de *L. salivarius* puede prevenir la colonización de

algunos patógenos como *S. enteritidis* (Pascual *et al.*, 1999). Además de esto, se ha visto que *L. salivarius* es capaz de producir bacteriocinas efectivas contra patógenos como *Campylobacter* (Stern *et al.*, 2006), *E. coli* (Lim *et al.*, 2007) y *L. monocytogenes* (Corr *et al.*, 2007).

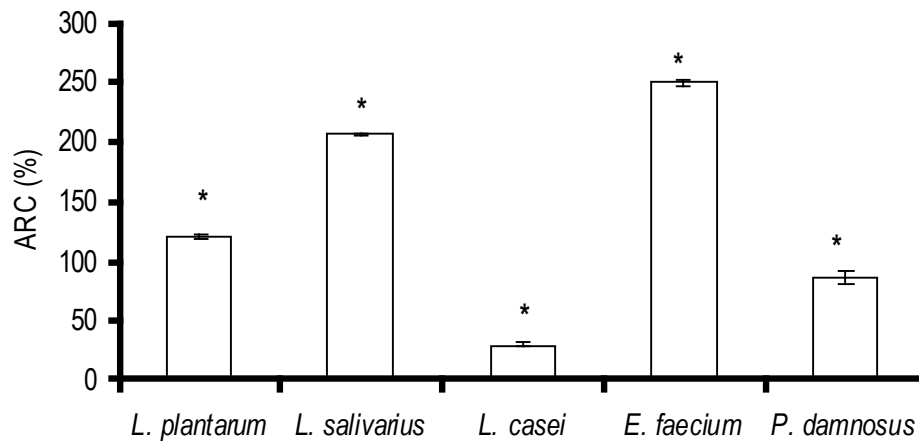


**Figura 4.9.** Influencia del extracto de manoproteínas (15 mg/mL) sometido a hidrólisis ácida (MTHA) sobre el crecimiento de *L. plantarum* ATCC 10241, *L. salivarius* IFa, *L. casei* CECT 475, *E. faecium* BIFI-58 y *P. damnosus* DSM 20331. Resultados expresados como la media del Log ufc/mL  $\pm$  la desviación estándar para N=2, n=2. (\*) Significativamente diferente al control ( $p \leq 0,05$ ).

Basándose en lo anterior, se determinó el efecto del extracto de MTHA (15 mg/mL) sobre la adherencia de *E. faecium* BIFI-58, *L. salivarius* IFa, *L. plantarum* ATCC 10241, *L. casei* CECT 475 y *P. damnosus* DSM 20331 a células Caco-2 no diferenciadas (Figura 4.10.). Cabe destacar que debido al incremento en el crecimiento bacteriano observado para *L. salivarius* en presencia de MTHA, la concentración del inóculo se ajustó según la concentración del control antes de llevar a cabo estas pruebas. De igual manera, antes de la realización de los ensayos, se determinó que las condiciones de incubación a las que son sometidas las bacterias durante los estudios de adherencia, no afectan de manera significativa la viabilidad de ninguna de las bacterias (Tabla A.1.).

La presencia del extracto MTHA parece favorecer de manera significativa la adherencia a las células Caco-2 de tres de las cinco cepas estudiadas. Los mayores incrementos correspondieron a *E. faecium* (ARC = 250%), y en menor medida a *L. salivarius* (ARC = 206%) y *L. plantarum* (ARC = 120%). En el caso de *P. damnosus* y *L. casei*, se observó una disminución de la adherencia con

respecto al control en presencia de las manoproteínas, con valores de ARC de 86% y 30%, respectivamente.



**Figura 4.10.** Influencia del extracto de manoproteínas (15 mg/mL) sometido a hidrólisis ácida (MTHA) sobre la adherencia de *L. plantarum* ATCC 10241, *L. salivarius* IFa, *L. casei* CECT 475, *E. faecium* BIFI-58 y *P. damnosus* DSM 20331 a cultivos de células epiteliales Caco-2 no diferenciadas. Resultados expresados como la media de las bacterias adheridas con respecto al control (ARC)  $\pm$  la desviación estándar para N=3, n = 3. (\*) Significativamente diferente al control ( $p \leq 0,05$ ).

Las razones de estas diferencias no son claras y en principio se desconocen los mecanismos que hacen que en algunas de las cepas estudiadas aumente la adherencia mientras que en otras disminuya. Sin embargo, los resultados sugieren que en los mecanismos de adherencia difieren entre las distintas cepas.

Previamente, algunos autores han encontrado que algunas bacterias lácticas comparten sitios de unión con ciertos enteropatógenos (Neeser *et al.*, 2000). Esta característica se ha observado en cepas de *L. johnsonii*, *L. plantarum* y otros lactobacilos, cuya adherencia a células Caco-2 está mediada por un receptor específico para manosa similar al encontrado en *E. coli* (Sun *et al.*, 2007; So-Young *et al.*, 2006; Neeser *et al.*, 2000; Adlerberth *et al.*, 1996). En estos casos, se ha visto que la adherencia de estos lactobacilos se inhibe en presencia de manosa (Sun *et al.*, 2007; So-Young *et al.*, 2006).

Otros autores han encontrado que la adherencia de *L. johnsonii* La1 a células Caco-2 se inhibe frente a paredes de *S. cerevisiae*, aunque se ha visto que sus adhesinas son diferentes a los pili tipo 1

presentes en *E. coli* (Neeser *et al.*, 1986; Firon *et al.*, 1983), o a las fimbrias tipo 1 presentes en *Salmonella* (Firon *et al.*, 1983) y a las adhesinas de *L. plantarum* 299 y 299v (Adlerberth *et al.*, 1996).

Sin embargo, se ha visto que la adherencia de las bacterias lácticas a los epitelios celulares no siempre sigue la misma dinámica y que si la manosa es capaz de inhibir la adherencia de algunas bacterias pertenecientes a este grupo, no lo es en el caso de otras como *L. rhamnosus* GG (Lee y Puong, 2002), *L. acidophilus* y *L. bulgaricus* (Conway *et al.*, 1987), lo que confirma que son varios los mecanismos que pueden intervenir en la adherencia de las bacterias lácticas a las células epiteliales.

Los resultados obtenidos sugieren que la inclusión de manoproteínas en la dieta de pollos puede ser de utilidad para el control de *Campylobacter* y otros patógenos, pudiendo además ejercer efectos positivos sobre parte de la microbiota beneficiosa. Al favorecer la adherencia y/o el crecimiento de algunas bacterias residentes en el intestino del pollo, se podrían obtener beneficios adicionales como la producción de bacteriocinas y de otros metabolitos de interés, como son los ácidos grasos de cadena corta (Ouwehand y Salminen, 2003), y el aumento de la competencia por sitios de unión y nutrientes entre la microbiota residente y los patógenos, al complementar su dieta con compuestos como el estudiado.

En resumen se puede decir que las manoproteínas extraídas de las paredes celulares de levaduras constituyen una fuente natural potencial de bajo costo para el control de *Campylobacter* y otros patógenos en pollos. Debido al grado alimentario de estos compuestos, también se podría llegar a emplear en humanos.

En futuros trabajos los esfuerzos irán orientados al estudio de los mecanismos moleculares envueltos en la inhibición de los fenómenos de adherencia e invasividad a los epitelios celulares en *Campylobacter* al emplear manoproteínas. También es de particular interés profundizar en el estudio de los mecanismos que regulan el efecto favorable de las manoproteínas sobre algunas bacterias lácticas, así como su carácter prebiótico, con el objetivo de conocer las pautas que regulan este efecto selectivo. Lo anterior facilitará el establecimiento de nuevos métodos y procesos de producción de fracciones de manoproteínas y/o extractos de levaduras para ser empleados como alternativas a los antibióticos en alimentación animal para el control de patógenos o como componente funcional en la dieta de humanos.

#### 4.4. CONCLUSIONES

- 1) Las levaduras de la especie *S. cerevisiae* y paredes celulares aisladas a partir de estas son capaces de reducir de manera significativa la adherencia de *C. jejuni* LP1 a cultivos de Caco-2. Sin embargo, no influyen en la capacidad de invasividad de *Campylobacter* a dichos cultivos.
- 2) El método empleado para la extracción y preparación de la fracción de manoproteínas determina su composición y por tanto, su eficacia en cuanto a la disminución de la adherencia y/o invasividad de *C. jejuni* LP1 a las células Caco-2. El extracto obtenido de manera enzimática resultó útil para la disminución de la adherencia, mientras que el logrado por medios térmicos logró reducir la invasividad de *C. jejuni* LP1 incluso a concentraciones de 10 mg/mL.
- 3) La fracción proteica de las manoproteínas, así como la disponibilidad de los residuos de manosa, influyen en la efectividad de la adherencia entre *Campylobacter* y las células Caco-2.
- 4) La hidrólisis ácida de la fracción de manoproteínas obtenida por extracción térmica (MTHA) resultó ser el extracto de mayor actividad antiadhesiva y antiinvasora contra *C. jejuni* LP1. Este extracto fue capaz de disminuir la invasividad de otras bacterias patógenas asociadas a alimentos, como es el caso de *S. typhimurium* ATCC 1428, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella* spp. IFb y *S. sonnei* CECT 457, y de favorecer selectivamente la adherencia de algunas bacterias lácticas potencialmente prebióticas, como *E. faecium* BIFI-58, *L. salivarius* IFa, *L. plantarum* ATCC 10241, *L. casei* CECT 475 y *P. damnosus* DSM 20331.



## 4.5. BIBLIOGRAFÍA

- Adlerberth, I., Hanson, A.L., Svanborg, C., Svennerholm, A.M., Nordgren, S., Wold, A.E. 1995. Adhesins of *Escherichia coli* associated with extra-intestinal pathogenicity confer binding to colonic epithelial cells *Microbial Pathogenesis* 18: 373-385.
- Adlerberth, I., Ahrne, S., Johansson, M.L., Molin, G., Hanson, L.A., Wold, A.E. 1996. A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2244-2251.
- Alander, M., Satokari, R., Korpela, R., Saxelin, M., Vilpponen-Salmenla, T., Mattila-Sandholm, T., Von Wright, A. 1999. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* LGG, after oral consumption. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 351-354.
- Aoki, S., Hirakata, Y., Kondoh, A., Gotoh, N., Yanagihara, K., Miyazaki, Y., Tomono, K., Yamada, Y., Kohno, S., Kamihira, S. 2004. Virulence of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 1876-1878.
- Aseffa, A., Gedlu, E., Asmelash, T. 1997. Antibiotic resistance of prevalent *Salmonella* and *Shigella* strains in northwest Ethiopia. *Eastern Africa Medical Journal* 74: 708-713.
- Audisio, M.C., Oliver, G., Apella, M.C. 2000. Protective effect of *Enterococcus faecium* J96, a potential probiotic strain, on chicks infected with *Salmonella Pullorum*. *Journal of Food Protection* 63: 1333-1337.
- Bapat, J.A., Kulkarni, V.B., Nimje, D.V. 1985. Mortality in chicks due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian Journal of Animal Science* 55: 538-539.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., Lebrihi, A. 2004. Ochatoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces strains*. *Journal of Applied Microbiology* 7: 1038-1044.
- Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A.L. 1994. *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 35: 483-489.
- Bernet-Camard, M.F., Liévin, V., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A.L., Hudault, S. 1997. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active *in vitro* and *in vivo*. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2747-2753.
- Beuth, J., Ko, H.L., Uhlenbruck, G., Pulverer, G. 1987. Lectin-Mediated bacterial adhesion to human tissue. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 6: 591-593.
- Boonmar, S., Bangtrakulnonth, A., Pornruangwong, S., Samosornsuk, S., Kaneko, K.I., Ogawa, M. 1998. Significant increase in antibiotic resistance of *Salmonella* isolates from human beings and chicken meat in Thailand. *Veterinary Microbiology* 62: 73-80.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 284-255.
- Brisabois, A., Cazin, I., Breuil, J., Collatz, E. 1997. Surveillance of antibiotic resistance in *Salmonella*. *Eurosurveillance* 2: 19-20.
- Brown, P.D., Izundu, A. 2004. Resistencia a antibióticos en cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* en Jamaica. *Revista Panamericana de Salud Pública* 16: 125-130.

Cardoso, W.M., de Oliveira, W.F., Romao, J.M., Sampaio, F.A.C., Moraes, T.G.V., Teixeira, R.S.C., Câmara, S.R., Salles, R.P.R., de Siqueira, A.A., Nogueira, G.C. 2006. Enterobacteria isolation in broiler carcasses from commercial establishments in Fortaleza, Ceará State, Brazil. *Arquivos do Instituto de Direito Social* 73: 383-397.

Carmeli, Y., Troillet, N., Eliopoulos, G.M., Samore, M.H. 1999. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 1379-1382.

Coconnier, M.H., Bernet, M.F., Kernéis, S., Chauvière, G., Fourniat, J., Servin, A.L. 1993. Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Letters* 110: 299-305.

Collinson, S.K., Emody, L., Muller, K.H., Trust, T.J., Kay, W.W. 1991. Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella enteritidis*. *Journal of Bacteriology* 173: 4773-4781.

Conway, P. L., Gorbach, S.L., Goldin, B.R. 1987. Survival of acid lactic bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science* 70: 1-12.

Corr, S.C., Li, Y., Riedel, C.U., O'Toole, P.W., Hill, C., Gahan, C.G.M. 2007. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *The Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 7617-7621.

Craven, S.E., Cox, N.A., Bailey, J.S., Blankenship, L.C. 1992. Binding of *Salmonella* strains to immobilized intestinal mucosal preparations from broiler chickens. *Avian Diseases* 36: 296-303.

Craven, S.E., Williams, D.D. 1998. *In vitro* attachment of *Salmonella typhimurium* to chicken cecal mucus: effect of cations and pre-treatment with *Lactobacillus* spp. isolated from the intestinal tracts of chickens. *Journal of Food Protection* 61: 265-271.

Cummings, J.H., Macfarlane, G.T. 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology* 70: 443-459.

Darfeuille-Michaud, A., Aubel, D., Chauviere, G., Rich, C., Bourges, M., Servin, A., Joly, B. 1990. Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Infection and Immunity* 58: 893-902.

Darfeuille-Michaud, A., Jallat, C., Aubel, D., Sirot, D., Rich, C., Sirot, J., Joly, B. 1992. R-plasmid-encoded adhesive factor in *Klebsiella pneumoniae* strains responsible for human nosocomial infections. *Infection and Immunity* 60: 44-55.

De Buck, J., Van Immerseel, F., Meulemans, G., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. 2003. Adhesion of *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* isolates to chicken isthmal glandular secretions. *Veterinary Microbiology* 93: 223-233.

Deguid, J.P., Old, D.C. 1980. Adhesive properties of Enterobacteriaceae. En: *Bacterial adherence*. Chapman, C., Hall, P. (Ed). B.E.H. Beacheley. Londres. P. 185-217.

Di Martino, P., Sirot, D., Joly, B., Rich, C., Darfeuille-Michaud, A. 1997. Relationship between adhesion to intestinal Caco-2 cells and multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 1499-1503.

Dibb-Fuller, M. P., Allen-Vercoe, E., Thorns, C.J., Woodward, M.J. 1999. Fimbriae- and flagella-mediated association with and invasion of cultured epithelial cells by *Salmonella enteritidis*. *Microbiology* 145: 1023-1031.

- Dibb-Fuller, M.P., Woodward, M.J. 2000. Contribution of fimbriae and flagella of *Salmonella enteritidis* to colonization and invasion of chicks. *Avian Pathology* 29: 295-304.
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Annals of Chemistry* 28: 350-356.
- Duffy, G., Cloak, O.M., O'Sullivan, M.G., Guillet, A., Sheridan, J.J., Blair, I.S., McDowell, D.A. 1999. The incidence and antibiotic resistance profiles of *Salmonella* spp. on Irish retail meat products. *Journal of Food Microbiology* 16: 623-631.
- Dupin, I.V.S., Stockdale, V.J., Williams, P.J., Jones, G.P., Markides, A.J., Waters, E.J. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins that protect wine from protein haze: evaluation of extraction methods and immunolocalization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48: 1086-1095.
- Elliott, S.J., Kaper, J.B. 1997. Role of type 1 fimbriae in EPEC infections. *Microbial Pathogenesis* 23: 113-118.
- Engraber, M., Loos, M. 1992. A 66-Kilodalton heat shock protein of *Salmonella typhimurium* is responsible for binding of the bacterium to intestinal mucus. *Infection and Immunity* 60: 3072-3078.
- Ewen, S.W., Naughton, P.J., Grant, G., Sojka, M., Allen-Vercoe, E., Bardocz, S., Thorns, C.J., Puzsai, A. 1997. *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* and *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* express type 1 fimbriae in the rat *in vivo*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 18: 185-192.
- Fader, R.C., Duffy, L.K., Davis, C.P., Kurosky, A. 1982. Purification and chemical characterization of type 1 pili isolated from *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry* 257: 3301-3305.
- Falkow, S. 1991. Bacterial entry into eukaryotic cells. *Cell* 65: 1099-1102.
- Fernandez, F., Hinton, M., Van Gils, B. 2002. Dietary mannan-oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella enteritidis* colonization. *Avian Pathology* 31: 49-58.
- Finlay, B.B., Falkow, S. 1989a. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 53: 210-230.
- Finlay, B.B., Falkow, S. 1989b. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiology Reviews* 53: 210-230.
- Finlay, B.B., Falkow, S. 1990. *Salmonella* interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells. *Journal of Infectious Diseases* 162: 1096-1106.
- Firon, N., Ofek, I., Sharon, N. 1983. Carbohydrate specificity of the surface lectins of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella typhimurium*. *Carbohydrate Research* 120: 235-249.
- Firon, N., Ofek, I., Sharon, N. 1984. Carbohydrate-binding sites of the mannose-specific fimbrial lectins of enterobacteria. *Infection and Immunity* 43: 1088-1090.
- Freimund, S., Sauter, M., Kappeli, O., Dutler, H. 2003. A new non-degrading isolation process for 1,3-beta-D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Polymers* 54: 159-171.
- Gbarah, A., Mirelman, D., Sansonetti, P.J., Verdon, R., Bernhard, W., Sharon, N. 1993. *Shigella flexneri* transformants expressing type 1 (mannose-specific) fimbriae bind to, activate, and are killed by phagocytic cells. *Infection and Immunity* 61: 1687-1693.

- Georges, B., Conil, J.M., Dubouix, A., Archambaud, M., Bonnet, E., Saivin, S., Lauwers-Cances, V., Cristini, V., Cougot, P., Decun, J.F., Mathe, O., Chabanon, G., Marty, P.N., Seguin, T., Houin, G. 2006. Risk of emergence of *Pseudomonas aeruginosa* resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in intensive care units. *Critical Care Medicine* 34: 1636-1641
- Granato, D., Perotti, F., Masserey, I., Rouvet, M., Golliard, M., Servin, A., Brassart, D. 1999. Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1071-1077.
- Guo, T., Xu Zi, R. 2004. Effects of *Escherichia coli* K88 adhesion on membrane characteristics of Caco-2 cells *in vitro*. *Chinese Journal of Cell Biology* 26: 177-180.
- Hebat-Allah, A.E., Halim, M. 2004. Some studies on *Pseudomonas* species in chicken embryos and broilers in Assiut Governorate Assiut University Bulletin of Environmental Research 7: 23-31.
- Heres, L., Engel, B., Van Knapen, F., Wagenaar, J.A., Urlings, B.A.P. 2003. Effect of fermented feed on the susceptibility for *Campylobacter jejuni* colonisation in broiler chickens with and without concurrent inoculation of *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology* 87: 75-86.
- Heres, L. 2004. *Campylobacter* and *Salmonella* control in chickens and the role of fermented food. *Tijdschr Diergeneeskd* 129: 332-335.
- Hirakata, Y., Izumikawa, K., Yamaguchi, T., Igimi, S., Furuya, N., Maesaki, S., Tomono, K., Yamada, Y., Kohno, S., Yamaguchi, K., Kamihira, S. 1998. Adherence to and penetration of human intestinal Caco-2 epithelial cell monolayers by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity* 66: 1748-1751.
- Huang, Y.J., Wu, C.C., Chen, M.C., Fung, C.P., Peng, H.L. 2006. Characterization of the type 3 fimbriae with different MrkD adhesins: Possible role of the MrkD containing an RGD motif. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 350: 537-542.
- Ibrahim, R.S., Mousa, S., Aly, M., Abdel-Naser, W.E. 2004. Complicated infectious coryza in broiler and layer chickens in Upper Egypt. *Assiut Veterinary Medical Journal* 50: 94-108.
- Jones, G.W., Richardson, L.A. 1981. The attachment to and invasion of HeLa cells by *Salmonella typhimurium*: the contribution of mannose-sensitive and mannose-resistant haemagglutinating activities. *Journal of General Microbiology* 127: 361-370.
- Jung, S.J., Houde, R., Baurhoo, B., Zhao, X., Lee, B.H. 2008. Effects of galacto-oligosaccharides and a *Bifidobacteria lactis*-based probiotic strain on the growth performance and fecal microflora of broiler chickens. *Poultry Science* 87: 1694-1699.
- Kim, S.H., Wei, C.I. 2007. Invasiveness and intracellular growth of multidrug-resistant *Salmonella* and other pathogens in Caco-2 cells. *Journal of Food Science* 72: M72-M78.
- Klis, F.M. 1994. Review: Cell Wall Assembly in Yeasts. *Yeasts* 10: 851-869.
- Knutton, S., Lloyd, D.R., McNeish, A.S. 1987. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infection and Immunity* 55: 69-77.
- Korhonen, T.K., Lounatmaa, K., Ranta, H., Kuusi, N. 1980. Characterization of type 1 pili of *Salmonella typhimurium* LT2. *Journal of Bacteriology* 144: 800-805.

- Kose, Y., Abasiyanik, M.F., Salih, B.A. 2007. Antibiotic resistance rates of *Escherichia coli* urinary tract isolates in Rize province, Turkey. *Journal of Infection in Developing Countries* 1: 147-150.
- Kottom, T.J., Nolan, L.K., Brown, J. 1995. Invasion of Caco-2 cells by *Salmonella typhimurium* (Copenhagen) isolates from healthy and sick chickens. *Avian Diseases* 39: 867-872.
- Kunert, A., Losse, J., Gruszyn, C., Hühn, M., Kaendler, K., Mikkat, S., Volke, D., Hoffmann, R., Jokiranta, T.S., Seeberger, H., Moellmann, U., Hellwage, J., Zipfel, P.F. 2007. Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. *The Journal of Immunology* 179: 2979-2988.
- Lan, P.T.N., Sakamoto, M., Benno, Y. 2004. Effects of two probiotic *Lactobacillus* strains on jejunal and cecal microbiota of broiler chicken under acute heat stress condition as revealed by molecular analysis of 16S rRNA genes. *Microbiology and Immunology* 48: 917-929.
- Lee, Y.K., Puong, K.L. 2002. Competition for adhesion between probiotics and human gastrointestinal pathogens in the presence of carbohydrate. *British Journal of Nutrition* 88: S101-S108.
- Lee, Y.K., Puong, K.Y., Ouwehand, A.C. 2003. Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *Journal of Medical Microbiology* 52: 925-930.
- Lee, S., Lillehoj, H.S., Park, D.W., Hong, Y.H., Lin, J.J. 2007. Effects of *Pediococcus*- and *Saccharomyces*-based probiotic (MitoMax) on coccidiosis in broiler chickens. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 30: 261-268.
- Lim, S.J., Sung, S.J., KANG, D.K. 2007. Probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* CPM-7 isolated from chicken feces. *Han'gug mi'saengmul saengmyeong gong haghoeji* 35: 98-103.
- Lima, A.A., Sidrim, J.J., Lima, N.L., Titlow, W., Evans, M.E., Greenberg, R.N. 1997. Molecular epidemiology of multiply antibiotic-resistant *Shigella flexneri* in Fortaleza, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 1061-1065.
- Line, J.E., Bailey, J.S., Cox, N.A., Stern, N.J., Tompkins, T. 1998. Effect of yeast-supplemented feed on *Salmonella* and *Campylobacter* populations in broilers. *Poultry Science* 3: 405-410.
- Lipke, P.N., Ovalle, R. 1998. Cell wall architecture in yeasts: new structure and new challenges. *Journal of Bacteriology* 180: 3735-3740.
- Lyons, T.P. 1994. Biotechnology in the feed industry: 1994 and beyond. A panorama of techniques, processes and products to address animal production problems today and tomorrow. En: *Biotechnology in feed industry*. Lyons, T.P. (Ed). Nottingham University Press. Nottingham, p. 1-48.
- Mandal, S., Mandal, M.D., Pal, N.K. 2006. Antibiotic resistance of *Salmonella enterica* serovar *Paratyphi A* in India: Emerging and reemerging problem. *Postgraduate Medical Journal* 52: 163-166.
- Materu, S.F., Lema, O.E., Mukunza, H.M., Adhiambo, C.G., Carter, J.Y. 1997. Antibiotic resistance pattern of *Vibrio cholerae* and *Shigella* causing diarrhoea outbreaks in the eastern Africa region: 1994-1996. *Eastern Africa Medical Journal* 74: 121-123.
- Merino, L.A., Hreňuk, G.E., Ronconi, M.C., Alonso, J.M. 2004. Resistencia a antibióticos y epidemiología molecular de *Shigella* spp. en el nordeste argentino. *Revista Panamericana de Salud Pública* 15: 219-224.

- Miles, R.D. 1993. Manipulation of the microflora of the gastrointestinal tract: natural ways to prevent colonization by pathogens. En: Biotechnology in feed industry. Lyons, T.P. (Ed). University Press Nottingham. Nottingham, p. 133-150.
- Morishita, T.Y., Aye, P.P., Harr, B.S., Cobb, C.W., Clifford, J.R. 1997. Evaluation of an avian-specific probiotic to reduce the colonization and shedding of *Campylobacter jejuni* in broilers. *Avian Diseases* 41: 850-855.
- Naughton, P.J., Grant, G., Bardocz, S., Allen-Vercoe, E., Woodward, M.J., Pusztai, A. 2001. Expression of type 1 fimbriae (SEF 21) of *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* in the early colonisation of the rat intestine. *Journal of Medical Microbiology* 50: 191-197.
- Neeser, J.R., Koellreutter, B., Wuersch, P. 1986. Oligomannoside-type glycopeptides inhibiting adhesion of *Escherichia coli* strains mediated by type 1 pili: preparation of potent inhibitors from plant glycoproteins. *Infection and Immunity* 52: 428-436.
- Neeser, J.R., Granato, D., Rouvet, M., Servin, A., Teneberg, S., Karlsson, K.A. 2000. *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria. *Glycobiology* 10: 1193-1199.
- Netherwood, T., Gilbert, H.J., Parker, D.S., O'Donnell, A.G. 1999. Probiotics shown to change bacterial community structure in the avian gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5134-5138.
- Nijsten, R., London, N., Van den Bogaard, A., Stobberingh, E. 1996. Antibiotic resistance among *Escherichia coli* isolated from faecal samples of pig farmers and pigs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 37: 1131-1140.
- Nunez, Y.P., Pueyo, E., Carrascosa, A.V., Martínez-Rodríguez, A.J. 2008. Effects of aging and heat treatment on whole yeast cell and yeast cell walls on adsorption of ochratoxin A in a wine model system. *Journal of Food Protection* 71: 1496-1499.
- Ofek, I., Mirelman, D., Sharon, N. 1977. Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature* 265: 623-625.
- Ouweland, A.C., Kirjavainen, P.V., Grönlund, M.M., Isolauri, E., Salminen, S. 1999. Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus. *International Dairy Journal* 9: 623-630.
- Ouweland, A. C., Salminen, S. 2003. *In vitro* adhesion assays for probiotics and their *in vivo* relevance: a review. *Microbial Ecology in Health and Disease* 15: 175-184.
- Oyofe, B.A., DeLoach, J.R., Corrier, D.E., Norman, J.O., Ziprin, R. L., Mollenhauer, H.H. 1989a. Prevention of *Salmonella typhimurium* colonization of broilers with D-mannose. *Poultry Science* 68: 1357-1360.
- Oyofe, B.A., Droleskey, R.E., Norman, J.O., Mollenhauer, H.H., Ziprin, R.L., Corrier, D.E., DeLoach, J.R. 1989b. Inhibition by mannose of *in vitro* colonization of chicken small intestine by *Salmonella typhimurium*. *Poultry Science* 68: 1351-1356.
- Oyofe, B.A., DeLoach, J.R., Corrier, D.E., Norman, J.O., Ziprin, R.L., Mollenhauer, H.H. 1989c. Prevention of *Salmonella typhimurium* colonization of broilers with D-mannose. *Poultry Science* 68: 1357-1360.
- Pan, Y.T., Xu, B., Rice, K., Smith, S., Jackson, R., Elbein, A.D. 1997. Specificity of the high-mannose recognition site between *Enterobacter cloacae* pili adhesin and HT-29 cell membranes. *Infection and Immunity* 65: 4199-4206.
- Pascual, M., Hugas, M., Badiola, J.I., Monfort, J.M., Garriga, M. 1999. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella enteritidis* colonization in chickens. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4981-4986.

- Paterson, D. L., Ko, W.C., Von Gottberg, A., Mohapatra, S., Casellas, J.M., Goossens, H., Mulazimoglu, L., Trenholme, G., Klugman, K.P., Bonomo, R.A., Rice, L.B., Wagener, M.M., McCormack, J.G., Yu, V.L. 2004. Worldwide prevalence of antibiotic resistance in the bacteria *Klebsiella pneumoniae*. *Annals of Internal Medicine* 140: 1-43.
- Pédron, T., Thibault, C., Sansonetti, P.J. 2003. The invasive phenotype of *Shigella flexneri* directs a distinct gene expression pattern in the human intestinal epithelial cell line Caco-2. *Journal of Biological Chemistry* 36: 33878-33886.
- Rada, V., Rychly, I. 1995. The effect of *Lactobacillus-salivarius* administration on Coliforms and Enterococci in the crop and ceca of chicken broilers. *Veterinari Medicina* 40: 311-315.
- Rinkinen, M., Westermarck, E., Salminen, S., Ouwehand, A.C. 2003. Absence of host specificity for *in vitro* adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus. *Veterinary Microbiology* 97: 55-61.
- Russell, R.G., Blake, D.C. 1994. Cell association and invasion of Caco-2 cells by *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity* 62: 3773-3779.
- Sackey, B.A., Mensah, P., Collison, E., Sakyi-Dawson, E. 2001. *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella* and *Escherichia coli* in live and dressed poultry from metropolitan Accra. *International Journal of Food Microbiology* 71: 21-28.
- Sadikot, R.T., Blackwell, T.S., Christman, J.W., Prince, A.S. 2005. Pathogen–host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Medical Care* 171: 1209-1223.
- Salit, I. E., Gotschlich E.C. 1977. Hemagglutination by purified type I *Escherichia coli* pili. *The Journal of Experimental Medicine* 146: 1169–1181.
- SamLi, A.E., Senkoylu, N., Koc, F., Kanter, M., Agma, A. 2007. Effects of *Enterococcus faecium* and dried whey on broiler performance, gut histomorphology and intestinal microbiota. *Archives of Animal Nutrition* 61: 42-49.
- Santin, E., Maiorka, A., Macari, M. 2001. Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Journal of Applied Poultry Research* 10: 236-244.
- Schoeni, J.L., Wong, A.C.L. 1994. Inhibition of *Campylobacter jejuni* colonization in chicks by defined competitive exclusion bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 1191-1197.
- Schroeder, C.M., White, D.G., Ge, B., Zhang, Y., McDermott, P.F., Ayers, S. Zhao, S., Meng, J. 2003. Isolation of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from retail meats purchased in Greater Washington, DC, USA International. *Journal of Food Microbiology* 85: 197-202.
- Segarra, I., Lao, C., López-Tamames, E., De la Torre-Boronat, M.C. 1995. Spectrophotometric methods for the analysis of polysaccharides levels in winemaking products. *American Journal of Enology and Viticulture* 46: 564-570.
- Sharon, N. 2006. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1760: 527-537.
- Snellings, N.J., Tall, B.D., Venkatesan, M.M. 1997. Characterization of *Shigella* type 1 fimbriae: expression, FimA sequence, and phase variation. *Infection and Immunity* 65: 2462-2467.

- Sokurenko, E.V., Courtney, H.S., Ohman, D.E., Klemm, P., Hasty, D.L. 1994. FimH family of type 1 fimbrial adhesins: functional heterogeneity due to minor sequence variations among fimH genes. *Journal of Bacteriology* 176: 748-755.
- Sokurenko, E. V., Courtney, H.S., Maslow, J., Siitonen, A., Hasty, D.L. 1995. Quantitative differences in adhesiveness of type 1 fimbriated *Escherichia coli* due to structural differences in fimH genes. *Journal of Bacteriology* 177: 3680-3686.
- So-Young, K., Yasuki, O., Yoshikazu, A. 2006. Canine intestinal lactic acid bacteria agglutinated with concanavalin A. *Journal of Veterinary Medical Science* 68: 1351-1354.
- Spring, P., Wenk, C., Dawson, K.A., Newman, K.E. 2000. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of *Salmonella*-challenged broiler chicks. *Poultry Science* 79: 205-211.
- Stern N.J., S., E.A., Eruslanov, B.V., Pereygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Pokhilenko, V.D., Levchuk, V.P., Svetoch, O.E., Seal, B.S. 2006. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50: 3111-3116.
- Stone, B.J., Kwaik, Y.A. 1998. Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infection and Immunity* 66: 1768-1775.
- Strickling, J. A., Harmon, D.L., Dawson, K.A., Gross, K.L. 2000. Evaluation of oligosaccharide addition to dog diets: influences on nutrient digestion and microbial populations. *Animal Feed Science and Technology* 86: 205-219.
- Sun, J., Le, G.W., Shi, Y.H., Su, G.W. 2007. Factors involved in binding of *Lactobacillus plantarum* Lp6 to rat small intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology* 44: 79-85.
- Tarkkanen, A.M., Virkola, R., Clegg, S., Korhonen, T.K. 1997. Binding of the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to human endothelial and urinary bladder cells. *Infection and Immunity* 65: 1546-1549.
- Thomas, R., Brooks, T. 2004. Oligosaccharide receptor mimics inhibit *Legionella pneumophila* attachment to human respiratory epithelial cells. *Microbial Pathogenesis* 243: 83-92.
- Troyano, E., Olano, A., Fernández-Díaz, M., Sanz, J., Martínez-Castro, I. 1991. Gas chromatographic analysis of free monosaccharides in milk. *Chromatographia* 32: 379-382.
- Tuomola, E.M., Salminen, S.J. 1998. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus strains* to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology* 41: 45-51.
- Vaisanen, R.V. 1984. Fimbria-like hemagglutinin of *Escherichia coli* 075 strains. *Infection and Immunity* 46: 401-407.
- Walker, S.E., Sander, J.E., Cline, J.L., Helton, J.S. 2001. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates associated with mortality in broiler chicks. *Avian Diseases* 46: 1045-1050.
- Wasfy, M.O., Oyofe, B.A., David, J.C., Ismail, T.F., Gendy, A.M., Mohran, Z.S., Sultan, Y., Peruski, L.F.Jr. 2000. Isolation and antibiotic susceptibility of *Salmonella*, *Shigella*, and *Campylobacter* from acute enteric infections. *Egyptian Journal of Health and Popular Nutrition* 18: 33-38.



White, L. A., Newman, M.C., Cromwell, G.L., Lindemann, M.D. 2002. Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weaning pigs. *Journal of Animal Science* 80: 2619-2628.

Wiener, J., Quinn, J.P., Bradford, P.A., Goering, R.V., Nathan, C., Bush, K., Weinstein, R.A. 1999. Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. *Journal of American Medical Abstracts* 281: 517-523.

Willis, W.L., Reid, L. 2008. Investigating the effects of dietary probiotic feeding regimens on broiler chicken production and *Campylobacter jejuni* presence. *Poultry Science* 87: 606-611.

Wolfenden, A.D., Vicente, J.L., Higgins, J.P., Andreatti Filho, R.L., Higgins, S.E., Hargis, B.M., Tellez, G. 2007. Effect of organic acids and probiotics on *Salmonella enteritidis* infection in broiler chickens. *International Journal of Poultry Science* 6: 1682-8356.

Zentek, J., Marquart, B., Pietrzak, T. 2002. Intestinal effects of mannanoligosaccharides, transgalactooligosaccharides, lactose and lactulose in dogs. *Journal of Nutrition* 132: 1682S-1684S.

Zopf, D., Roth, S. 1996. Oligosaccharide anti-infective agents. *Lancet* 347: 1017-1021.

Los quitosanos (Qs) son polímeros de quitina obtenidos a partir de caparazones de crustáceos que presentan propiedades antimicrobianas contra una gran variedad de microorganismos. Se estudió la actividad antibacteriana de tres Qs con diferentes pesos moleculares (PM) frente a seis bacterias Gram negativas y tres Gram positivas. *Campylobacter* spp. fue el microorganismo más sensible al Qs, independientemente de su peso molecular. La concentración mínima inhibitoria del Qs sobre *Campylobacter* varió entre 0,005 y 0,05%, lo que demuestra la sensibilidad de la bacteria a este compuesto. Los Qs ocasionaron una pérdida en la integridad de la membrana de *Campylobacter*, medida como el incremento en la permeabilidad al marcador de fluorescencia yoduro de propidio. A medida que las células entraron en fase estacionaria, se observó un cambio en la resistencia de la membrana celular a la pérdida de integridad ocasionada por los Qs. Se analizó también la actividad antimicrobiana contra *C. jejuni* de diferentes oligómeros de quitosanos resultantes del tratamiento enzimático de dos Qs de orígenes distintos. El efecto antimicrobiano de los oligómeros sobre *C. jejuni* depende de la fracción, de su origen, del grado de deacetilación, de la viscosidad, y de la enzima empleada para su extracción. Las fracciones de mayor tamaño (>30 KDa y 10-30 KDa) presentaron una actividad antimicrobiana mayor que los Qs parentales, mientras que las de 3-10 KDa apenas afectaron la viabilidad bacteriana. Los Qs y sus oligómeros podrían ser considerados como potenciales aditivos a emplear en la alimentación del pollo con miras a la disminución de *Campylobacter* dentro de la cadena alimentaria humana.

Capítulo

5

Propiedades antimicrobianas de quitosanos y sus oligómeros contra *Campylobacter*

## 5.1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El quitosano (Qs) es un polímero de carbohidratos derivado de la deacetilación de la quitina y constituye el segundo biopolímero natural en abundancia después de la celulosa (No y Meyers, 2007). Su producción se lleva a cabo a partir de caparzones de crustáceos, provenientes fundamentalmente de desechos de la industria pesquera, por lo que puede presentar diferencias en su composición según la fuente de obtención y el tratamiento al cual sea sometido, lo que afecta al peso molecular y al grado de deacetilación del mismo.

A lo largo de los últimos años, se han incrementado de forma significativa los estudios sobre el Qs, debido principalmente a su actividad biológica y a su inocuidad, y se ha empleado en diferentes aplicaciones tanto en la industria alimentaria como en la farmacéutica (Devlieghere *et al.*, 2004). A pesar de que el Qs tiene diversas propiedades interesantes a nivel industrial, la más atractiva es su uso potencial como conservante natural de alimentos, debido a su potente actividad antimicrobiana contra numerosos microorganismos alimentarios (Beverly *et al.*, 2008; No *et al.*, 2002). Debido a lo anterior, y dada la alta producción de crustáceos en España (cerca de 130 toneladas anuales) (INE, 2009), el Qs podría también constituir una alternativa natural de interés para el control de *Campylobacter*.

Aunque existen diversos estudios acerca de la actividad antibacteriana de los Qs sobre microorganismos patógenos (Liu *et al.*, 2006; No *et al.*, 2002; Helander *et al.*, 2001), no existen referencias acerca de su efecto sobre *Campylobacter*, y las diferencias en cuanto a su capacidad antimicrobiana sobre bacterias Gram negativas y Gram positivas sigue siendo un tema controvertido (Beverly *et al.*, 2008; Miralles *et al.*, 2007; Chhabra *et al.*, 2006; Devlieghere *et al.*, 2004).

Los oligómeros derivados del Qs, producidos por hidrólisis parcial del Qs, han logrado resolver algunos problemas prácticos como la baja solubilidad de los Qs bajo condiciones fisiológicas, incrementando de esta forma el campo de aplicación industrial de estos compuestos (Qin *et al.*, 2005).

Dichos oligómeros presentan diferentes propiedades biológicas que son de gran utilidad para la industria alimentaria. Así, por ejemplo, se han utilizado como agentes clarificantes en zumos de manzana (Rungsardthong *et al.*, 2006), como antioxidantes en el proceso de elaboración de salchichas (Roller *et al.*, 2002) o como componentes de diferentes películas utilizadas para el envasado, con el objetivo de ayudar a evitar el deterioro de los alimentos (Cagri *et al.*, 2004). Además de lo anterior, su actividad antimicrobiana los convierte en potenciales conservantes de origen natural (Tsai *et al.*, 2002; Roller y Covill, 1999).

En diferentes estudios se ha visto que algunos oligómeros derivados de quitosanos son capaces de modular la microbiota intestinal de pollos (Li *et al.*, 2007) y otros animales de granja (Liu *et al.*, 2008; Shigehiro *et al.*, 1990), por lo que han sido propuestos como potenciales agentes prebióticos a emplear en alimentación animal (Li *et al.*, 2007) y humana (Lee *et al.*, 2003).

Con base en lo anterior, se planteó como principal objetivo de este capítulo la determinación de la influencia de Qs y sus oligómeros sobre la viabilidad de *Campylobacter* spp. Para lograrlo, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- 1) Estudiar el efecto del peso molecular de los Qs sobre el crecimiento de *Campylobacter* spp. y otras bacterias de interés para la industria alimentaria, tanto Gram negativas como Gram positivas, y determinar el efecto de la concentración del Qs sobre la viabilidad bacteriana.
- 2) Determinar el mecanismo de acción de los Qs contra *Campylobacter*, por medio del estudio de su influencia sobre la integridad de la membrana celular bacteriana, profundizando en el efecto de las diferentes fases del crecimiento del microorganismo en el comportamiento observado.
- 3) Realizar la caracterización de dos Qs extraídos de fuentes diferentes, y obtener oligómeros partir de ellos.
- 4) Determinar la influencia del origen, método de obtención y grado de polimerización de los Qs y sus oligómeros sobre la viabilidad de *Campylobacter*.

## 5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.2.1. Obtención de quitosanos y sus oligómeros

Se emplearon tres quitosanos comerciales (Qs) con pesos moleculares relativos (PM) diferentes: 120 kDa (A), 400 kDa (B) y 643 kDa (C). Los Qs de 120 y 400 kDa se obtuvieron de Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.), mientras que el de 643 kDa se obtuvo de Idebio (Madrid, España). Todos los Qs presentaron un grado de deacetilación cercano al 85%.

Se utilizaron también otros dos Qs (D y E), y los oligómeros obtenidos a partir de ellos fueron suministrados por la Dra Beatriz Miralles, como parte de un trabajo de colaboración entre el IFI y el Instituto de Estudios Biofuncionales de la Universidad Complutense de Madrid. Las fracciones se obtuvieron mediante dos tratamientos enzimáticos diferentes, el primero empleando quitosanasa y el segundo utilizando lisozima de clara de huevo. Estos tratamientos permitieron la separación de los diferentes oligómeros según su peso molecular en fracciones >30 KDa, de 10-30 KDa y de 3-10 KDa.

Brevemente, los Qs D y E se prepararon por medio de la deacetilación de la quitina extraída de caparazones de *Chionoecetes opilio* (cangrejo de las nieves) y de *Palinurus elephas* (langosta europea), respectivamente. Una vez purificados, se disolvieron completamente 500 mg en 100 mL de tampón acetato (0,1 M), se añadieron 5 mg/mL de las enzimas lisozima de clara de huevo (Sigma-Aldrich, Dorset, Reino Unido) o quitosanasa de *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), y se incubó según las condiciones optimizadas con antelación (datos no mostrados), especificadas en la Tabla 5.1. Se tomaron muestras en diferentes intervalos de tiempo. La viscosidad obtenida a diferentes momentos de la reacción de depolimerización se midió por viscosimetría.

**Tabla 5.1.** Condiciones empleadas para las reacciones enzimáticas

Enzima	Tiempo de reacción (días)	PH	Temperatura (° C)	Agitación (rpm)
Lisozima	6	4,5	37	100
Quitosanasa	4	5,7	37	100

Tras la depolimerización enzimática con quitosanasa y lisozima, se separaron por ultrafiltración tres fracciones deferentes en una celda de agitación (Millipore corporation, Maryland, EE.UU.), para lo cual se utilizaron filtros de membranas de acetato de celulosa con tamaño de poros de 30, 10 y 3 KDa.

El promedio del peso molecular de los Qs se determinó utilizando la ecuación de Mark Howink, empleando los valores obtenidos por viscosimetría (Wang *et al.*, 1991). El grado de deacetilación se determinó por espectroscopia UV (Ching Tan *et al.*, 1998).

Las soluciones madre (0,1% p/v) de A, B, C, D y E, así como de las fracciones obtenidas de los dos últimos, se prepararon en 10 mM de ácido acético y el pH se ajustó a 7,0 con NaOH.

## **5.2.2. Células bacterianas**

### **5.2.2.1. Medios y reactivos, cepas y condiciones de cultivo**

Se emplearon 9 cepas microbianas, que incluyen 6 bacterias Gram-negativas: *C. jejuni* LP1 (LP1), *C. jejuni* NCTC 11351 (11351), *C. jejuni* NCTC 11168 (11168), *C. coli* LP2 (LP2), *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, y 3 Gram-positivas: *S. aureus* ATCC 25923, *L. salivarius* IFa y *L. casei* CECT 475. Todas las cepas se obtuvieron y cultivaron como se detalla en 4.2.3.2.-4.2.3.3.

### **5.2.2.2. Ensayos de viabilidad bacteriana**

Para determinar el efecto de los compuestos empleados en este estudio sobre la viabilidad de las diferentes especies y cepas bacterianas, se siguió la metodología descrita en 3.2.3.2.

## **5.2.3. Actividad antimicrobiana de Qs y sus oligómeros**

Cada inóculo microbiano se lavó 2 veces y se resuspendió en PBS. Se inoculó 1 mL de cada cultivo en placas de 24 pozos (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) y se añadió el volumen requerido de la solución madre de Qs o de sus oligómeros para lograr la concentración específica para cada caso. Como control se empleó PBS. Las muestras se incubaron durante 24 h para bajo las condiciones adecuadas para cada especie, según se indica en 4.2.3.3. Después de la incubación se hicieron diluciones seriadas y siembra para realizar el recuento de las bacterias viables, empleando el medio de cultivo y las condiciones de incubación apropiadas para cada cepa bacteriana.

## **5.2.4. Estudio del efecto de Qs y sus oligómeros sobre la integridad de la membrana celular bacteriana**

### **5.2.4.1. Tinción con yoduro de propidio**

Los cultivos bacterianos tratados con Qs y los controles no tratados se tiñeron con yoduro de propidio (IP) (Sigma-Aldrich, Dorset, Reino Unido), con el fin de determinar si la exposición al Qs

provocaba una pérdida de integridad de la membrana. La solución de IP se añadió a una concentración final de 2,9  $\mu\text{mol/L}$  (Martínez-Rodríguez y Mackey, 2005). Después de una incubación de 10 min, se lavaron las muestras dos veces, se resuspendieron en PBS y se midió el nivel de fluorescencia relativa (FR), que corresponde a la relación fluorescencia/densidad óptica, empleando para ello un lector multifunción (BMG LABTECH Inc., Champigny sur Marne, France) con excitación y emisión de 495 y 615 nm, respectivamente. La longitud de apertura se fijó en 10 nm. Los resultados se expresaron como  $\Delta\text{FR}$ , que corresponde al incremento en FR con respecto al control.

#### **5.2.4.2. Efecto de la fase de crecimiento sobre la integridad de la membrana de *Campylobacter***

Se tomaron muestras de las cepas de *C. jejuni* LP1 y NCTC 11351 en diferentes momentos de su crecimiento, durante la fase exponencial (1, 3, 5 y 7 h) y en la fase estacionaria (24 h). La fluorescencia se determinó tal como se mencionó anteriormente.

#### **5.2.5. Análisis estadístico**

Los datos experimentales se analizaron utilizando el programa Minitab versión 14.1 (Minitab 14, State College, PA). Para el análisis de datos se empleó la prueba t de Student. Las diferencias entre muestras se consideraron significativas cuando  $p \leq 0,05$ . En las Tablas y Figuras, N se refiere al número de experimentos realizados y n al número de muestras analizadas.



### 5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.3.1. Efecto del peso molecular de los Qs sobre el crecimiento bacteriano

Se determinó la actividad antibacteriana de tres quitosanos (Qs) con diferentes pesos moleculares (PM) contra *Campylobacter* y otros microorganismos de interés para la industria alimentaria. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 5.2.

**Tabla 5.2.** Influencia de los Qs de diferentes pesos moleculares (A: 120 kDa; B: 400 kDa; C: 643 kDa) (0,5%) sobre la viabilidad de *C. jejuni* LP1 (LP1), *C. jejuni* NTCC 11351 (11351), *C. jejuni* NTCC 11168 (11168), *C. coli* LP2 (LP2), *E. coli* ATCC 25922 (25922), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (27853), *S. aureus* ATCC 25923 (25923), *L. salivarius* IFa (IFa) y *L. casei* CECT 475 (475). Resultados expresados como la media del % de inhibición con respecto al control  $\pm$  la desviación estándar para N=3, n=2. (\*) Calculado basándose en el límite de detección logarítmico (30 ufc por placa).

Cepa microbiana	Qs A (PM =120)	Qs B (PM = 400)	Qs C (PM = 643)
LP1	83,63 $\pm$ 0,00*	83,63 $\pm$ 0,00*	83,41 $\pm$ 0,01
11351	82,02 $\pm$ 0,00*	82,02 $\pm$ 0,00*	69,62 $\pm$ 0,03
11168	83,72 $\pm$ 0,00*	83,72 $\pm$ 0,00*	83,50 $\pm$ 0,03
LP2	76,51 $\pm$ 0,00*	76,51 $\pm$ 0,00*	76,51 $\pm$ 0,00*
25922	78,20 $\pm$ 0,00*	74,37 $\pm$ 0,37	58,03 $\pm$ 0,64
27853	47,00 $\pm$ 0,03	46,87 $\pm$ 0,01	37,08 $\pm$ 0,11
25923	35,11 $\pm$ 0,01	28,24 $\pm$ 0,12	6,49 $\pm$ 0,06
IFa	22,74 $\pm$ 0,12	10,84 $\pm$ 0,25	5,42 $\pm$ 0,02
475	10,29 $\pm$ 0,40	8,61 $\pm$ 0,40	3,59 $\pm$ 0,20

Los Qs inhibieron de forma significativa ( $p \leq 0,05$ ) el crecimiento de los microorganismos estudiados. Sin embargo, esta inhibición estuvo relacionada con la cepa bacteriana y el PM del Qs. El efecto inhibitorio de los Qs sobre las bacterias Gram-negativas fue mayor que sobre las cepas Gram-positivas. *Campylobacter* fue el microorganismo más sensible a la acción de los Qs, con independencia de su PM. Las cuatro cepas estudiadas, que pertenecen a dos especies diferentes (*C. jejuni* y *C. coli*) mostraron poblaciones viables cercanas al límite de detección (30 ufc por placa) para la concentración utilizada (0,5% p/v). El grado de inhibición para el Qs C (PM = 643 KDa) fue ligeramente menor que el

de A (PM = 120 KDa) y B (PM = 400 KDa), siendo la reducción superior a 5 logaritmos en todos los casos.

Las otras dos especies de bacterias Gram-negativas estudiadas (*E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 25923) también resultaron inhibidas por los Qs, aunque en grado menor que las cepas de *Campylobacter*. Para estos microorganismos, la capacidad de inhibición de los Qs disminuyó al aumentar el PM. En general, las bacterias Gram positivas estudiadas fueron más resistentes a la acción de los Qs ya que la viabilidad de la especie más sensible (*S. aureus*) disminuyó únicamente un 35,11%. Por otra parte, *L. salivarius* y *L. casei* fueron las bacterias más resistentes, ya que la viabilidad resultó afectada por los Qs en menos de un 23%.

A pesar de que se ha observado que los Qs son efectivos contra algunas bacterias Gram positivas (Beverly *et al.*, 2008; Chhabra *et al.*, 2006), actualmente se considera que son más activos contra las Gram negativas (Miralles *et al.*, 2007; Devlieghere *et al.*, 2004; Helander *et al.*, 2001). En este sentido, algunos autores han encontrado que ciertas bacterias Gram positivas empleadas como probióticos, como es el caso de los lactobacilos, pueden ser más resistentes a los Qs que los microorganismos Gram negativos (Tsai y Hwang, 2004, Jeon *et al.*, 2001). Por otra parte se ha observado también una modulación en la microbiota intestinal de pollos al incluir Qs en sus dietas, traducida en un aumento en las concentraciones de *Lactobacillus* en los ciegos de los animales, y en una disminución en los recuentos de *E. coli* (Li *et al.*, 2007).

Se cree que la actividad antimicrobiana de los Qs depende de la interacción entre los grupos protonados NH<sub>2</sub> del Qs y la carga negativa de la superficie celular bacteriana. Esta carga negativa puede variar en dependencia de las características de la cepa bacteriana analizada, influyendo también en la susceptibilidad al Qs. El hecho de que las bacterias Gram positivas hayan resultado en general más resistentes que las Gram negativas se relaciona con las diferencias estructurales de las paredes celulares de ambos grupos (Tsai y Hwang, 2004).

La actividad antimicrobiana de los Qs puede depender de diferentes factores, entre los que se incluyen el grado de acetilación, el peso molecular y la concentración empleada (Chiu *et al.*, 2007; Zheng y Zhu, 2003; No *et al.*, 2002). Existen estudios que relacionan el peso molecular de los Qs con su poder antimicrobiano, con resultados muy diferentes entre sí. Algunos autores han observado un aumento de la actividad antimicrobiana de los Qs contra bacterias Gram negativas a medida que aumenta su peso molecular (No *et al.*, 2002; Jeon *et al.*, 2001), mientras que otros concluyen que la actividad parece disminuir al aumentar dicho parámetro (Liu *et al.*, 1999). Sin embargo, se ha visto que

algunos Qs con PM de 200-300 KDa presentan una eficacia significativa como inhibidores del crecimiento tanto de bacterias Gram positivas, como de Gram negativas (Kim *et al.*, 2007).

Dado el alto poder bactericida contra *Campylobacter* spp. que presentó el Qs A, se realizó la determinación de la concentración mínima inhibitoria de dicho compuesto sobre varias cepas de este género (Tabla 4.3.).

A pesar de que las cepas estudiadas se inhibieron completamente por una concentración 10 veces inferior a la empleada en un principio (0,05%), se observaron diferencias significativas entre las cepas analizadas. *C. jejuni* LP1 fue la cepa más resistente y no se inhibió por concentraciones de 0,01% del Qs. A diferencia de lo anterior, *C. jejuni* 11351 y *C. jejuni* 11168 se inhibieron por el Qs a 0,01%. No se observaron diferencias significativas con respecto al control ( $p > 0,05$ ) al emplear concentraciones de 0,005%. La cepa *C. coli* LP2 fue la más sensible y su viabilidad se vio reducida un 39,53% después de ser sometida a una concentración de 0,005% del Qs A.

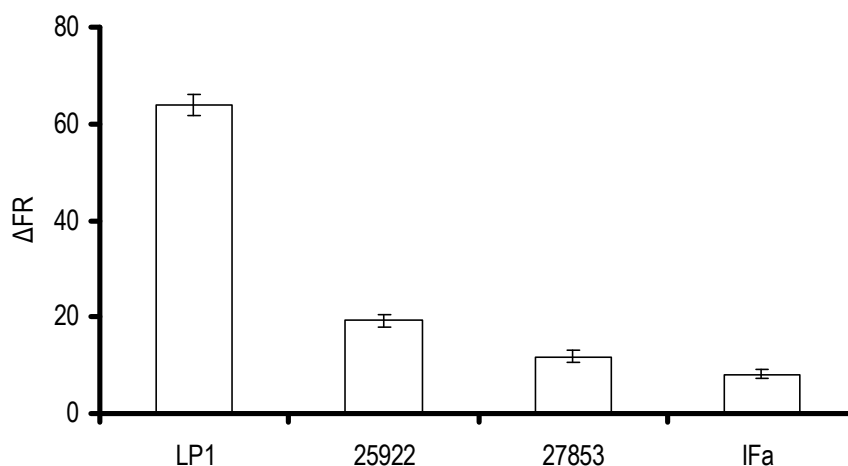
**Tabla 5.3.** Concentración mínima inhibitoria del Qs A sobre el crecimiento de *C. jejuni* LP1 (LP1), *C. jejuni* NTCC 11351 (11351), *C. jejuni* NTCC 11168 (11168) y *C. coli* LP2 (LP2). Resultados expresados como la media del % de inhibición con respecto al control  $\pm$  la desviación estándar para N=3, n=2. (a) Calculado en base al límite de detección logarítmico (30 ufc por placa). (b) Significativamente diferente al control ( $p \leq 0,05$ ).

Cepa	Concentración Qs A (%)						
	0,50	0,25	0,10	0,05	0,01	0,005	0,0025
LP1	83,63 $\pm$ 0,00 <sup>ab</sup>	83,63 $\pm$ 0,00 <sup>ab</sup>	83,63 $\pm$ 0,00 <sup>ab</sup>	83,63 $\pm$ 0,00 <sup>ab</sup>	2,93 $\pm$ 0,18	7,03 $\pm$ 0,37	-
11351	82,02 $\pm$ 0,00 <sup>ab</sup>	82,02 $\pm$ 0,00 <sup>ab</sup>	82,02 $\pm$ 0,00 <sup>ab</sup>	82,02 $\pm$ 0,00 <sup>ab</sup>	24,38 $\pm$ 0,30 <sup>b</sup>	0,68 $\pm$ 0,12	-
11168	83,72 $\pm$ 0,00 <sup>ab</sup>	83,72 $\pm$ 0,00 <sup>ab</sup>	83,72 $\pm$ 0,00 <sup>ab</sup>	83,72 $\pm$ 0,00 <sup>ab</sup>	3,21 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 0,08	-
LP2	76,51 $\pm$ 0,00 <sup>ab</sup>	76,51 $\pm$ 0,00 <sup>ab</sup>	76,51 $\pm$ 0,00 <sup>ab</sup>	76,51 $\pm$ 0,00 <sup>ab</sup>	76,51 $\pm$ 0,00 <sup>ab</sup>	39,53 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 0,07

Algunos autores han descrito que la actividad antimicrobiana de los Qs depende de la dosis empleada (Raafat *et al.*, 2008) y se ha determinado la mínima concentración capaz de inhibir el crecimiento de los microorganismos, la cual varía entre 0,005 y 0,1%, es dependiente de la especie bacteriana y de las características del Qs utilizado (Wang *et al.*, 2007, No *et al.*, 2002; Sano *et al.*, 2001). En este trabajo, la mínima concentración inhibitoria para *Campylobacter* se encontró entre 0,005 y 0,05%, lo que demuestra la gran sensibilidad de esta bacteria ante los Qs. Los resultados también sugieren que, además de la especie, la cepa microbiana también es un factor fundamental para determinar la sensibilidad ante este compuesto.

### 5.3.2. Estudio de la integridad de la membrana celular bacteriana

La pérdida de la integridad de la membrana celular de *C. jejuni* LP1 por la acción de Qs A se comparó con la de otras bacterias Gram negativas afectadas en diferente medida por el compuesto (*E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 25923) y con la de la cepa Gram positiva *L. salivarius* IFa. En la Figura 5.1. se muestran los resultados obtenidos.



**Figura 5.1.** Permeabilidad al yoduro de propidio de las células de *C. jejuni* LP1 (LP1), *E. coli* ATCC 25922 (25922), *P.aeruginosa* ATCC 27853 (27853) y *L. salivarius* IFa (IFa) expuestas al Qs A. Resultados expresados como la media del incremento de fluorescencia (RF) con respecto al control ( $\Delta FR$ )  $\pm$  la desviación estándar para N=3, n=2.

En general, la permeabilidad a PI siguió el mismo patrón observado en la inhibición de la viabilidad. *C. jejuni* LP1, presentó el mayor aumento en fluorescencia relativa con respecto al control ( $\Delta RF = 64,4$ ). Dicha cepa fue seguida por *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 25923, las cuales presentaron un  $\Delta RF$  de 19,5 y 11 respectivamente. Finalmente, *L. salivarius* resultó prácticamente impermeable a PI ( $\Delta RF = 7$ ), observándose tan sólo un pequeño incremento con respecto al control.

A pesar de que los mecanismos responsables de la actividad antimicrobiana de los Qs todavía no se conocen detalladamente (Devlieghere *et al.*, 2004), se cree que los Qs se unen a la membrana celular bacteriana y producen una desestabilización de sus cargas. Lo anterior conduce a una pérdida de lípidos, lo que explica la pérdida de las funciones de la membrana como barrera protectora contra el medio externo (Raafat *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2003, Choi *et al.*, 2001; Helander *et al.*, 2001). De aquí

que la acción antimicrobiana de los Qs sea considerada como permeabilizadora y no tóxica (Vaara, 1992). Esta propiedad hace que los Qs puedan ser contemplados como agentes antimicrobianos potencialmente útiles en la preservación y seguridad alimentaria, ya que usadas en combinación con sustancias tóxicas pueden facilitar la entrada de éstas.

### **5.3.3. Estudio de la integridad de la membrana celular de *Campylobacter* en diferentes fases de crecimiento**

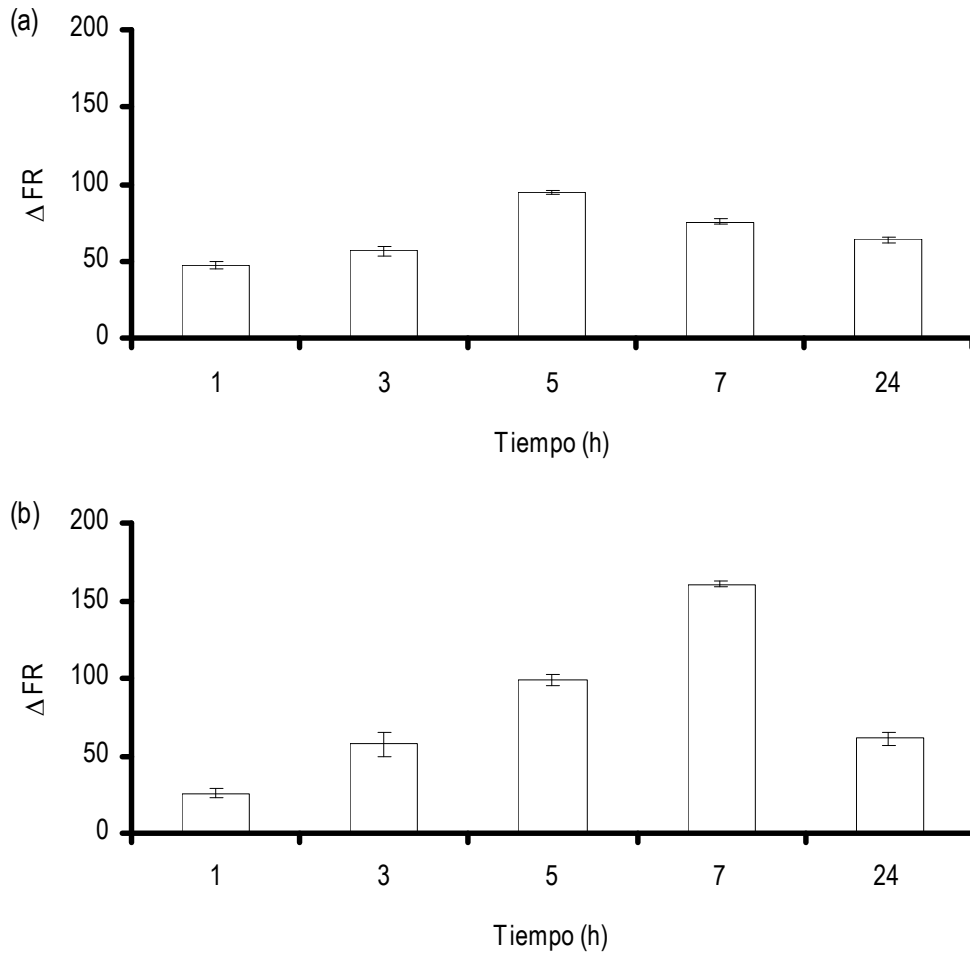
Se sabe que de *C. jejuni* carece de algunos de los mecanismos de regulación que tienen otros microorganismos frente a situaciones de estrés, como los presentes en fase estacionaria (Martínez-Rodríguez y Mackey, 2005). Se cree que como consecuencia de dicha carencia, algunas de sus características fisiológicas son capaces de sufrir notables variaciones, en especial las relacionadas con la estructura de su membrana celular. Es por ello que se han observado cambios importantes en cuanto a la composición de la membrana celular de este microorganismo en diferentes etapas de su crecimiento (Martínez-Rodríguez y Mackey, 2005), por lo que resulta interesante determinar el efecto del QsA en diferentes fases de su ciclo vital. Debido a lo anterior, se determinó el efecto del QsA sobre permeabilidad de la membrana celular de una cepa clínica y una de colección de *C. jejuni* (LP1 y 11351, respectivamente) en diferentes fases del crecimiento bacteriano (Figura 5.2.).

A pesar de que el patrón de comportamiento observado fue similar para ambas cepas de *Campylobacter*, se observó cierta diferencia en la magnitud de la respuesta ante el Qs. El valor para  $\Delta RF$  mostrado por *C. jejuni* LP1 aumenta hasta las 5 h de crecimiento, lo que coincide con la fase exponencial (Figura 2.4.). Después de esto, se observa una ligera disminución de  $\Delta RF$ , que alcanza su valor mínimo a las 24 h. Sin embargo, el  $\Delta RF$  para *C. jejuni* 11351 aumenta hasta las 7 h y luego, al alcanzar las 24 h, disminuye rápidamente hasta valores cercanos a los obtenidos a las 3 h de crecimiento, es decir, al comienzo de la fase exponencial.

Los resultados demuestran que el aislado clínico *C. jejuni* LP1 se encuentra mejor adaptado para sobrellevar las situaciones de estrés ambiental debido a la presencia del Qs, ya que tarda un tiempo menor que la cepa de colección (*C. jejuni* 11351) en poner en funcionamiento los mecanismos necesarios para contrarrestar los daños en la membrana ocasionados por acción del Qs.

En ocasiones anteriores se ha visto que los sucesivos pases *in vitro* de las cepas de colección, como es el caso de la 11351, pueden derivar en una disminución de los atributos de patogenicidad

bacteriana y en el nivel de resistencia a factores de estrés ambiental (Casadevall y Pirofki, 2007), lo que podría explicar las diferencias encontradas entre ambas cepas.



**Figura 5.2.** Permeabilidad al yoduro de propidio de las células de *C. jejuni* LP1 (a) y *C. jejuni* NCTC 11351 (b) durante diferentes etapas de crecimiento, en fase exponencial (1, 3, 5 y 7 h) y en fase estacionaria (24 h). Resultados expresados como la media del incremento de fluorescencia (RF) relativo al control ( $\Delta RF$ )  $\pm$  la desviación estándar para N=3, n=2.

La biogénesis de la membrana celular bacteriana es un proceso dinámico (Fisher *et al.*, 2006). Se ha visto que a medida que *C. jejuni* 11351 se acerca a la fase estacionaria de crecimiento se registran cambios en su composición de ácidos grasos de membrana, acompañados por un incremento en la resistencia. Se cree que lo anterior puede ser reflejo de la respuesta fisiológica del microorganismo ante condiciones adversas, dada su limitada capacidad para llevar a cabo una regulación genética de adaptación al ambiente (Martínez-Rodríguez y Mackey, 2005).

Las observaciones anteriores podrían explicar el comportamiento observado en el estudio de la permeabilidad de la membrana celular de *C. jejuni* registrada a las 7 h (LP1) ó 24 h (11351) como consecuencia de su exposición al Qs.

#### 5.3.4. Obtención de oligómeros de quitosanos

Además del PM se ha determinado que otras características de los Qs, como es el grado de deacetilación, pueden afectar su poder antimicrobiano (Tsai *et al.*, 2002). Debido a lo anterior, se determinó el valor de esta variable en dos muestras de Qs obtenidas a partir de caparazones de *Chionoecetes opilio* (D) y *Palinurus elephas* (E) (Tabla 5.4.).

**Tabla 5.4.** PM y grado de deacetilación obtenidos por viscosimetría de los Qs D y E.

Qs	PM (KDa)	Grado de deacetilación (%)
D	645	90
E	731	75

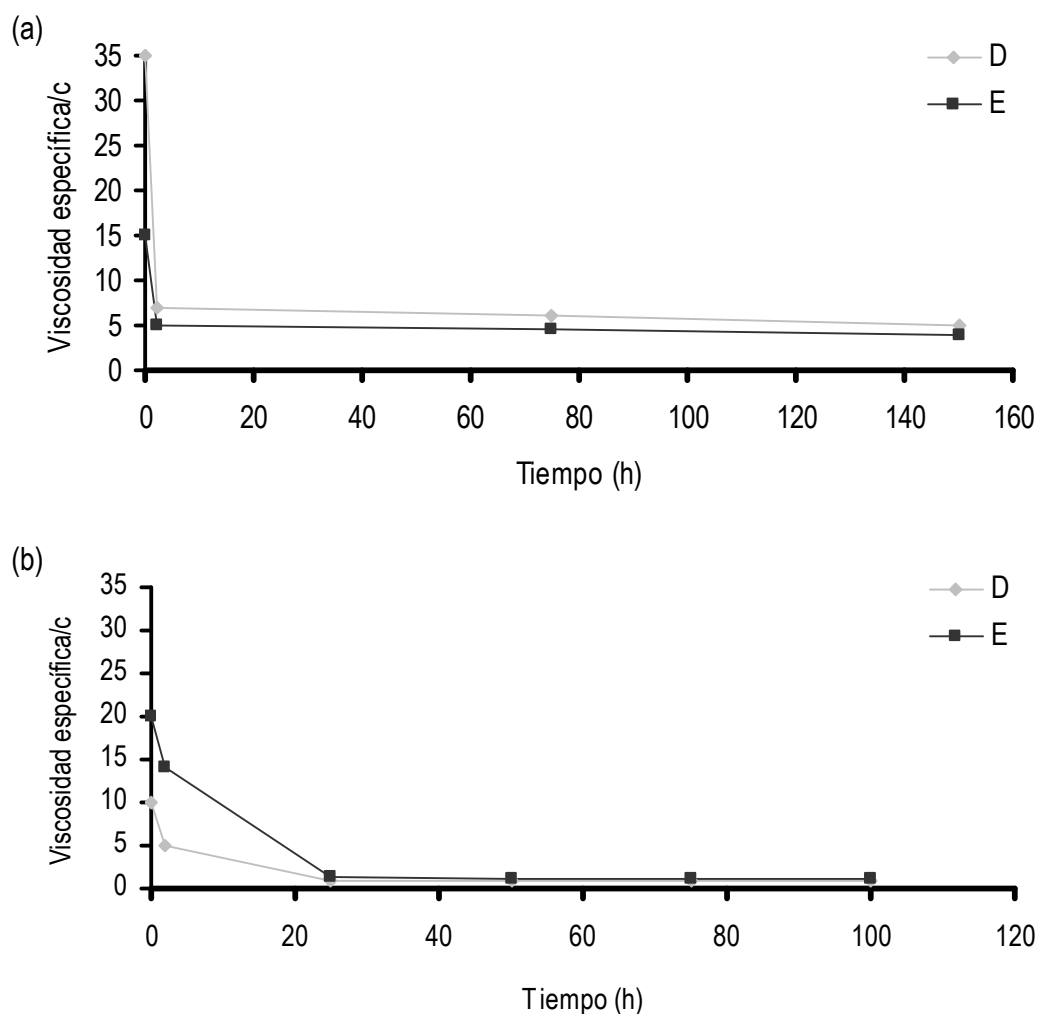
Se observó que las características del Qs dependen del origen de la muestra. El Qs D, obtenido a partir de caparazones de *Chionoecetes opilio*, presentó menor peso molecular y mayor grado de deacetilación que el Qs E, proveniente de *Palinurus elephas*.

En general, se ha visto que la quitina y los quitosanos derivados de ella, pueden presentar grandes variaciones en sus características químicas, en especial en cuanto a su grado de desacetilación y a su peso molecular, dependiendo tanto de su fuente de origen como del método empleado para su obtención (Muzzarelli, 1977).

Al igual que ocurre con el grado de deacetilación, se ha visto que la viscosidad de los quitosanos juega un papel fundamental sobre su capacidad antimicrobiana (Rhoades y Roller, 2000). Por este motivo, se determinó la viscosidad de los Qs D y E durante el tratamiento enzimático con lisozima y quitosanas (Figura 5.3.). Se obtuvo que la viscosidad de D y E disminuye de manera significativa durante las primeras fases de la reacción enzimática. La actividad de la lisozima produjo en

ambas muestras patrones similares, resultando la viscosidad alcanzada por la muestra E menor que la de D, debido probablemente al mayor grado de acetilación de la primera.

Se han visto diferentes grados óptimos de acetilación para la acción de la lisozima, basándose en la capacidad de esta enzima para hidrolizar parcialmente los quitoligómeros N-acetilados. Hirano y Nagao (1989) encontraron una tasa óptima de degradación al emplear Qs con 80% de desacetilación. Sashiwa *et al.* (1990), por otra parte, observaron que la mayor susceptibilidad a la lisozima se obtienen al emplear quitina soluble 30% N-acetilada.



**Figura 5.3.** Variación en el tiempo de la viscosidad específica de los Qs D y E tras su depolarización con lisozima (a) o quitosanasa (b). Resultados expresados como la viscosidad específica del quitosano en relación con la concentración del solvente.



Asimismo, Kurita *et al.* (2000) sugirieron que el mejor grado de deacetilación para la hidrólisis del Qs al utilizar lisozima debe ser de 56%, y que Qs con grados de deacetilación menores a 11% y mayores a 97% no son hidrolizables con esta enzima, ya que poseen muchas o muy pocas N-acetilaciones continuas, respectivamente.

A pesar de que en el caso de la quitosanasa se observó también un descenso en la viscosidad en los primeros minutos, el patrón de comportamiento resultó diferente para cada uno de los Qs, lo que indica que la actuación de esta enzima es diferente en distintos sustratos, demostrando una alta especificidad. Los resultados permitieron determinar también que la degradación del Qs E es menor, lo que sea probablemente debido a su menor grado de deacetilación.

### **5.3.5. Efecto de diferentes fracciones de oligómeros de quitosanos sobre la viabilidad de *Campylobacter***

A pesar del poder antimicrobiano de los Qs contra *Campylobacter* spp. observado en este estudio, la baja solubilidad de muchos de estos compuestos hace que su uso a nivel industrial se dificulte de manera considerable en algunos casos. Los oligómeros obtenidos a partir de los Qs constituyen una buena alternativa a este problema, ya que su solubilidad es mucho mayor que la de los Qs originales (Cabrera y Van Cutsem, 2005).

Debido a lo anterior, se estudió el efecto sobre la viabilidad de *C. jejuni* de los Qs D y E, así como de diferentes fracciones obtenidas a partir de éstos, mediante extracción enzimática, empleando las enzimas quitosanasa y lisozima. Los resultados obtenidos se representan en la Tabla 5.5.

Se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en cuanto a la actividad antimicrobiana contra *C. jejuni* entre los Qs parentales (D y E) y sus oligómeros. Algunas de las fracciones resultaron más activas que su Qs parental, lo que demuestra que podrían ser responsables de la actividad antimicrobiana global del Qs.

De igual manera, se determinó que la actividad antimicrobiana varía de acuerdo al grado de polimerización del Qs y de sus fracciones, y que los oligómeros de 10-30 KDa son los más activos contra *C. jejuni*, independientemente de la enzima utilizada para su preparación. Por el contrario, las fracciones de oligómeros con grado de polimerización de 3-10 KDa presentaron la menor capacidad antimicrobiana. Con antelación se ha descrito que existe una relación directa entre el peso molecular

de los oligómeros de Qs y su actividad antimicrobiana (No *et al.*, 2002) y se ha visto que su eficacia aumenta con el grado de polimerización, siendo los grado de polimerización de 1-10 KDa críticos para la inhibición de microorganismos (Jeon *et al.*, 2001). Igualmente, se ha demostrado que los Qs parcialmente hidrolizados tienen una mayor eficacia antibacteriana que los Qs sometidos a hidrólisis extensivas (Uchida *et al.*, 1989).

**Tabla 5.5.** Influencia de fracciones de oligómeros de quitosanos (0,05%) de diferentes pesos moleculares (>30 KDa, 30-10 KDa, 10-3 KDa) extraídas con quitosanasa o lisozima, sobre la viabilidad de *C. jejuni* LP1. (D y E) Qs, (P) Qs parental. Resultados expresados como la media del % de inhibición con respecto al control  $\pm$  la desviación estándar para N= 3, n= 2.

Qs	P	Quitosanasa			Lisozima		
		>30	30-10	10-3	>30	30-10	10-3
D	51,07 $\pm$ 1,04	83,82 $\pm$ 1,22	99,58 $\pm$ 0,31	0,00 $\pm$ 0,00	52,40 $\pm$ 1,22	89,36 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
E	70,28 $\pm$ 3,84	73,02 $\pm$ 1,21	74,86 $\pm$ 0,38	60,14 $\pm$ 4,72	29,61 $\pm$ 3,74	63,23 $\pm$ 1,12	41,50 $\pm$ 4,31

Por otra parte, se obtuvo que los oligómeros preparados con quitosanasa poseen una actividad antimicrobiana mayor contra *C. jejuni* que los obtenidos usando lisozima. Este comportamiento podría estar relacionado con el grado de deacetilación, que fue mayor en los oligómeros obtenidos con quitosanasa (datos no mostrados). Por lo general, el número de grupos aminos es dependiente de el grado de polimerización y del grado de deacetilación del Qs, y se ha determinado que la actividad antibacteriana tiende a aumentar con el grado de deacetilación (Tsai *et al.*, 2002).

Estos resultados podrían ser explicados también por la viscosidad, que resultó mayor en las muestras tratadas con lisozima, ya que se ha determinado que una disminución en este parámetro conlleva una pérdida en la actividad antimicrobiana de los Qs (Rhoades y Roller, 2000).

Se determinó que los Qs parentales D y E presentan un efecto inhibitorio contra *C. jejuni* LP1 menor al observado para Qs A, al ser empleado en la misma concentración (0,05%). Sin embargo, se comprobó que algunos de los oligómeros de Qs D son capaces de generar daños en el microorganismo incluso mayores a los producidos por Qs A, como es el caso de ambas fracciones de 30-10 KDa y la de >30 KDa, obtenida por la acción de la quitosanasa.

En la actualidad, los Qs son reconocidos como compuestos biodegradables, no tóxicos, abundantes y de bajo precio (Tiyaboonchai, 2003), lo que hace que su utilización sea muy sostenible. Además de ello, se ha visto que no son hidrolizados por las enzimas digestivas (Hasegawa, 2001) y que al ser incluidos en la dieta de pollos y humanos es posible favorecer la digestibilidad de nutrientes, modular la microbiota intestinal y mejorar algunos parámetros fisiológicos (Lee *et al.*, 2003; Knaul *et al.*, 1999).

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que los Qs y sus oligómeros podrían llegar a ser empleados en la alimentación animal con miras a disminuir la incidencia de *Campylobacter* spp. en el intestino de pollos, debido a su alta capacidad antimicrobiana contra esta bacteria. A pesar de esto, la baja solubilidad de estos compuestos hace que los oligómeros obtenidos a partir de éstos constituyan una alternativa interesante al empleo de antibióticos en la alimentación de pollos, con miras a la disminución de la incidencia de *Campylobacter* en estos, sin afectar considerablemente a los componentes de la microbiota autóctona intestinal. De igual manera, resultaría interesante ahondar acerca del empleo de Qs y sus oligómeros en alimentación humana, en búsqueda de la modulación de la microbiota intestinal y de la eliminación de patógenos intestinales.

#### 5.4. CONCLUSIONES

De los microorganismos estudiados, *Campylobacter* spp. fue el más sensible al Qs, independientemente del PM de éste. La concentración mínima inhibitoria del compuesto sobre *Campylobacter* varió entre 0,005 y 0,05%, lo que demuestra la sensibilidad global de esta bacteria a los Qs. A pesar de esto, se observaron diferencias en el nivel de sensibilidad a los Qs entre las distintas cepas de *Campylobacter* estudiadas.

El Qs ocasionó una pérdida en la integridad de la membrana de *Campylobacter*, medida como el incremento en la permeabilidad celular ante un marcador de fluorescencia, la cual resultó mayor en la fase exponencial de crecimiento y disminuyó gradualmente a medida que las células entraron en fase estacionaria.

Las características de los Qs dependen del origen de la muestra y de su forma de obtención, difiriendo en cuanto a PM, grado de deacetilación y viscosidad.

El efecto antimicrobiano de los oligómeros de quitosanos sobre *C. jejuni* depende de su origen, la fracción y la enzima empleada para su extracción. Los oligómeros preparados con quitosanas poseen una actividad antimicrobiana mayor contra *C. jejuni* que los obtenidos usando lisozima. Las fracciones mayores (más de 30 KDa y entre 10 y 30 KDa) presentan mayor actividad que los Qs parentales, mientras que las de 3-10 KDa apenas afectan la viabilidad bacteriana.

## 5.5. BIBLIOGRAFÍA

Beverly, R.L., Janes, M.E., Prinyawiwatmula, W., No, H.K. 2008. Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. Food Microbiology 25: 534-537.

Cabrera, C., Van Cutsem, P. 2005. Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan. Biochemical Engineering Journal 25: 165-172.

Cagri, A., Ustunol, Z., Ryser, E.T. 2004. Antimicrobial edible films and coatings. Journal of Food Protection 67: 833-848.

Casadevall, A., Pirofski, L.A. 2007. Accidental virulence, cryptic pathogenesis, martians, lost hosts, and the pathogenicity of environmental microbes. Eukaryotic Cell 6: 2169-2174.

Chhabra, P., Huang, Y.W., Frank, J.F., Chmielewski, R., Gates, K. 2006. Fate of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, and *Vibrio vulnificus* in raw oysters treated with chitosan. Journal of Food Protection 69: 1600-1604.

Ching Tan, S., Khor, E., Koon Tan, T., Man Wong, S. 1998. The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination. Talanta 45: 713-719.

Chiu, H.T., Chen, R.L., Wu, P.Y., Chiang, T.Y. 2007. A study on the effects of the degree of deacetylation of chitosan films on physical and antibacterial properties. Polymer-plastics Technology and Engineering 46: 1121-1127.

Choi, B.K., Kim, K.Y., Yoo, Y.J., Oh, S. J., Choi, J.H., Kim, C.Y. 2001. *In vitro* antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. International Journal of Antimicrobial Agents 18: 553-557.

Devlieghere, F., Vermeulen, A., Debevere, J. 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. Food Microbiology 21: 703-714.

Fisher, J.F., Meroueh, S.O., Mobashery, S. 2006. Nanomolecular and supramolecular paths toward peptidoglycan structure. Microbe 1: 420-427.

Hasegawa, M., Yagi, K., Iwakawa, S., Hirai, M. 2001. Chitosan induces apoptosis via caspase-3 activation in bladder tumor cells. Japanese Journal of Cancer Research 92: 459-466.

Helander, I. M., Mäkelä, P.H., Westphal, O., Rietschel, E.T. 1996. *Lipopolysaccharides*. En: Encyclopedia of Molecular Medicine. Meyers, R.A. (Ed). Weinheim. Nueva York, p. 1124-1128.

Helander, I.M., Nurmianho-Lassila, E.L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., Roller, S. 2001. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. International Journal of Food Microbiology 71: 235-244.

Hirano S., Nagao, N. 1989. Effects of chitosan, peptic acid, lysozyme and chitinase on the growth of several phytopathogens. Agricultural and Biological Chemistry 53: 3065-3066.

INE. 2009. Producción acuícola marina por especies y periodo [en línea]. Referencia de 2 de marzo de 2009. Disponible en: <http://www.ine.es/infoine>.

Jeon, Y.J., Park, P.J., Kim, S.K. 2001. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. Carbohydrate Polymers 44: 71-76.

- Kim, K.W., Thomas, R.L., Lee, C., Park, H.J. 2003. Antimicrobial activity of native chitosan, degraded chitosan, and O-carboxymethylated chitosan. *Journal of Food Protection* 66: 1495-1498.
- Kim, S.H., No, H.K., Prinyawiwatkul, W. 2007. Effect of molecular weight, type of chitosan, and chitosan solution pH on the shelf-life and quality of coated eggs. *Journal of Food Science* 72: S44-S48.
- Knaul, J.Z., Hudson, S.M., Creber, K.A.M. 1999. Cross linking of chitosan fibers with dialdehydes: proposal of a new reaction mechanism. *Journal of Polymer Science*. 37: 1079-1094.
- Kurita, K., Kaji, Y., Nishiyama, Y. 2000. Enzymatic degradation of b-chitin: susceptibility and the influence of deacetylation. *Carbohydrate Polymers* 42:19-21.
- Lee, H.W., Park, Y.S., Jung, J.S., Shin, W.S. 2003. Chitosan oligosaccharides, dp 2-8, have a prebiotic effect on the *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus* sp. *Anaerobe* 8: 319-324.
- Li, X.J., Piao, X.S., Kim, S.W., Liu, P., Wang, L., Shen, Y.B., Jung, S.C., Lee, H. S. 2007. Effects of chito-oligosaccharide supplementation on performance, nutrient digestibility, and serum composition in broiler chickens. *Poultry Science* 86: 1107-1114.
- Liu, N., Chen, X.G., Park, H.J., Liu, C.G., Liu, C.S., Meng, X.H., Yu, L.J. 2006. Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. *Carbohydrate Polymers* 64: 60-65.
- Liu, P., Piao, X.S., Kim, S.W., Wang, L., Shen, Y.B., Lee, H.S., Li, S.Y. 2008. Effects of chito-oligosaccharide supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, and fecal shedding of *Escherichia coli* and *Lactobacillus* in weaning pigs. *Journal of Animal Science* 86: 2609-2618.
- Liu, X. F., Guan, Y.L., Yang, D.Z., Li, Z., Yao, K.D. 1999. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of Applied Polymer Science* 79: 1324-1335.
- Martínez-Rodríguez, A., Mackey, B.M. 2005. Physiological changes in *Campylobacter jejuni* on entry into stationary phase. *International Journal of Food Microbiology* 101: 1-8.
- Miralles, B., Martinez-Rodríguez, A., Santiago, A., van de Lagemaat, J., Heras, A. 2007. The occurrence of a maillard-type protein-polysaccharide reaction between  $\beta$ -lactoglobulin and chitosan. *Food Chemistry* 100: 1071-1075.
- Muzzarelli, R.A.A.1977. Chitin. Pergamon. Oxford.
- No, H.K., Meyers, S.P., Prinyawiwatkul, W., Xu, X. 2007. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A review. *Journal of Food Science* 72: R87-R100.
- No, H.K., Park, N.Y., Lee, S.H., Meyers, S.P. 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology* 74: 65-72.
- Qin, C., Li, H., Xiao, Q., Liu, Y., Zhu, J., Du, Y. 2005. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers* 63: 367-374.
- Raafat, D., Von Bargaen, K., Haas, A., Sahl, H.G. 2008. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 3764-3773.
- Rhoades, J., Roller, S. J. 2000. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 80-86.

- Roller, S., Covill, N. 1999. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology* 47: 67-77.
- Roller, S., Sagooa, S., Boarda, R., O'Mahonyb, T., Capliceb, E., Fitzgeraldb, G., Fogdenc, M., Owenc, M., Fletcher, H. 2002. Novel combinations of chitosan, carnocin and sulphite for the preservation of chilled pork sausages. *Meat Science* 62: 165-177.
- Rungsardthong, V., Wongvuttanakul, N., Kongpien, N., Chotiwaranon, P. 2006. Application of fungal chitosan for clarification of apple juice. *Process Biochemistry* 41: 589-593.
- Sagoo, S., Board, R., Roller, S. 2002. Chitosan inhibits growth of spoilage micro-organisms in chilled pork products. *Food Microbiology* 19: 175-182.
- Sano, H., Shibasaki, K., Matsukubo, T., Takaesu, Y. 2001. Comparison of the activity of four chitosan derivatives in reducing initial adherence of oral bacteria onto tooth surfaces. *The Bulletin of Tokyo Dental College* 42: 243-249.
- Sashiwa, H., Saimoto, H., Shigemasa, Y., Ogawa, R., Tokura, S. 1990. Lysozyme susceptibility of partially decetylated chitin. *International Journal of Biological Macromolecules* 12: 295-296.
- Shigehiro, H., Chitoshi, I., Haruyoshi, S. 1990. Chitosan as an ingredient for domestic animal feeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 87: 1214-1217.
- Tiyaboonchai, W. 2003. Chitosan nanoparticles: A promising system for drug delivery. *Naresuan University Journal* 11: 51-66.
- Tsai, G., Su, W., Chen, H., Pan, C. 2002. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fisheries Science* 68: 170-177.
- Tsai, G., Hwang, S. 2004. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of shrimp chitosan against some intestinal bacteria. *Fisheries Science* 70: 675-681.
- Uchida, Y., Izume, M., Ohtakara, A. 1989. Preparation of chitosan oligomers with purified chitosanase and its application. En: *Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*. Braek, G., Anthonsen, T., Sandford, P. (Ed). Elsevier Applied Science. Barking, p. 372-382.
- Vaara, M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbial Research* 56: 395-411.
- Wang, W., Bo, S.Q., Li, S.Q., Qin, W. 1991. Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation. *International Journal of Biological Macromolecules* 13: 281-285.
- Wang, Y., Zhou, P., Yu, J., Pan, X., Wang, P., Lan, W., Tao, S. 2007. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by chitosanase from *Pseudomonas* CUY8. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 16: 174-177.
- Zheng, L.Y., Zhu, J.F. 2003. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate polymers* 54: 527-530.

Se estudió el poder antimicrobiano de tres tipos de vinos jóvenes diferentes: blanco, rosado y tinto, sobre dos cepas distintas de *C. jejuni* (LP1 y 11351). Se comprobó que los vinos, que presentaron una concentración del 11,5% de etanol, fueron capaces de disminuir de manera significativa la viabilidad del patógeno, aún después de ser diluidos al 25%. El poder microbicida del vino tinto resultó mayor que el del vino rosado, y este fue superior al del vino blanco. Estos resultados sugieren que otros compuestos del vino, además del alcohol y el pH, presentan actividad antimicrobiana. El estudio individual de estos factores demostró el poder antimicrobiano del alcohol en las concentraciones utilizadas, mientras que el pH no afectó significativamente la viabilidad de *Campylobacter*. Se estudió el poder antimicrobiano frente a *C. jejuni* de una serie de compuestos fenólicos puros que están presentes en la uva y en el vino. Se utilizó un rango de concentración comprendido entre 0 y 100 mg/mL. Algunos compuestos fenólicos estudiados presentaron actividad antimicrobiana frente a *Campylobacter*, y el efecto observado fue dependiente de la cepa estudiada. La permeabilidad de la membrana externa (ME) al yoduro de propidio (IP) aumentó de manera significativa en presencia de los compuestos fenólicos activos contra *C. jejuni*, lo que sugiere que éste es el mecanismo de acción en las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo. Nuestros resultados indican que algunos compuestos fenólicos presentes en el vino podrían contribuir a la disminución de la colonización de *C. jejuni* y reducir la incidencia de campilobacteriosis en humanos. De igual manera, podrían ser empleados como compuestos funcionales en alimentación humana.



Capítulo

# 6

Actividad antimicrobiana de compuestos fenólicos  
presentes en la uva y el vino contra *Campylobacter*

## 6.1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La cosecha de la uva es una de las más importantes a nivel mundial, con más de 60 millones de toneladas métricas producidas al año. La mayor parte de la producción de uvas se dedica a la fabricación de vino. España es uno de los mayores productores de vino con una obtención de entre 31 y 50 millones de hectolitros anuales en el período 2000-2005 (FAOSTAT, 2006; FAS, 2006).

Se estima que, en todo el mundo, las industrias vinícolas producen anualmente entre 7 y 9 millones de toneladas de residuos (Baumgartel *et al.*, 2005). El manejo de dichos residuos constituye un gran problema medioambiental debido a su carácter estacional y a sus características contaminantes (KEPOS, 2000; Seóñez *et al.*, 2000; Vogt *et al.*, 1986). En este sentido, se estima que entre los meses de agosto y octubre de 2005 sólo en España se produjeron 787.000 toneladas de residuos de semillas y pieles, comunmente denominados orujos (FAOSTAT, 2006).

A pesar de que algunos autores afirman que el uso de estos residuos como fertilizantes de suelos podría ser una buena opción para minimizar el impacto ambiental, se cree que los orujos pueden resultar fitotóxicos, lo que los hace incompatibles con los requerimientos necesarios para ser empleados como abono orgánico en agricultura y los convierte en residuo de bajo uso, aumentando así su impacto ambiental. Se cree que la fitotoxicidad de estos residuos se debe principalmente a la presencia de compuestos fenólicos. Se ha determinado que los orujos poseen una alta concentración de dichos compuestos, entre 1,2 y 19,0 g por cada Kg (Bustamante *et al.*, 2008).

Sin embargo, se ha visto que estos compuestos son capaces de afectar al crecimiento y metabolismo de algunas bacterias patógenas (Rodríguez-Vaquero *et al.*, 2007a; Rodríguez-Vaquero *et al.*, 2007b; Puupponen-Pimiä *et al.*, 2005; Wen *et al.*, 2003), lo que convierte a los orujos de vinificación, ricos en compuestos fenólicos, en potenciales antimicrobianos naturales. Debido a lo anterior, resulta especialmente interesante determinar el efecto de dichos compuestos sobre *Campylobacter* spp. Los orujos podrían constituir una fuente potencial de compuestos fenólicos a utilizarse como complemento en la alimentación de pollos y humanos; con el fin de disminuir la incidencia del patógeno en el hospedador y, de esta manera, disminuir el riesgo de contaminación de humanos por consumo de estos animales.

A pesar de la gran cantidad de residuos de uva producidos en España cada año y pese a la alta incidencia de enfermedades gastrointestinales en humanos ocasionadas por *Campylobacter* spp., hasta el momento no se han realizado estudios referentes al potencial uso de los compuestos fenólicos

presentes en la uva como complemento en la alimentación del pollo y humano, con miras a la eliminación de este patógeno de la cadena alimentaria.

Curiosamente, y a pesar de que el vino es una bebida de gran consumo en España y aunque se ha visto que tiene un importante poder antimicrobiano contra otros patógenos alimentarios como *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria*, *Shigella* y *H. pylori* (Fernández *et al.*, 2007; Moretro y Daeschel, 2004; Just y Daeschel, 2003; Mahady *et al.*, 2003, Sugita-Konishi *et al.*, 2001; Brenner *et al.*, 1999; Marimon *et al.*, 1998; Bellido Blasco *et al.*, 1996; Sheth *et al.*, 1988), hasta el momento tampoco se ha estudiado su efecto sobre *Campylobacter*.

El objetivo principal de este capítulo es determinar la influencia de los compuestos fenólicos predominantes en la uva y en el vino sobre la viabilidad de *Campylobacter*. Además de lo anterior, se estudiará también el efecto antimicrobiano del vino sobre el patógeno y se determinará si es debido únicamente al bajo pH y a la alta concentración de etanol, o si por el contrario, los compuestos fenólicos tienen influencia sobre dicho efecto. Por todo esto, se persiguieron los siguientes objetivos específicos:

Determinar el efecto de la concentración y del tipo de vino sobre la viabilidad de *Campylobacter*.

Estudiar la influencia de la concentración de etanol del vino sobre la viabilidad de *Campylobacter*.

Establecer el efecto del pH del vino sobre la viabilidad de *Campylobacter*.

Evaluar la influencia de los compuestos fenólicos presentes en el vino y las uvas sobre la viabilidad de *Campylobacter*.

Determinar el efecto que ejercen los compuestos fenólicos del vino y las uvas sobre la membrana celular de *Campylobacter*.

## **6.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.2.1. Muestras de vinos**

Se utilizaron muestras comerciales de vino blanco, rosado y tinto de mesa con un porcentaje de alcohol de 11,5% cada uno.

### **6.2.2. Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos puros analizados en este trabajo fueron: ácido ferúlico, metil galato, epicatequina, ácido sinápico, ácido hidroxibenzóico, quercitina, ácido gálico, ácido vanílico, triptofol, ácido p-cumárico, ácido caféico y catequina (Sigma, Saint Louis, EE.UU.).

### **6.2.3. Células bacterianas**

#### **6.2.3.1. Medios y reactivos, cepas y condiciones de cultivo**

En esta sección se emplearon las cepas *C. jejuni* LP1 y *C. jejuni* NCTC 11351, obtenidas y cultivadas según se indica en 2.2.2.1.-2.2.2.3.

### **6.2.4. Influencia de la concentración de vino sobre la viabilidad de *Campylobacter***

El inóculo bacteriano se suspendió en vino y PBS para lograr concentraciones de vino de 1, 10, 25, 50, 75 y 100%. Se incubó en VAIN durante 10 min en agitación a 150 rpm (agitador S3 orbital shaker, Elmi, Latvia), se realizaron diluciones seriadas y se sembró en agar MHS.

### **6.2.5. Influencia del alcohol sobre la viabilidad de *Campylobacter***

Se preparó una solución patrón de etanol en PBS al 11,5% v/v (pH 7). El inóculo bacteriano se resuspendió en la solución patrón y PBS para lograr concentraciones de ésta de 1, 10, 25, 50, 75 y 100%. Se incubó en VAIN durante 10 min en agitación a 150 rpm (agitador S3 orbital shaker, Elmi, Latvia), se realizaron diluciones seriadas y se sembró en agar MHS.

### **6.2.6. Influencia del pH sobre la viabilidad de *Campylobacter***

El inóculo bacteriano se suspendió en PBS (pH 3,2 y pH 7). Se incubó en VAIN durante 10 min en agitación a 150 rpm (agitador S3 orbital shaker, Elmi, Latvia), se realizaron diluciones seriadas y se sembró en agar MHS.

### **6.2.7. Influencia de compuestos fenólicos del vino y la uva sobre la viabilidad de *Campylobacter***

Los compuestos fenólicos se agregaron a inóculos bacterianos de *C. jejuni* LP1 y *C. jejuni* NCTC 11351 previamente lavados y resuspendidos en PBS (pH 7) con 5% v/v de etanol, para obtener una concentración final de 1, 10, 100 ó 1000 mg/mL. Se incubó durante 10 min (tiempo establecido en trabajos previos, datos no mostrados) en agitación en VAIN, se realizaron diluciones seriadas y se sembró en agar MHS.

### **6.2.8. Determinación de la integridad de la membrana celular bacteriana**

Para determinar el efecto de los diferentes compuestos fenólicos sobre la viabilidad de *C. jejuni* LP1 y *C. jejuni* NCTC 11351, los microorganismos se incubaron en VAIN durante 10 min con cada uno de los compuestos fenólicos, utilizando una concentración de 1000 mg/mL, y posteriormente se siguió la metodología descrita en el apartado 5.2.5.

### **6.2.9. Análisis estadístico**

Los datos experimentales se analizaron utilizando el programa Minitab versión 14.1 (Minitab 14, State College, PA). Para el análisis de datos se empleó la prueba t de Student. Las diferencias entre muestras se consideraron significativas cuando  $p \leq 0,05$ . En las Tablas y Figuras, N se refiere al número de experimentos realizados y n al número de muestras analizadas.

## 6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.3.1. Influencia de la concentración de vino sobre la viabilidad de *Campylobacter*

Se emplearon diferentes concentraciones de los vinos (100, 75, 50, 25, 10 y 1%) para determinar la concentración mínima que es capaz de afectar la viabilidad de *Campylobacter* (Tabla 6.1). Se comprobó la calidad microbiológica de los vinos antes de llevar a cabo el estudio propuesto (resultados no mostrados).

Como tiempo de incubación del vino con el patógeno se empleó un período de 10 min ya que en experimentos previos (resultados no mostrados) se determinó que éste es el tiempo mínimo requerido para lograr la inhibición total del crecimiento de *C. jejuni* LP1 con cada una de las tres variedades de vino empleadas en este ensayo (concentración 100%).

**Tabla 6.1.** Influencia de diferentes concentraciones (100, 75, 50, 25, 10 y 1%) de vino blanco, tinto y rosado sobre la viabilidad de *C. jejuni* LP1. Resultados expresados como Log ufc/mL  $\pm$  la desviación estándar para N=2, n=2. (a) Calculado en base al límite de detección logarítmico (30 ufc/mL). (b) Significativamente diferentes al control.

	Concentración del vino (%)						
	100	75	50	25	10	1	0
<b>Blanco</b>	< 1,48 <sup>ab</sup>	< 1,48 <sup>ab</sup>	< 1,48 <sup>ab</sup>	6,41 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	6,99 $\pm$ 0,02	7,02 $\pm$ 0,03	7,02 $\pm$ 0,03
<b>Tinto</b>	< 1,48 <sup>ab</sup>	< 1,48 <sup>ab</sup>	< 1,48 <sup>ab</sup>	< 1,48 <sup>ab</sup>	< 1,48 <sup>ab</sup>	7,38 $\pm$ 0,03	7,38 $\pm$ 0,02
<b>Rosado</b>	< 1,48 <sup>ab</sup>	< 1,48 <sup>ab</sup>	< 1,48 <sup>ab</sup>	< 1,48 <sup>ab</sup>	< 1,48 <sup>ab</sup>	5,64 $\pm$ 0,05	5,53 $\pm$ 0,04

Los resultados indican que la concentración mínima microbicida del vino rosado y tinto es de 10%, mientras que para el blanco es de 25%. Como se observa, los vinos tintos estudiados poseen un mayor efecto microbicida contra *C. jejuni* LP1 que los vinos blancos.

Los vinos tintos poseen mayores concentraciones de compuestos fenólicos totales que los rosados y estos que los blancos (Tabla resumen en Balasundram *et al.*, 2006). Por ejemplo, se ha visto que los vinos tintos españoles poseen en promedio 1869 mg de equivalentes de ácido gálico/L,

mientras que los blancos tienen únicamente 292 (Sánchez-Moreno *et al.*, 1999), por lo que es posible que parte del efecto bactericida del vino sobre *Campylobacter* sea debido a la presencia de algunos de estos compuestos.

En estudios previos *in vitro* se ha visto que el vino es efectivo contra numerosos microorganismos potencialmente patógenos entre los que se encuentran *Chlamydia pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei* y *Yersinia enterocolitica* (Fernández *et al.*, 2007; Just y Daeschel, 2003; Mahady *et al.*, 2003; Schiever *et al.*, 2003; Murray *et al.*, 2002; Corona *et al.*, 2001; Daroch *et al.*, 2001; Bellido Blasco *et al.*, 1996; Weisse *et al.*, 1995; Sheth *et al.*, 1988).

Además de lo anterior, se ha determinado también que el vino ocasiona un incremento en la secreción gástrica y en la motilidad intestinal, lo que puede llegar a potenciar el efecto antimicrobiano del propio intestino humano, contribuyendo así a la disminución del riesgo de padecer enfermedades entéricas por dificultarse la invasión intestinal por patógenos, los cuales necesitan de un tiempo de residencia que se acorta por los estímulos desencadenados por la ingesta moderada de esta bebida (Bujanda, 2000; Pfeiffer *et al.*, 1992).

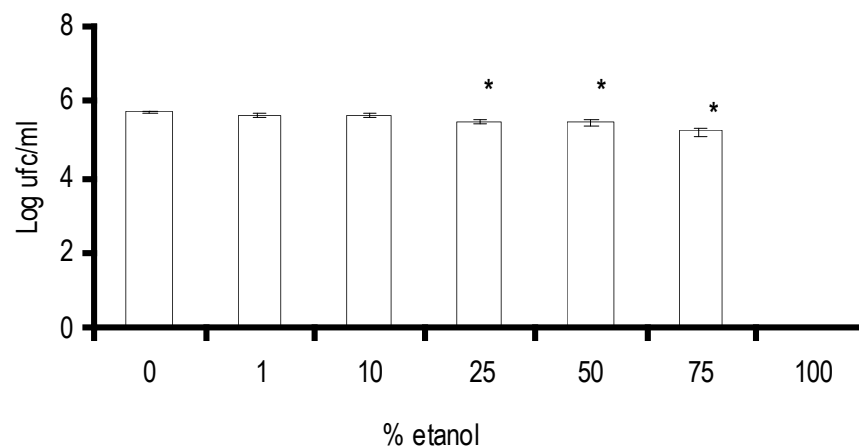
### **6.3.2. Influencia de la concentración de etanol sobre la viabilidad de *Campylobacter***

Se ha descrito previamente que el alcohol disminuye de manera significativa la viabilidad de los microorganismos, ya que deteriora su membrana plasmática y ocasiona un aumento en su permeabilidad (Waite y Daeschel, 2007), y que concentraciones superiores a 15% de etanol conducen a una inactivación inmediata de la mayor parte de las estructuras vegetativas (Ingram *et al.*, 1984). En base a lo anterior, se determinó hasta qué punto el etanol presente en el vino es el responsable de la pérdida de viabilidad de *C. jejuni* LP1. Para ello, la cepa *C. jejuni* LP1 se expuso a concentraciones de etanol equivalentes a las presentes en el vino (11,5%) y en el vino diluido al 75, 50, 25, 10 ó 1% (Figura 6.1.).

Se observó que el etanol afecta de manera significativa la viabilidad de *C. jejuni* LP1 cuando está presente en concentraciones equivalentes a las que se encuentran en los vinos diluidos al 25%. En este sentido, se ha visto que el consumo de vino con más de 10° de etanol en su composición

puede proteger contra patógenos entéricos e incluso contra la infección ocasionada por el virus de la hepatitis A, que puede transmitirse al ser humano a través de alimentos como las ostras (Desenclos *et al.*, 1992).

Según lo anterior, el poder bactericida del vino puede ser debido en parte al etanol, ya que, a concentraciones menores a 25%, no afecta de manera significativa la viabilidad del microorganismo. Sin embargo, este resultado no explicaría el comportamiento diferente como microbicida de los vinos blancos y tintos.



**Figura 6.1.** Influencia de la concentración de etanol sobre la viabilidad de *C. jejuni* LP1. Las concentraciones de etanol son equivalentes a las de un vino con 11,5% v/v de etanol y de dicho vino diluido al 1; 10; 25; 50 y 75%. Resultados expresados como Log ufc/mL  $\pm$  la desviación estándar para N=2, n=2. (\*) Recuentos significativamente diferentes comparados al control.

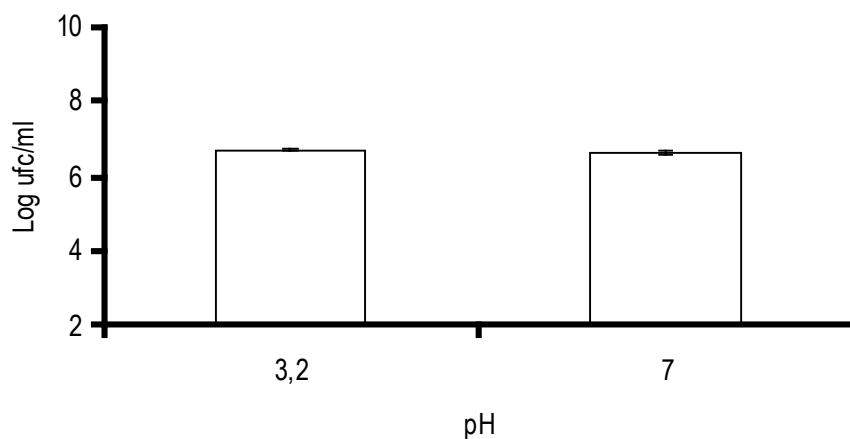
### 6.3.3. Influencia del pH sobre la viabilidad de *Campylobacter*

Los vinos se caracterizan por presentar un pH ácido. En este estudio, la determinación del pH de las muestras utilizadas arrojó valores de 3,2; 3,6 y 3,8, para vino blanco, rosado y tinto, respectivamente. Con el fin de determinar la influencia de este parámetro sobre *C. jejuni* LP1, se comparó la viabilidad de este patógeno a pH neutro y a pH 3,2; este último correspondiente al vino blanco, el cual presentó el mayor grado de acidez entre los vinos estudiados (Figura 6.2.).



No se observaron diferencias significativas entre los recuentos bacterianos a pH 7 y 3,2 ( $p>0,05$ ), lo que parece indicar que este parámetro no afecta la viabilidad de *C. jejuni* LP1 bajo las condiciones analizadas y en el tiempo de experimentación empleado (10 min).

A pesar de los resultados anteriores, se sabe que *C. jejuni* posee una gran sensibilidad a condiciones ambientales ácidas, en especial a niveles de pH menores a 5 (Alterkruse *et al.*, 1999). Sin embargo, es ampliamente conocido que para que *C. jejuni* pueda llegar al colon, antes debe atravesar la parte superior del sistema digestivo y soportar las condiciones ácidas y enzimáticas que presenta cada región. Dentro del tracto gastrointestinal del pollo, las secciones de menor pH corresponden al buche (pH 4,74), al proventrículo (pH 4,03) y a la molleja (pH 3,35) (Gordon y Roland, 1997), por lo que el patógeno debe contar con los mecanismos necesarios para enfrentar tales condiciones durante el tiempo que dura su tránsito por estas regiones (Reid *et al.*, 2008).



**Figura 6.2.** Influencia del pH sobre la viabilidad de *C. jejuni* LP1 en comparación al control (pH 7). Resultados expresados como Log ufc/mL  $\pm$  la desviación estándar para N=2, n=2.

La habilidad de los patógenos entéricos para soportar condiciones ácidas afecta al número de bacterias necesarias para generar patogenicidad, siendo denominado este número dosis infectiva mínima. De hecho, se ha visto que aquellos patógenos que han desarrollado estrategias eficaces para luchar contra estas condiciones de estrés, poseen una baja dosis infectiva mínima (Reid *et al.*, 2008). Por ejemplo, se ha visto que *Shigella flexneri* posee una dosis infectiva mínima de tan sólo 100 microorganismos y es capaz de sobrevivir condiciones extremas de acidez, ya que logra sobrevivir *in vitro* a pH 2,5 durante horas (Blaser y Newman, 1982).

Dada la baja dosis infectiva mínima de *C. jejuni*, que puede llegar a ser hasta de 40 microorganismos (Johansen *et al.*, 2006), ha de admitirse que la bacteria se encuentra bien adaptada para soportar las condiciones ácidas del sistema gastrointestinal (Reid *et al.*, 2008). A pesar de esto, se ha visto que el genoma de *C. jejuni* carece de muchos de los elementos de respuesta al estrés ácido encontrados en otras bacterias (Holmes *et al.*, 2005; Palyada *et al.*, 2004), aunque recientemente se han descubierto algunos genes relacionados con su respuesta ante bajos niveles de pH (Reid *et al.*, 2008).

#### **6.3.4. Influencia de compuestos fenólicos del vino y la uva sobre la viabilidad de *Campylobacter***

Considerando como hipótesis que las diferencias entre los recuentos de microorganismos encontrados en vinos blancos, rosados y tintos no se debieron exclusivamente a la concentración de alcohol o al pH, podrían deberse a algún compuesto encontrado en mayores concentraciones en vino tinto y rosado (Moretro y Daeschel, 2004). En estudios previos se ha visto que algunas bebidas con igual pH y concentración de alcohol que un vino tinto presentan una menor actividad antimicrobiana que éste frente a *Salmonella enteritidis*, y este efecto ha sido atribuido a la presencia de los compuestos fenólicos presentes en el vino, provenientes de la uva (Marimon *et al.*, 1998).

En las uvas, los compuestos fenólicos se concentran mayormente en la piel y semillas (Rodríguez Montealegre *et al.*, 2006). Los compuestos fenólicos contenidos en la uva son parcialmente extraídos durante la elaboración del vino. En el caso de los vinos tintos, las semillas y la piel de la fruta se mantienen en contacto con el vino durante varios días, lo que permite una mayor liberación de estos compuestos, al igual que en los rosados por provenir de la uva tinta, por lo que su concentración en estos vinos es mayor que en los blancos, (Priego Capote *et al.*, 2007).

Con anterioridad se ha demostrado que algunos de estos compuestos, además de ser considerados como potentes antioxidantes (Soares, 2002) pueden tener propiedades microbicidas ante diferentes microorganismos, sin embargo, su efecto sobre *C. jejuni* no se ha estudiado. Debido a lo anterior, se analizó el efecto de diferentes concentraciones de algunos de los compuestos fenólicos mayoritariamente encontrados en las uvas y el vino, sobre la viabilidad de *C. jejuni* LP1 y *C. jejuni* NCTC 11351, con el fin de determinar la concentración mínima microbicida de cada uno de ellos frente a ambas cepas (Tabla 6.2.).

Se observó que *C. jejuni* LP1 es inhibido por todos los compuestos fenólicos estudiados de manera proporcional a la concentración empleada, a excepción de la catequina y la quercitina, que no tuvieron efecto sobre la viabilidad del patógeno, incluso a concentraciones de 1000 mg/mL. La misma relación entre la concentración empleada y el efecto microbicida se observó también para la cepa *C. jejuni* NCTC 11351, a excepción de en el caso de la epicatequina, el ácido sinápico, el ácido vanílico y el triptofol, compuestos que no presentaron actividad antimicrobiana sobre la cepa.

**Tabla 6.2.** Influencia de diferentes compuestos fenólicos presentes en el vino sobre la viabilidad de *C. jejuni* LP1 y *C. jejuni* NCTC 11351 empleando concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 mg/mL. Resultados expresados como las diferencias con respecto al control (Log ufc/mL) para N=2, n=2. (+) Significativamente diferente al control ( $p \leq 0,05$ ).

Compuesto fenólico	<i>C. jejuni</i> LP1				<i>C. jejuni</i> NCTC 11351			
	Concentración (mg/mL)				Concentración (mg/mL)			
	1	10	100	1000	1	10	100	1000
Ácido ferúlico	-	-	+	+	-	+	+	+
Metil galato	-	+	+	+	-	-	-	+
Epicatequina	-	+	+	+	-	-	-	-
Ácido sinápico	-	+	+	+	-	-	-	-
Ácido hidroxibenzóico	+	+	+	+	-	+	+	+
Quercitina	-	-	-	-	+	+	+	+
Ácido gálico	+	+	+	+	-	+	+	+
Ácido vanílico	-	+	+	+	-	-	-	-
Triptofol	-	-	+	+	-	-	-	-
Ácido p-cumárico	-	-	+	+	-	+	+	+
Ácido caféico	-	+	+	+	-	-	+	+
Catequina	-	-	-	-	-	+	+	+

Los dos compuestos de mayor efecto microbicida sobre *C. jejuni* LP1 fueron el ácido gálico y el ácido p-hidroxibenzoico, ya que a concentraciones tan bajas como 1 mg/mL fueron capaces de disminuir significativamente la viabilidad del microorganismo. En vinos tintos jóvenes españoles similares a los empleados en este estudio se han encontrado concentraciones entre  $15,11 \pm 5,09$  y  $27,21 \pm 7,42$  mg/mL en el caso del ácido gálico y entre  $21,73 \pm 4,84$  y  $33,92 \pm 11,12$  mg/mL del ácido hidroxibenzoico (Rodríguez-Delgado *et al.*, 2002), por lo que se podría atribuir a estos compuestos parte del poder antimicrobiano del vino sobre la cepa, ya que de forma natural se encuentran a concentraciones mayores a la estudiada.

A diferencia de lo anterior, el compuesto con mayor actividad sobre *C. jejuni* NCTC 11351 fue la quercitina, que inhibió su crecimiento incluso a 1 mg/mL. Resulta interesante recalcar que dicho compuesto no presentó efectos antimicrobianos sobre la cepa *C. jejuni* LP1. En vinos tintos jóvenes españoles se han observado concentraciones de quercitina que varían entre  $8,45 \pm 3,70$  y  $25,57 \pm 11,48$  mg/mL (Rodríguez-Delgado *et al.*, 2002), por lo que podría esperarse que en el vino el efecto antimicrobiano de dicho compuesto sobre esta cepa pueda ser de interés.

Después de la quercitina, los compuestos que presentaron un mayor poder antimicrobiano contra *C. jejuni* NCTC 11351 fueron la epicatequina y los ácidos ferúlico, hidroxibenzoico, gálico y p-cumárico, que resultaron eficaces incluso a concentraciones de 10 mg/mL. Además de las concentraciones de ácido gálico y ácido hidroxibenzoico determinadas en vinos españoles tintos jóvenes mencionadas con antelación, se ha visto que la concentración de epicatequina se encuentra entre  $9,24 \pm 4,56$  y  $14,87 \pm 6,23$  mg/mL (Rodríguez-Delgado *et al.*, 2002), por lo que podría decirse que también estos compuestos pueden ser en parte causantes del poder antimicrobiano del vino sobre esta cepa. En los mismos vinos se ha determinado que la concentración de ácido ferúlico entre  $0,47 \pm 0,28$  y  $0,81 \pm 0,34$  mg/mL y la de ácido p-cumárico entre  $0,22 \pm 0,09$  y  $2,77 \pm 0,43$  mg/mL, por lo que podría esperarse que no afecten de manera significativa la viabilidad de la cepa en el vino.

Por otra parte, los compuestos que fueron efectivos contra *C. jejuni* LP1 a 10 mg/mL fueron el metil galato, la epicatequina, el ácido sinápico, el ácido vanílico y el ácido caféico. En vinos tintos se han reportado concentraciones iguales o superiores a éstas únicamente en el caso de la epicatequina (Rodríguez-Delgado *et al.*, 2002; Salagoite-Auguste y Bertrand, 1984), por lo que se puede pensar que entre estos compuestos.

En contraste con los resultados mencionados, los compuestos anteriores presentaron una baja actividad antimicrobiana contra la cepa *C. jejuni* NCTC 11351 en el caso del ácido caféico

(concentración mínima microbicida = 100 mg/mL) y del metil galato (1000 mg/mL), y nula para el caso de la epicatequina, ácido sinápico y ácido vanílico, como ya se ha mencionado.

El ácido ferúlico, el triptofol y el ácido p-cumárico afectaron significativamente la viabilidad de *C. jejuni* LP1 aunque a concentraciones que no se alcanzan normalmente en vinos (mayores a 100 mg/mL). A pesar de que puede que dichos compuestos en el vino no sean capaces de disminuir la viabilidad del patógeno, resultaría interesante estudiar su posible uso como antibacteriano.

Como se observa en los resultados, el efecto de los diferentes compuestos fenólicos podría variar de acuerdo con la cepa empleada. Como se comentó en el Capítulo 2, podría admitirse que la cepa de colección (*C. jejuni* NCTC 11351) ha logrado desarrollar mayores mecanismos de defensa ante una mayor cantidad de compuestos, posiblemente debido a los sucesivos pases *in vitro*.

Previamente, se ha observado para otros microorganismos una relación entre el poder antimicrobiano de los compuestos fenólicos y la cepa bacteriana estudiada. Se ha visto, por ejemplo, que para que la cepa *E. coli* ATCC 35218 sea afectada por los ácidos gálico, vanílico, caféico y por la quercitina y la catequina, se requieren de concentraciones de 200, 500, 1, 100 y 200 mg/mL, respectivamente, mientras que la cepa *E. coli* ATCC 25922, no se ve afectada por la presencia de ácido vanílico o catequina, y que para que su viabilidad se vea afectada, es necesario el empleo de cantidades diferentes de los mismos compuestos, hasta 500 mg/mL de ácido gálico y quercitina, y 100 mg/mL de ácido caféico (Rodríguez-Vaquero *et al.*, 2005).

Algunos compuestos fenólicos del vino como la quercitina y los ácidos gálico, vanílico, caféico poseen propiedades antimicrobianas contra patógenos como *E. coli*, *P. fluorescens* o *K. pneumoniae* en concentraciones de hasta 0,3 mg/mL (Rodríguez-Vaquero *et al.*, 2007a; Rodríguez-Vaquero *et al.*, 2007b; Aziz *et al.*, 1998; Baranowski y Nagel, 1982). Se ha visto también que los ácidos hidroxibenzóico y p-cumárico a concentraciones de hasta 0,1 mg/mL pueden inhibir el crecimiento de *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella pneumoniae* y *Bacillus cereus* (Aziz *et al.*, 1998; Baranowski y Nagel, 1982).

Se ha observado también que la catequina, el ácido gálico y la quercitina resultan efectivos contra *Listeria monocytogenes* en concentraciones mayores a 25 mg/mL y que esta última además constituye un potente agente antimicrobiano contra cepas de *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *E. coli*, *Micrococcus luteus*, *P. aeruginosa*, *S. cerevisiae*, *S. aureus* y *Staphylococcus epidermidis* (Rodríguez Vaquero *et al.*, 2005; Rauha *et al.*, 2000). De manera similar se ha visto que

administrar por vía oral 143 mg/Kg de quercitina en el alimento de conejillos de indias, los puede proteger contra shigelosis provocadas (Vijaya y Anathan, 1996). Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado actividad antimicrobiana alguna para el caso del triptofol.

Recientemente se ha visto también que el ácido sinápico es un efectivo agente antimicrobiano frente a cepas de *Salmonella* y otros patógenos, que es capaz de mejorar la retención de nutrientes y que tiene el poder de modular la actividad gastrointestinal de pollos (Johnson *et al.*, 2008). En cuanto al ácido ferúlico, se ha visto que resulta efectivo contra cepas de *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. cerevisiae*, *Candida albicans* y *Aspergillus Níger* (Panizzib *et al.*, 2002). También la epicatequina ha mostrado efectividad tanto frente a bacterias Gram positivas, como a Gram negativas y hongos (Park *et al.*, 2004). De manera similar, se ha visto que el metil galato es capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos Gram positivos, Gram negativos y levaduras (Da Silva *et al.*, 2008; Saxena *et al.*, 1994).

Como se ha mencionado con antelación, las uvas son una fuente rica en compuestos fenólicos (Priego Capote *et al.*, 2007), por lo que el empleo en alimentación animal de los residuos sólidos (semillas y pieles) provenientes de la industria vínica podría constituir una estrategia eficaz y de bajo coste para la disminución de *Campylobacter* spp. a nivel de hospedador.

Un aspecto interesante de los compuestos fenólicos es su efecto sobre algunas bacterias lácticas, ya que se ha visto que algunos de ellos, como es el caso de los ácidos ferúlico y p-cumárico, pueden ser metabolizados por *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus* sp. (Cavin *et al.*, 1993), por lo que su inclusión en la dieta de pollos podría llegar a ser útil para las bacterias beneficiosas, a la vez de resultar efectivo eliminando a las bacterias patógenas.

Tomando en cuenta que la eficacia de los compuestos fenólicos presentes en la uva puede verse incrementada por el efecto de las condiciones propias del vino (Waite y Daeschel, 2007), se podría esperar que las concentraciones mínimas reportadas en este trabajo como inhibitorias para *C. jejuni* LP1 fueran aún menores en el vino. Debido a lo anterior, el empleo de vino en la maceración de carnes podría constituir una estrategia eficaz para la disminución de la carga microbiana del alimento. Resulta interesante mencionar que se ha visto que los efectos antimicrobianos de los compuestos fenólicos permanecen estables durante su almacenamiento por largos períodos de tiempo en congelación, lo que podría facilitar su aplicación a nivel industrial (Nohynek *et al.*, 2006).

### 6.3.5. Estudio de la integridad de la membrana celular de *Campylobacter* después de su exposición a compuestos fenólicos del vino

Los mecanismos microbicidas de los compuestos fenólicos han sido atribuidos a diversas causas, como la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos (Plaper 2003; Hilliard 1995), la inhabilitación del metabolismo energético (Haraguchi *et al.*, 1998; Salvatore *et al.*, 1998) o alteraciones en las funciones de la membrana celular (Cushnie y Lamb, 2005; Tsuchiya y Linuma, 2000; Mirzoeva *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1997; Ikigai *et al.*, 1993).

Sin embargo, ya que se desconoce el mecanismo de acción de estos compuestos frente a *Campylobacter*, se estudió el efecto de los compuestos fenólicos del vino sobre la integridad de la membrana celular de *C. jejuni* LP1 y *C. jejuni* NCTC 11351 (Figura 6.3.) empleando ioduro de propidio (IP) como marcador de fluorescencia.

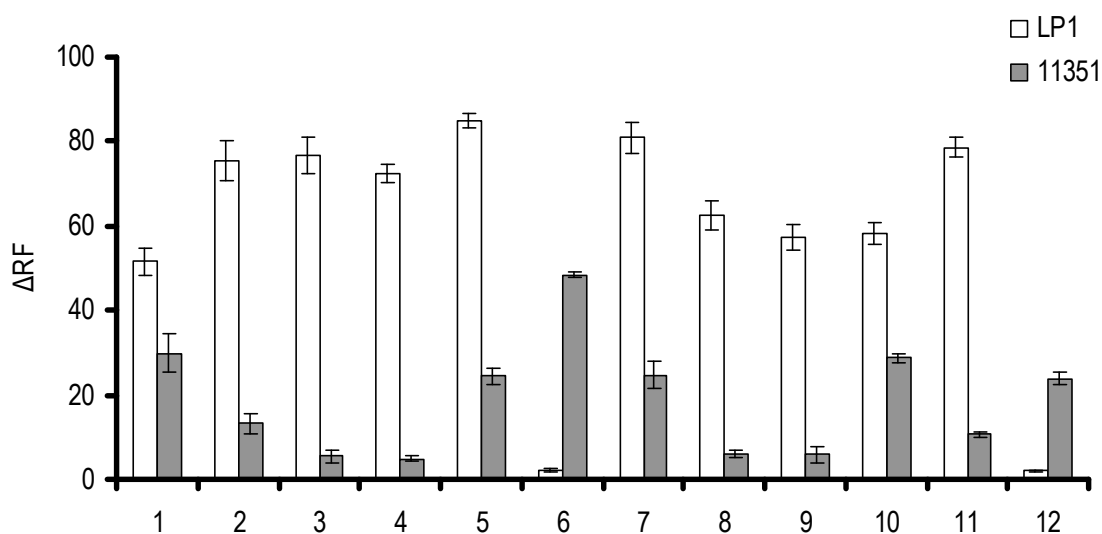
Los resultados obtenidos indican que los compuestos fenólicos estudiados son capaces de desestabilizar la membrana celular de *C. jejuni*, ya que se observó que los niveles de fluorescencia intracelular de las bacterias sometidas a la acción de los compuestos antimicrobianos más efectivos, son mayores que los del control.

En el gráfico se observa que la catequina prácticamente no afecta la estabilidad de la membrana celular de la cepa clínica (*C. jejuni* LP1) y sin embargo sí lo hace con la de la cepa de laboratorio (*C. jejuni* NCTC 11351). El compuesto que más afectó a la estabilidad de la membrana de esta última cepa fue la quercitina, tal como se observó en los resultados de viabilidad. De igual manera, los compuestos capaces de disminuir la viabilidad de *C. jejuni* LP1, incluso a concentraciones de 1 y 10 mg/mL (metil galato, epicatequina y ácidos sinápico, hidroxibenzóico, gálico, vanílico y caféico), son los que más afectan la estabilidad de la membrana celular. Sin embargo, la quercitina y la catequina no parecen afectar de manera significativa a la membrana de esta cepa.

En general se observa que el efecto de los compuestos estudiados sobre la membrana celular es mayor en el caso de la cepa *C. jejuni* LP1, ya que las diferencias en la fluorescencia relativa con

respecto al control ( $\Delta FR$ ) presentan valores más altos para dicha cepa que en el caso de *C. jejuni* NCTC 11351. Esto coincide con los resultados discutidos en el apartado anterior en los que se observó que, en general, la cepa de colección es más resistente a los compuestos estudiados.

De manera similar, se ha visto que algunos compuestos fenólicos aislados de frutos del bosque y de aceites esenciales de hierbas son efectivos contra *C. jejuni*, *H. pylori*, *Candida albicans* y *B. cereus*, y son capaces de afectar la membrana celular de *Salmonella* spp., aunque el mecanismo por el cual esto ocurre todavía no ha sido esclarecido (Nohynek *et al.*, 2006; Burt, 2004; Helander *et al.*, 1998).



**Figura 6.3.** Permeabilidad al IP de las cepas *C. jejuni* LP1 (LP1) y *C. jejuni* NCTC 11351 (11351) expuestas a diferentes compuestos fenólicos puros presentes en el vino (1000 mg/mL). Resultados expresados como la media del incremento de la fluorescencia (FR) relativo al control ( $\Delta FR$ )  $\pm$  la desviación estándar para N=3, n=3.. (1) Ácido ferúlico, (2) Metil galato, (3) Epicatequina, (4) Ácido sinápico, (5) Ácido hidroxibenzóico, (6) Quercitina, (7) Ácido gálico, (8) Ácido vinílico, (9) Triptofol, (10) Ácido p-cumárico, (11) Ácido caféico, (12) Catequina.



De los resultados obtenidos en este trabajo, se puede decir que los orujos provenientes de las industrias vínicas, ricos en compuestos fenólicos, podrían ser empleados como complementos en la alimentación del pollo, principal reservorio de *Campylobacter*, con miras a la disminución de este patógeno en la cadena alimentaria humana. De igual manera, el vino, podría disminuir el riesgo de infección por campilobacteriosis en humanos, ya sea por ingesta directa o por medio de la maceración de carnes de pollo contaminadas.

#### 6.4. CONCLUSIONES

- 1) El vino, en especial el tinto y rosado, constituye un ambiente adverso para la supervivencia de *C. jejuni* LP1. La concentración mínima microbicida del vino rosado y tinto fue de 10%, mientras que la del blanco fue de 25%.
- 2) El etanol afecta de manera significativa la viabilidad de *C. jejuni* LP1 hasta en concentraciones equivalentes a la que se encuentra en los vinos diluidos al 25%.
- 3) No se observaron diferencias significativas entre la viabilidad de *C. jejuni* LP1 a pH fisiológico y al pH del vino, lo que parece indicar que, bajo las condiciones empleadas, este parámetro no afecta su viabilidad.
- 4) Los compuestos fenólicos estudiados presentes en el vino y la uva afectan la viabilidad de *C. jejuni* LP1 de manera proporcional a la concentración utilizada y su efecto depende de la cepa bacteriana estudiada.
- 5) Los compuestos fenólicos estudiados son capaces de desestabilizar la membrana celular de *C. jejuni* de forma proporcional al efecto antimicrobiano observado.

## 6.5. BIBLIOGRAFÍA

- Altekruse, S.F., Stern, N.J., Fields, P.I., Swerdlow, D.L. 1999. *Campylobacter jejuni*-an emerging foodborne pathogen. *Emergent Infectious Diseases* 5: 28-35.
- Aziz, N.H., Farak, S.E., Mousa, L.A., Abo-Zaid, M.A. 1998. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios* 93: 43-54.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99: 191-203.
- Baranowski, J.D., Nagel, C.W. 1982. Inhibition of *Pseudomonas fluorescens* by hydroxycinnamic acids and their alkyl esters. *Journal of Food Science* 47: 1587-1589.
- Baumgartel, T., Kluth, H., Epperlein, K., Rodehutschord, M. 2005. A note on digestibility and energy value for sheep of different grape pomace. *Small ruminant research. Food Research International* 67: 302-306.
- Bellido Blasco, J.B., González Morán, F., Arrendó Pena, A., Galiano Arlandis, J.V., Safont Adsuara, L., Herrero Carot, C., Criado Juárez, J., Mesanza del Notario, I. 1996. Brote de infección alimentaria por *Salmonella enteritidis*. Posible efecto protector de las bebidas alcohólicas. *Medicina Clínica* 107: 641-644.
- Blaser, M.J., Newman, L.S. 1982. A review of human salmonellosis: Infective dose. *Reviews in Infectious Diseases* 4: 1096-1106.
- Brenner, H., Rothenbacher, D., Bode, G., Adler, G. 1999. Inverse graded relation between alcohol consumption and active infection with *Helicobacter pylori*. *American Journal of Epidemiology* 149: 571-576.
- Bujanda, I. 2000. The effects of alcohol consumption upon the gastrointestinal tract. *American Journal of Gastroenterology* 95: 3374-3382.
- Bustamante, M.A., Moral, R., Paredes, C., Pérez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J., Pérez-Murcia, M.D. 2008. Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Management* 28: 372-380.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223-253.
- Cavin, J.F., Andioc, V., Etienvant, P.X., Divies, C. 1993. Ability of wine lactic-acid bacteria to metabolize phenol carboxylic-acids. *American Journal of Enology and Viniculture* 44: 76-80.
- Corona, A., Pupillo, M., Trotta, A., Quanglio, P. 2001. Antimicrobial effect of alcoholic solutions on food-borne pathogens. *Industria delle Bevande* 30: 1-5.
- Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J. 2005. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *Journal of Ethnopharmacology* 101: 243-248.
- Da Silva, S.L., Chaar, J., Damico, D.C.S., Figueiredo, P., Yano, T. 2008. Antimicrobial activity of ethanol extract from leaves of *Casearia sylvestris*. *Pharmaceutical Biology* 46: 347-351.
- Daroch, F., Hoeneisen, M., Gonzalez, C.L., Kawaguchi, F., Salgado, F., Solar, H., García, A. 2001. *In vitro* antibacterial activity of Chilean red wines against *Helicobacter pylori*. *Microbios* 104: 79-85.

Desenclos, J.C.A., Klontz, K.C., Wilder, M.H., Gunn, R.A. 1992. The protective effect of alcohol on the occurrence of epidemic oyster-borne hepatitis A. *Epidemiology and Infection* 3: 371-374.

FAOSTAT. 2006. Food and Agricultural Organization Database [en línea]. Referencia de 12 de diciembre de 2008. Disponible en: <http://www.fao.org>.

FAS. 2006. Attaché Annual Reports, USDA. USDA/FAS2. Foreign Agricultural Service, Horticultural and Tropical Products Division.

Gordon, R. W., Roland, D.A. 1997. The influence of environmental temperature on *in vivo* limestone solubilization, feed passage rate, and gastrointestinal pH in laying hens. *Poultry Science* 76: 683-688.

Fernández, J., Gomes, F., Couto, J.A., Hogg, T. 2007. The antimicrobial effect of wine on *Listeria innocua* in a model stomach system. *Food Control* 18: 1477-1483.

Gordon, R.W., Roland, D.A. 1997. The influence of environmental temperature on *in vivo* limestone solubilization, feed passage rate, and gastrointestinal pH in laying hens. *Poultry Science* 76: 683-688.

Haraguchi, H., Tanimoto, K., Tamura, Y., Mizutani, K., Kinoshita, T. 1998. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry* 48: 125-129.

Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 3590-3595.

Hilliard, J.J., Krause, H.M., Bernstein, I.J. Fernandez, J.A., Nguyen, V., Ohemeng, K.A., Barrett, J.F. 1995. A comparison of active site binding of 4-quinolones and novel flavone gyrase inhibitors to DNA gyrase. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 390: 59-69.

Holmes, K., Mulholland, F., Pearson, B.M., Pin, C., McNicholl-Kennedy, J., Ketley, J.M., Wells, J.M. 2005. *Campylobacter jejuni* gene expression in response to iron limitation and the role of Fur. *Microbiology* 151: 243-257.

.

Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y., Shimamura, T. 1993. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1147: 132-136.

Ingram, L.O., Buttke, T.M., Edmunds, L.N.J.R. 1984. Effects of alcohols on micro-organisms. *Advances in Microbiological Physiology* 25: 253-300.

Johansen, C.H., Bjerrum, L., Finster, K., Pedersen, K. 2006. Effects of a *Campylobacter jejuni* infection on the development of the intestinal microflora of broiler chickens. *Poultry Science* 85: 579-587.

Johnson, M.L., Dahiya, J.P., Olkowski, A.A., Classen, H.L. 2008. The effect of dietary sinapic acid (4-hydroxy-3, 5-dimethoxy-cinnamic acid) on gastrointestinal tract microbial fermentation, nutrient utilization, and egg quality in laying hens. *Poultry Science* 87: 958-963.

Just, J.R., Daeshchel, M.A. 2003. Antimicrobial effects of wine on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in a model stomach system. *Journal of Food Science* 68: 285-290.

KEPOS. 2000. Impactos ambientales en la bodega. Fundación Caja Rioja. Logroño.

- Mahady, G.B., Pendland, S.L., Chadwick, L.R. 2003. Resveratrol and red wine extracts inhibit the growth of CagA+ strains of *Helicobacter pylori* in vitro. *American Journal of Gastroenterology* 98: 1440-1441.
- Marimon, J.M., Bujanda, L., Gutiérrez-Stampa, M.A., Cosme, A., Arenas, J.I. 1998. *In vitro* bactericidal effect of wine against *Helicobacter pylori*. *American Journal of Gastroenterology* 93: 1392.
- Mirzoeva, O.K., Grishanin, R.N., Calder, P.C. 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiology Research* 152: 239-246.
- Moretro, T., Daeschel, M.A. 2004. Wine is bactericidal to foodborne pathogens. *Journal of Food Science* 69: M251-M257.
- Murray, L.J., Lane, A.J., Harvey, I.M., Donovan, J.L., Nair, P., Harvey, R.F. 2002. Inverse relationship between alcohol consumption and active *Helicobacter pylori* infection: the Bristol *Helicobacter* project. *The American Journal of Gastroenterology* 97: 2750-2755.
- Nohynek, L.J., Alakomi, H.L., Kahkonen, M.P. Heinonen, M., Helander, I.M., Oksman-Caldentey, K.M., Puupponen-Pimia, R.H. 2006. Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and Cancer* 54: 18-32.
- Palyada, K., Threadgill, D., Stintzi, A. 2004. Iron acquisition and regulation in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology* 186: 4714-4729.
- Panizzib, L., Caponi, C., Catalano, S., Cionia, P.L., Morellia, I. 2002. *In vitro* antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *Journal of Ethnopharmacology* 79: 165-168.
- Park, K.D., Park, Y.S., Cho, S.J., Sun, W.S., Kim, S.H., Jung, D.H., Kim, J.H. 2004. Antimicrobial activity of 3-O-acyl(-)-epicatechin and 3-O-acyl(+)-catechin derivatives. *Planta Medica* 70: 272-276.
- Pfeiffer, A., Holgl, B., Kaess, H. 1992. Effect of ethanol and commonly ingested alcoholic beverages on gastric emptying and gastrointestinal transit. *Clinical Investigation* 70: 487-491.
- Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Solmajer T., Jerala, R. 2003. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochemical Biophysical Research Communications* 306: 530-536.
- Priego Capote, F., Luque Rodríguez, J.M., Luque de Castro, M.D. 2007. Determination of phenolic compounds in grape skin by capillary electrophoresis with simultaneous dual fluorescence and diode array absorption detection after dynamic superheated liquid leaching. *Journal of Chromatography* 19: 301-307.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Hartmann-Schimidlin, S., Kähkönen, M., Heinonen, M., Määttä-Riihinen, K. 2005. Berry phenolics selectively inhibit the growth on intestinal pathogens. *Journal of Applied Microbiology* 98: 991-1000.
- Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P. 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology* 56: 3-12.
- Reid, A.N., Pandey, R., Palyada, K., Naikare, H., Stintzi, A. 2008. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in the response to acidic pH and stomach transit. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 1583-1598.
- Rodríguez-Delgado, M.A., González-Hernández, G., Conde González, J.E., Pérez-Trujillo, J.P. 2002. Principal component analysis of the polyphenol content in young red wines. *Food Chemistry* 78: 523-532.

- Rodríguez Montealegre, R., Romero Peces, R., Chacón Vozmediano, J.L., Martínez-Gascueña, J., García Romero, E. 2006. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Food Analysis* 19: 687-693.
- Rodríguez-Vaquero, M.J., Alberto, M.R, Manca de Nadra, M.C. 2007a. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* 18: 93-101.
- Rodríguez-Vaquero, M. J., Alberto, M.R, Manca de Nadra, M.C. 2007b. Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 18: 587-593.
- Rodríguez Vaquero, M.J., Alberto, M.R., Manca de Nadra, M.C. 2005. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* 18: 93-101.
- Salagoite-Auguste, M.-H., Bertrand, A. 1984. Wine phenolics. Análisis of low molecular weight components by high performance liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 35: 1241-1247.
- Salvatore, M., King, A.B., Graham, A.C., Onishi, R., Bartizal, K.F., Abruzzo, G.K., Gill, C.J., Ramjit, H.G., Pitzenberger, S.M., Witherup, K.M. 1998. Antibacterial activity of lonchocarpol A. *Journal of Natural Products* 61: 640-642.
- Salagoite-Auguste, M.H., Bertrand, A. 1984. Wine phenolics. Análisis of low molecular weight components by high performance liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 35: 1241-1247.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F. 1999. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic compounds. *Food Research International*. 32: 407-412.
- Sato, M., Tsuchiya, H., Akagiri, M., Takagi, N., Linuma, M. 1997. Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anti-candidal chalcones. *Australian Dental Journal* 42: 343-346.
- Saxena, G., McCutcheon, A.R., Farmer, S., Towers, G.H., Hancock, R.E. 1994. Antimicrobial constituents of *Rhus glabra*. *Journal of Ethnopharmacology* 42: 95-99.
- Schiever, C., Pendland, S.L., Mahady, G.B. 2003. Red wine, resveratrol, *Chlamydia pneumoniae* and the French connection. *Atherosclerosis* 171: 379-380.
- Seóñez, M., Bellas, E., Ladaira, P., Seoáñez, P. 2000. Tratado de reciclado y recuperación de productos de los residuos. Mundi-Prensa. Madrid.
- Sheth, N.K., Wisniewski, T.R., Franson, T.R. 1988. Survival of enteric pathogens in common beverages: An *in vitro* study. *American Journal of Gastroenterology* 83: 658-660.
- Soares, S.E. 2002. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista do Nutrição Campinas* 15: 71-81.
- Sugita-Konishi, Y., Hara-Kudo, Y., Iwamoto, T., Kondo, K. 2001. Wine has activity against entero-pathogenic bacteria *in vitro* but not *in vivo*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 65: 954-957.
- Tsuchiya, H., Linuma, M. 2000. Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine* 7: 161-165.
- Vijaya, K., Anathan, S. 1996. Therapeutic efficacy of medicinal plants against experimentally induced shigellosis in guinea pigs. *Indian Journal of Pharmaceutical Science* 58: 191-193.

Vogt, E., Jacob, L., Lemperle, E., Weiss, E. 1986. El vino: obtención, elaboración y análisis. Acribia S.A. Zaragoza.

Waite, J.G., Daeschel, M.A. 2007. Contribution of wine components to inactivation of food-borne pathogens. *Journal of Food Science* 72: M286-M291.

Weisse, M.E., Eberly, B. Person, D.A. 1995. Wine as a digestive aid: comparative antimicrobial effects of bismuth salicylate and red and white wine. *British Medical Journal* 311: 1657-1660.

Wells, C.L., Jechorek, R.P., Kinneberg, K.M., Debol, S.M., Erlandsen, S.L. 1999. The isoflavone genistein inhibits internalization of enteric bacteria by cultured Caco-2 and HT-29 enterocytes *The Journal of Nutrition* 129: 634-640.

Wen, A., Delaquis, P., Stanich, K., Toivonen, P. 2003. Antilisterial activity of selected phenolic acids *Food Microbiology* 20: 305-311

El epitelio intestinal se encuentra recubierto por una capa de mucus a la cual *Campylobacter* debe adherirse para poder colonizar los enterocitos subyacentes. Si se logra inhibir la adhesión de este patógeno a la capa de mucus, se podría impedir su colonización. La adición de bacterias probióticas en las dietas de pollos ha sido exitosa para inhibir la colonización del mucus por parte de otros patógenos. Se estudió el efecto protector de cepas definidas de bacterias probióticas de uso humano sobre la adherencia de *Campylobacter* spp. a mucus intestinal de pollo y se comparó con un producto probiótico comercial de composición microbiana indefinida. Entre las cepas estudiadas, *L. rhamnosus* LGG, *P. freudenreichii* JS y *L. lactis* LAC presentaron una mayor adherencia al mucus de pollo y resultaron útiles para disminuir la adherencia del patógeno, en una medida comparable con la obtenida al emplear la mezcla probiótica comercial que ha resultado efectiva en estudios *in vivo*. Por otra parte, se comparó la tasa de adherencia de *Campylobacter* spp. a mucus intestinal de pollo, pavo y humano, obtenido de yeyuno, colon y ciego, y se determinó que ésta es dependiente de la especie y región intestinal de procedencia del mucus, así como de la especie y cepa bacteriana. La adherencia a mucus de colon humano resultó mayor que en aves. Algunos probióticos de uso humano, como LGG, JS y LAC, podrían ser empleados en la alimentación de pollos con el fin de disminuir la colonización de *Campylobacter* spp.



## Capítulo

# 7

### Influencia del mucus intestinal sobre la adherencia de *Campylobacter* y papel de las bacterias probióticas en el control de este patógeno

*El trabajo de investigación descrito en este capítulo se llevó a cabo como parte de una colaboración entre el Forum de Alimentos Funcionales de la Universidad de Turku (Turku, Finlandia) y el Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), y se realizó bajo la supervisión de la Dra. Reeta Satokari y la Dra. Satu Vesterlund.*

## 7.1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Como se ha mencionado con antelación en este trabajo, la habilidad de *Campylobacter* spp. para colonizar el tracto gastrointestinal, tanto en humanos como en aves, requiere de la adherencia del patógeno a las células epiteliales intestinales (Van Deun *et al.*, 2008). El epitelio intestinal se encuentra recubierto por una capa protectora de mucus (Ma *et al.*, 2006) a la cual *Campylobacter* debe adherirse para poder colonizar los enterocitos (Sylvester *et al.*, 1996). Por ello, se puede admitir que si se logra inhibir la adhesión de la bacteria a la capa de mucus, se podría impedir el desarrollo de su proceso de colonización.

Por otra parte, se sabe que a pesar de que *Campylobacter* constituye un importante patógeno en humanos, por motivos aún desconocidos, la mayoría de las veces se comporta como comensal en aves (Young *et al.*, 2007; Lee y Newel., 2006; Sahin *et al.*, 2001; Falk *et al.*, 1998; Cawthraw *et al.*, 1994), lo que podría estar relacionado con las diferencias existentes entre la composición del mucus humano y el de las aves (Byrne *et al.*, 2007).

Nurmi y Rantala introdujeron en 1973 el concepto de exclusión competitiva (EC) como una medida para reducir la colonización de *Salmonella* en aves, por medio de la adición de mezclas indefinidas de bacterias procedentes de contenidos intestinales de pollos adultos sanos en las dietas de pollos jóvenes (Nurmi y Rantala, 1973). En la actualidad se pueden conseguir diferentes productos comerciales basados en este principio, algunos de los cuales son utilizados de manera rutinaria como suplementos alimenticios en algunas granjas productoras de pollos. De manera similar, también existen productos destinados a humanos con bacterias probióticas en su composición, a los cuales se han atribuido efectos beneficiosos sobre la salud intestinal del consumidor (Salminen *et al.*, 2005).

A pesar de haber ofrecido resultados satisfactorios contra *Salmonella* (Gerard y Brezillon, 2008; Vicente *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2006; Garriga *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 1996; Behling y Wong, 1994; Stern, 1994; Blankenship *et al.*, 1993; Stavric, 1992; Stern, 1992), se han observado diferentes grados de efectividad *in vivo* contra *Campylobacter* spp. al emplear mezclas bacterianas indefinidas, es decir, de composición desconocida, obtenidas a partir de intestinos de pollo en la alimentación de estos animales (Willis y Reid, 2008; Mulder and Bolder, 1991; Shanker *et al.*, 1990; Shanker *et al.*, 1988; Stern *et al.*, 1988; Soerjadi-Liem *et al.*, 1984; Soerjadi *et al.*, 1982). Además de las diferencias observadas en cuanto al grado de efectividad, existen dos preocupaciones fundamentales relacionadas con el empleo de mezclas bacterianas indefinidas. En primer lugar, la posible introducción de patógenos de aves o humanos dentro de la cadena alimentaria, y en segundo lugar, el hecho de que estas prácticas no son

aceptadas por las agencias reguladoras de algunos países (Stavric, 1992). Estos problemas podrían solventarse empleando cepas bacterianas identificadas o definidas, sin embargo, no existe todavía ninguna preparación de probióticos de composición definida que resulte efectiva para prevenir la colonización de *Campylobacter* (Misotten *et al.*, 2007; Stern *et al.*, 2001; Audisio *et al.*, 2000).

El objetivo principal de este capítulo fue estudiar *in vitro* el efecto protector de algunas cepas probióticas de uso humano sobre la adherencia de *Campylobacter* spp. a mucus intestinal de pollo y compararlas con un producto comercial de composición indefinida, en la búsqueda de alternativas sostenibles para el control de *Campylobacter* spp. Además de esto, se determinaron las diferencias existentes entre el porcentaje de adherencia a mucus de diferentes orígenes, con el fin de valorar si se correlaciona con la tasa de colonización e infectividad de tejidos *in vivo*. Para ello se plantearon los siguientes objetivos parciales:

Seleccionar entre 10 cepas de bacterias probióticas de uso humano, las más adherentes a mucus intestinal de pollo.

Comparar la tasa de adherencia de *Campylobacter* spp. a mucus obtenido a partir de diferentes secciones intestinales de pollo, pavo y humano, y la de otras bacterias patógenas alimentarias de interés.

Investigar *in vitro* el efecto protector contra *Campylobacter* spp. de los probióticos seleccionados y compararlo con el de una mezcla comercial específica para pollo.

## 7.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.2.1. Obtención e inmovilización de soluciones de mucus

El mucus intestinal de aves se obtuvo a partir de intestinos de pollo y pavo sanos, y se procesó como se ha descrito con anterioridad (Ouweland y Salminen, 2003). Brevemente, el material intestinal se mantuvo en hielo y se procesó durante los 20 min posteriores a su obtención. Se procedió a su lavado empleando abundante PBS con 0,01% de gelatina. El mucus se extrajo a partir de tres secciones intestinales diferentes: yeyuno (Ye), colon (Co) y ciego (Ci), y se colectó en una pequeña cantidad de tampón Hepes (N-2-hidroxi etil piperazina-N-2-ácido etanol sulfónico) - Hanks (HH; 10 mM HEPES, pH 7.4), mediante el raspado de los tejidos intestinales con una espátula de plástico. El mucus obtenido se centrifugó (13000g, 10 min) para su higienización. El mucus humano utilizado es parte de la colección del instituto Functional Foods Forum de la Universidad de Turku (Turku, Finlandia).

Para la determinación de la concentración proteica de las soluciones de mucus, se empleó el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Las muestras se almacenaron a -20° C hasta el momento de su uso. Antes de cada ensayo de adherencia, el mucus se diluyó (0,5 mg proteína/mL) en tampón Hepes-Hanks.

Para la inmovilización del mucus, se añadieron 100 µL de la solución anterior por pozo en placas multipozos (Maxisorp, Roskilde, Dinamarca) y se incubó durante 24 h a 4° C.

### 7.2.2. Células bacterianas

#### 7.2.2.1. Medios, reactivos, cepas y condiciones de cultivo

Se utilizaron cinco cepas de *Campylobacte*, mencionadas en 2.2.2.2. Para su cultivo, se empleó BB como medio de líquido y MHS como medio sólido.

Los cultivos bacterianos se obtuvieron de la siguiente manera: las cepas congeladas se sembraron en MHS y se incubaron durante 72 h a 37° C en jarras Gaspak, empleando un sistema de generación de atmósfera microaerófila (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Se inocularon colonias aisladas en BB y se incubaron durante 18 h bajo las condiciones mencionadas.

Las cepas *E. coli* H-10407 y *S. typhimurium* 14028, cedidas por la Dra. Satu Vesterlund (Functional Foods Forum, University of Turku), se cultivaron en caldo LB (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) y se incubaron en condiciones aerobias durante 18 h a 37°C.

Las cepas de probióticos utilizadas pertenecen a la colección del Functional Foods Forum: *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 (LGG), *Lactobacillus paracasei* 219 (219), *Propionibacterium freudenreichii* ssp *Shermanii* (JS), *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (Plant), *Lactococcus lactis* ssp *Lactis* (LAC), *Lactobacillus reuteri* INGI (REU), *Lactobacillus paracasei* (Shi), *Lactobacillus acidophilus* La14 (La14), *Lactobacillus rhamnosus* LC-705 (705), *Lactobacillus plantarum* 115 (Lp115). Estas cepas se cultivaron en caldo MRS (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y se incubaron durante 18 h a 37° C bajo condiciones anaerobias (10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 80% N<sub>2</sub>; Concept 400 anaerobic chamber, Ruskinn Technology, Leeds, Reino Unido). La mezcla probiótica comercial Broilact® se obtuvo de Orion Corporation (Turku, Finlandia).

Los microorganismos se marcaron metabólicamente mediante la adición de 5 µL/mL de timidina tritiada (5-<sup>3</sup>H-thymidine 1,0 mCi/mL; Amersham Biosciences, Reino Unido) al medio de cultivo. Antes de los ensayos de adhesión, las soluciones bacterianas se lavaron dos veces con tampón Hepes-Hanks (pH 7,4). Se ajustó la concentración bacteriana hasta A<sub>600</sub> = 0,25 ± 0,01, empleando un lector óptico modelo Novospec II (Pharmacia LKB, Cambridge, Reino Unido).

### **7.2.3. Ensayos de adherencia a mucus intestinal**

Los ensayos de adherencia se llevaron a cabo según se ha descrito previamente (Collado *et al.*, 2005). Para ello, se añadieron 100 µL de la solución bacteriana marcada metabólicamente en cada pozo conteniendo mucus inmovilizado y se incubó durante 1 h a 37° C. Se lavó 3 veces empleando 250 µL de tampón Hepes-Hanks y se añadieron 200 µL de 1% SDS-0,1 M NaOH en cada pozo. Se incubó durante 1 h a 60° C. Se transvasaron 100 µL de la solución de cada pozo a tubos con 1 mL de líquido de centelleo (Perkin Elmer, Boston, EE.UU.). Como control del inóculo bacteriano se añadieron 100 µL de la solución bacteriana inicial marcada metabólicamente en tubos con 1 mL de líquido de centelleo. Para determinar la emisión de la timidina, se empleó un contador de centelleo (Wallac Trilux, 1450 Microbeta, Minesota, EE.UU.).

La adherencia al mucus intestinal se expresó como el porcentaje de radiactividad de la suspensión bacteriana original marcada metabólicamente en relación con la fracción recuperada después de la incubación del microorganismo con el mucus.

#### **7.2.3.1. Ensayos de exclusión competitiva**

Con el fin de determinar la habilidad de las cepas probióticas para inhibir la adhesión de patógenos, se siguió el procedimiento descrito por Collado *et al.* (2005). En resumen, se añadieron 100

$\mu\text{L}$  de la solución de bacterias probióticas no marcadas metabólicamente ( $10^8$  ufc/mL) al mucus inmovilizado, se incubó durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$  y se lavó tres veces con tampón Hepes-Hanks. Los patógenos marcados metabólicamente ( $10^8$  ufc/mL) se añadieron ( $100\ \mu\text{L}$ ) al mucus y se incubó durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$ . Las bacterias no adheridas se eliminaron mediante lavados con tampón Hepes-Hanks y las adheridas se recuperaron mediante lisis con  $200\ \mu\text{L}$  de 1% SDS-0,1 M NaOH e incubación durante 1 h a  $60^\circ\text{C}$ . La radiactividad se determinó por centelleo, tal como se indica en 7.2.3. La adherencia se expresó como el porcentaje de radiactividad medida en presencia del probiótico, relativa a la obtenida en su ausencia.

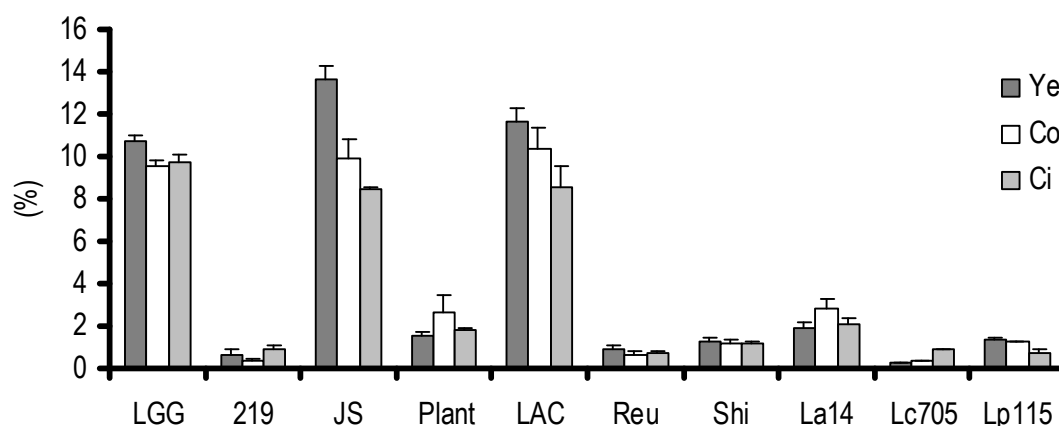
#### **7.2.4. Análisis estadístico**

Los datos experimentales se analizaron utilizando el programa Minitab versión 14.1 (Minitab 14, State College, PA). Para el análisis de datos se empleó la prueba t de Student. Las diferencias entre muestras se consideraron significativas cuando  $p \leq 0,05$ . En las Tablas y Figuras, N se refiere al número de experimentos realizados y n al número de muestras analizadas.

## 7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.3.1. Adherencia de bacterias probióticas a mucus intestinal

Debido a que la adherencia suele ser un prerrequisito para la colonización de las bacterias probióticas (Havenaar *et al.*, 1992), se comparó la tasa de adhesión de 10 probióticos comerciales humanos diferentes a mucus intestinal de diferentes secciones del intestino (yeyuno, colon y ciego) de pollo (Figura 7.1.), con el fin de seleccionar las cepas que presentaban una mayor adherencia.



**Figura 7.1.** Adherencia de probióticos a mucus intestinal de pollo proveniente de yeyuno (Ye), colon (Co) y ciego (Ci). *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 (LGG), *Lactobacillus paracasei* 219 (219), *Propionibacterium freudenreichii* ssp *Shermanii* (JS), *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (Plant), *Lactococcus lactis* ssp *Lactis* (LAC), *Lactobacillus reuteri* INGI (REU), *Lactobacillus paracasei* (Shi), *Lactobacillus acidophilus* La14 (La14), *Lactobacillus rhamnosus* LC-705 (705), *Lactobacillus plantarum* 115 (Lp115). Resultados expresados como % de adherencia con respecto al inóculo bacteriano  $\pm$  la desviación estándar para N=3, n=4.

A pesar de tratarse de probióticos humanos, todas las cepas estudiadas fueron capaces de adherirse al mucus intestinal de pollo. Las cepas *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, *Propionibacterium freudenreichii* ssp *Shermanii* y *Lactococcus lactis* ssp *Lactis* presentaron la mayor capacidad de adherencia al mucus de pollo, teniendo un porcentaje mayor que las otras bacterias probióticas estudiadas, por lo cual se seleccionaron para los estudios posteriores. La alta tasa de adherencia al mucus presentada por estas cepas podría resultar positiva ya que puede ocasionar un aumento en el tiempo del tránsito intestinal, lo que constituiría una ventaja ecológica ante otras bacterias (Sarra *et al.*, 1992).

El uso de bacterias probióticas en humanos ha sido el objetivo de numerosos estudios, explotándose también desde el punto de vista comercial (Rastall *et al.*, 2005; Borriello *et al.*, 2003; Isolauri, 2001; Madsen *et al.*, 2001; Kirjavainen *et al.*, 1998; Saxelin, 1997). En algunos trabajos también se ha considerado la utilización de diferentes probióticos originalmente ideados para empleo en humanos, en la alimentación de animales (Collado *et al.*, 2007; Nikoskelainen *et al.*, 2001). El uso en animales de este tipo de probióticos conlleva una serie de beneficios, entre los cuales, probablemente el más interesante para la industria alimentaria consiste en que su inocuidad ha sido comprobada en humanos, por lo tanto, su posible inclusión en la cadena alimentaria no resultaría un problema desde el punto de vista sanitario.

Según varios autores, para que las bacterias probióticas sean capaces de producir efectos positivos en el hospedador deben ser capaces de colonizar, aunque sea de manera temporal, el tracto gastrointestinal del hospedador (Alander *et al.*, 1999). La adherencia a la mucosa intestinal puede favorecer dicha colonización. Se cree que la diferencia en la capacidad de adherencia de diferentes bacterias probióticas puede estar relacionada con su tiempo de retención dentro del organismo hospedador y con los efectos beneficiosos que son capaces de producir (Ouweland *et al.*, 1999).

En los resultados de este trabajo se observa que la mayor parte de las cepas estudiadas se adhirieron en mayor medida al mucus del intestino delgado del pollo que al colon y ciego. Con antelación, Kizerwetter-Swida y Binek (2006) observaron diferencias en la tasa de adhesividad de distintos aislados de *Lactobacillus* a mucus intestinal de pollo proveniente de duodeno, ileon, ciego y recto, y determinaron que el nivel de adherencia es dependiente de la cepa bacteriana y de la región intestinal estudiada.

### **7.3.2. Determinación de la adherencia de *Campylobacter* y otros patógenos alimentarios en mucus de diferentes secciones intestinales**

Se estudió la capacidad de adherencia a mucus intestinal de pollo y pavo, aislado de diferentes secciones intestinales, de distintas cepas de *Campylobacter*, así como de dos especies patógenas comúnmente aisladas en aves (*E. coli* y *Salmonella*) (Tabla 7.1.).

Los resultados muestran que todas las cepas fueron capaces de adherirse a los diferentes tipos de mucus, aunque se observa que el porcentaje de adhesión depende de la especie de la que se origina el mucus, de la región intestinal de la cual se aisló, y de la especie y cepa bacteriana empleada.



Resultados similares fueron obtenidos por Collado *et al.* (2007), quienes observaron que la capacidad de adherencia de patógenos intestinales a mucus de cerdo, depende tanto de la cepa microbiana estudiada, como de la región intestinal de procedencia del mucus.

**Tabla 7.1.** Adherencia de *C. jejuni* NCTC 11351, *C. jejuni* NCTC 11168, *C. jejuni* 118 y *C. jejuni* LP1, *C. coli* LP2, *E. coli* H-10407 y *S. typhimurium* 14028 a mucus intestinal de pollo y pavo proveniente de yeyuno (Ye), colon (Co) y ciego (Ci). Resultados expresados como el % de adherencia con respecto al inóculo bacteriano  $\pm$  la desviación estándar para N=3, n=4.

Bacteria	Región	Pollo	Pavo
<b>11135</b>	Ye	2,51 $\pm$ 0,35	2,83 $\pm$ 0,26
	Co	2,32 $\pm$ 0,10	1,48 $\pm$ 0,61
	Ci	3,23 $\pm$ 0,39	1,52 $\pm$ 0,41
<b>11168</b>	Ye	2,57 $\pm$ 0,08	2,20 $\pm$ 0,31
	Co	3,63 $\pm$ 0,44	4,17 $\pm$ 0,39
	Ci	4,00 $\pm$ 0,54	3,31 $\pm$ 0,20
<b>118</b>	Ye	1,12 $\pm$ 0,18	1,68 $\pm$ 0,15
	Co	3,75 $\pm$ 0,05	3,78 $\pm$ 0,16
	Ci	3,51 $\pm$ 0,25	3,51 $\pm$ 0,06
<b>LP1</b>	Ye	6,70 $\pm$ 1,05	0,34 $\pm$ 0,04
	Co	5,52 $\pm$ 0,22	3,34 $\pm$ 0,08
	Ci	5,72 $\pm$ 0,10	3,51 $\pm$ 0,12
<b>LP2</b>	Ye	2,69 $\pm$ 0,23	5,77 $\pm$ 0,30
	Co	2,04 $\pm$ 0,65	5,76 $\pm$ 0,27
	Ci	2,64 $\pm$ 0,86	5,93 $\pm$ 0,36
<b>10407</b>	Ye	0,98 $\pm$ 0,07	-
	Co	0,14 $\pm$ 0,02	-
	Ci	0,68 $\pm$ 0,12	-
<b>14028</b>	Ye	0,54 $\pm$ 0,05	-
	Co	0,50 $\pm$ 0,05	-
	Ci	0,68 $\pm$ 0,13	-

La cepa de mayor adherencia a mucus intestinal de pollo fue *C. jejuni* LP1, mientras que *C. coli* LP2 resultó ser la más adherente a mucus de pavo. Se observó que *E. coli* H-10407 parece tener más

afinidad por el mucus proveniente de yeyuno de pollo mientras que *S. typhimurium* 14028 se adhiere más eficientemente a mucus de ciego del ave. A pesar de tratarse de importantes patógenos gastrointestinales que, al igual que *Campylobacter*, son capaces de emplear al pollo como hospedador (Giovanardi *et al.*, 2005, Heres *et al.*, 2005), la adherencia de ambos patógenos a mucus de pollo fue menor que la observada para *Campylobacter*. Lo anterior confirma la especial habilidad de *Campylobacter* para colonizar el mucus que recubre la superficie de las células epiteliales y contribuiría en parte a explicar por qué esta bacteria es considerada el patógeno bacteriano transmitido por pollos que ocasiona mayor número de enfermedades en humanos al año (EFSA, 2007).

Ya que la adherencia de *Campylobacter* spp. a la mucina intestinal es esencial en los primeros estadios de la infección (Sylvester *et al.*, 1996) se podría pensar que las diferencias en la composición del mucus humano y el de aves podrían explicar por qué en general esta bacteria se comporta como patógeno en los primeros y como comensal en las últimas (Byrne *et al.*, 2007).

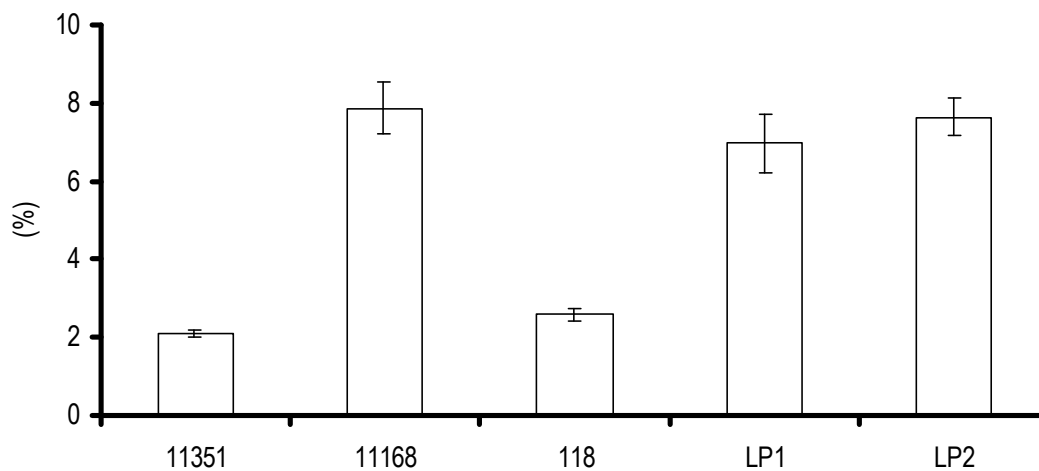
Debido a lo anterior, se estudió la capacidad de adherencia de *C. jejuni* 11351, 11168, 118 y LP1, *C.coli* LP2, a mucus intestinal proveniente de colon humano (Figura 7.2.). Se determinó que la adherencia a dicho mucus es mayor en los aislados clínicos LP2 ( $7,64 \pm 0,47$ ) y LP1 ( $6,97 \pm 0,75$ ), y en la cepa de colección 11168 ( $7,86 \pm 0,66$ ) que en las cepas restantes, denotando una mayor afinidad por el mucus humano por parte de las primeras. Las cepas LP2, LP1 y 11168 presentaron también una mayor adherencia a mucus colónico humano que a mucus colónico de pollo y pavo (Tabla 7.1.). Por el contrario, la adherencia de *C. jejuni* 11351 ( $2,10 \pm 0,07$ ) y de 118 ( $2,59 \pm 0,15$ ) resultó menor en mucus de colon humano que en el de pollo y pavo.

En estudios *in vitro* se determinó que la adherencia de *Campylobacter* spp. a células epiteliales intestinales humanas disminuye en presencia de mucus intestinal de pollo, sin embargo, dicho efecto no se observó al emplear mucus humano (Byrne *et al.*, 2007).

El mucus intestinal de pollo se diferencia considerablemente del humano, en especial respecto a la estructura de la mucina: índice de glicosilación, plegamiento, carga y moléculas asociadas (Smirnov *et al.*, 2004; Verma *et al.*, 1994).

Se sabe que el mucus es quimiotáctico para *Campylobacter* y que tiene un efecto directo sobre la motilidad y virulencia del patógeno (Szymanski *et al.*, 1995; Hughdahl *et al.*, 1988). La bacteria expresa adhesinas que reconocen epítomos específicos en la mucina, y se adhiere de una manera dependiente de la concentración (Sylvester *et al.*, 1996).

Se cree que la motilidad en espiral, como la que posee *Campylobacter* spp., facilita la penetración a través de la capa de mucus, y así proporciona un mayor anclaje para el microbio. Debido a esto, cuanto mayor sea la capacidad de adherencia al mucus, mayor será la probabilidad de alcanzar las células epiteliales subyacentes (De Melo *et al.*, 1988).



**Figura 7.2.** Adherencia de *C. jejuni* NCTC 11351 (11351), NCTC 11168 (11168), 118, LP1 y *C. coli* LP2 a mucus intestinal de colon humano. Resultados expresados como % de adherencia con respecto al inóculo bacteriano  $\pm$  la desviación estándar para N=3, n=4.

### 7.3.3. Ensayos de exclusión competitiva

En este trabajo se estudió la capacidad de las cepas *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, *Propionibacterium freudenreichii* ssp *Shermanii* y *Lactococcus lactis* ssp *Lactis*, reconocidas como probióticos humanos y las que presentaron la mayor adherencia a mucus intestinal de pollo, para prevenir por exclusión competitiva (EC) la adhesión de *Campylobacter* spp. (Tablas 7.2.-7.3.). De igual manera se comparó el efecto *in vitro* de dichas cepas con el de la mezcla probiótica indefinida Broilact®. Para dichos experimentos se seleccionaron dos cepas provenientes de aislados clínicos *C. jejuni* 118 y *C. coli* LP2, y una cepa perteneciente a la colección NCTC (*C. jejuni* NCTC 11168).

Al emplear los diferentes probióticos seleccionados se observaron disminuciones en el porcentaje de adherencia de *Campylobacter* con respecto al control prácticamente en todos los casos. Las mayores reducciones en la tasa de adherencia se observaron para *C. jejuni* 11168 al emplear Broilact® en ciego (reducción de 31,07%), *Propionibacterium freudenreichii* ssp *Shermanii* en colon

(36,36%) y *Lactococcus lactis* ssp *Lactis* en yeyuno (30,89%), así como para *C. jejuni* 118, al usar Broilact® en yeyuno (38,4%) y *Lactococcus lactis* ssp *Lactis* en ciego (36,80%). Se determinó también que estas reducciones parecen ser dependientes de la región intestinal en que fue extraído el mucus, de la cepa probiótica utilizada y de la cepa de *Campylobacter* estudiada.

**Tabla 7.2.** Adherencia de *C. jejuni* NCTC 11168, *C. jejuni* 118 y *C. coli* LP2 a mucus proveniente de yeyuno (Ye), colon (Co) y ciego (Ci) de pollo en presencia de Broilact®, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 (LGG), *Propionibacterium freudenreichii* ssp *Shermanii* (JS) y *Lactococcus lactis* ssp *Lactis* (LAC). Resultados expresados como el % de adherencia  $\pm$  la desviación estándar para N=2, n=3. Control de la adherencia = 100%. (\*) Significativamente diferente a la muestra con Broilact® I ( $p \leq 0,05$ ).

Probiótico	Región	Cepa de <i>Campylobacter</i>		
		11168	118	LP2
Broilact®	Ye	75,39 $\pm$ 1,48	61,60 $\pm$ 10,18	82,98 $\pm$ 2,13
	Co	88,77 $\pm$ 1,51	74,36 $\pm$ 13,30	81,33 $\pm$ 4,16
	Ci	68,93 $\pm$ 6,39	95,29 $\pm$ 14,97	73,12 $\pm$ 2,46
LGG	Ye	76,96 $\pm$ 2,22	90,40 $\pm$ 7,92	107,09 $\pm$ 7,47*
	Co	98,93 $\pm$ 3,78	100,00 $\pm$ 10,88	94,00 $\pm$ 7,21
	Ci	85,88 $\pm$ 9,59	98,82 $\pm$ 6,66	91,94 $\pm$ 1,61*
JS	Ye	79,06 $\pm$ 8,14	92,00 $\pm$ 32,81	90,07 $\pm$ 8,60
	Co	63,64 $\pm$ 3,78	89,74 $\pm$ 1,21	89,33 $\pm$ 9,87
	Ci	75,14 $\pm$ 15,18	77,65 $\pm$ 16,64	79,84 $\pm$ 7,98
LAC	Ye	69,11 $\pm$ 2,96	85,60 $\pm$ 3,39	87,90 $\pm$ 12,50
	Co	85,03 $\pm$ 6,81	73,60 $\pm$ 2,26	81,33 $\pm$ 7,02
	Ci	85,88 $\pm$ 3,20	63,20 $\pm$ 5,66	79,03 $\pm$ 5,82*

A pesar de que no existen trabajos previos en los que se estudie el fenómeno de EC de *Campylobacter* en mucus intestinal de pollo, en estudios *in vivo*, Morishita *et al.* (1997) encontraron una reducción de un 27% en la tasa de colonización de *C. jejuni* al incluir una mezcla de *L. acidophilus* y *E. faecium* en la dieta de pollos. Por otra parte, Ma *et al.* (2006), estudiaron el efecto de diferentes cepas de *Lactobacillus* aisladas de pollo sobre la adherencia de *Salmonella* y *E. coli* a mucus intestinal de pollo, y observaron una reducción en la adherencia de los patógenos en presencia de los lactobacilos, dependiente de la cepa probiótica, del patógeno y de la región intestinal de procedencia del mucus.

En los resultados obtenidos en este trabajo se observa que en la mayor parte de los casos, no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos al emplear Broilact® y las bacterias probióticas seleccionadas, para el mucus proveniente de la misma región intestinal y para una misma cepa de *Campylobacter*.

Broilact® fue el primer producto comercial de EC desarrollado y ha sido empleado con eficacia en la alimentación de pollos desde 1987 (Schneitz, 2005). A pesar de que hasta ahora el efecto de Broilact® sobre la adherencia de *Campylobacter* a mucus de pollo no había sido estudiado, la efectividad de este producto sobre la colonización del patógeno *in vivo* ha sido objeto de investigaciones. En este sentido, Hakkinen *et al.* (1999) determinaron que al añadir Broilact® como complemento en la dieta de pollos contaminados con *C. jejuni* se observa una disminución significativa en la tasa de colonización del patógeno. De manera similar, Aho *et al.* (1992) observaron una reducción en la población de *Campylobacter* en las heces de pollos al incluir Broilact® como complemento en su alimentación.

En resumen se puede decir que algunos probióticos de uso humano, tales como *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, *Propionibacterium freudenreichii* ssp *Shermanii* y *Lactococcus lactis* ssp *Lactis*, podrían ser empleados como agentes profilácticos en la alimentación de pollos con el fin de disminuir la colonización de *Campylobacter* spp.

#### 7.4. CONCLUSIONES

- 1) Entre las 10 cepas probióticas estudiadas, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, *Propionibacterium freudenreichii* ssp *Shermanii* y *Lactococcus lactis* ssp *Lactis*, fueron las más adhesivas a mucus intestinal de pollo.
- 2) Todas las cepas de *Campylobacter* fueron capaces de adherirse a los diferentes tipos de mucus, de una manera dependiente de la especie y región de la que se origina el mucus, y de la especie y cepa bacteriana empleada. Las 5 cepas de *Campylobacter* estudiadas presentaron una mayor adherencia a mucus intestinal de pollo que *E. coli* H-10407 y *S. typhimurium* 14028.
- 3) Las cepas *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, *Propionibacterium freudenreichii* ssp *Shermanii* y *Lactococcus lactis* ssp *Lactis*, son capaces de prevenir la adherencia de *Campylobacter* spp. a mucus intestinal de pollo de una manera similar a la mezcla comercial Broilact® y el efecto es dependiente de la cepa probiótica, de la región de procedencia del mucus y de la cepa de *Campylobacter*.

## 7.5. BIBLIOGRAFÍA

- Aho, M., Nuotio, L., Nurmi, E., Kiiskinen, T. 1992. Competitive exclusion of campylobacters from poultry with K-bacteria and Broilact®. *International Journal of Food Microbiology* 15: 265-275.
- Alander, M., Satokari, R., Korpela, R., Saxelin, M., Vilpponen-Salmenla, T., Mattila-Sandholm, T., Von Wright, A. 1999. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* LGG, after oral consumption. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 351-354.
- Audisio, M.C., Oliver, G., Apella, M.C. 2000. Protective effect of *Enterococcus faecium* J96, a potential probiotic strain, on chicks infected with *Salmonella pullorum*. *Journal of Food Protection* 63: 1333-1337.
- Behling, R.G., Wong, A.C.L. 1994. Competitive exclusion of *Salmonella enteritidis* in chicks by treatment with a single culture plus dietary lactose. *International Journal of Food Microbiology* 22: 1-9.
- Blankenship, L.C., Bailey, J.S., Cox, N.A., Stern, N.J., Brewer, R., Williams, O. 1993. Two-step mucosal competitive exclusion flora treatment to diminish salmonellae in commercial broiler chickens. *Poultry Science* 72: 1667-1672.
- Borriello, S.P., Hammes, W.P., Holzapfel, W., Marteau, P., Schrezenmeir, J., Vaara, M., Valtonen, V. 2003. Safety of probiotics that contain Lactobacilli or Bifidobacteria. *Clinical Infectious Diseases* 36: 775-780.
- Byrne, C.M., Clyne, M., Bourke, B. 2007. *Campylobacter jejuni* adhere to and invade chicken intestinal epithelial cells *in vitro*. *Microbiology* 153: 561-569.
- Cawthraw, S., Ayling, R., Nuijten, P., Wassenaar, T., Newell, D.G. 1994. Isotype, specificity, and kinetics of systemic and mucosal antibodies to *Campylobacter jejuni* antigens, including flagellin, during experimental oral infections of chicken. *Avian Diseases* 38: 341-349.
- Collado, M.C., Gueimonde, M., Hernández, M., Sanz, Y., Salminen, S. 2005. Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. *Journal of Food Protection* 68: 2672-2678.
- Collado, M.C., Grześkowiak, Ł., Salminen, S. 2007. Probiotic strains and their combination inhibit *in vitro* adhesion of pathogens to pig intestinal mucus. *Current Microbiology* 55: 260-265.
- De Melo, M.A., Pechere, J.C. 1988. Effect of mucin on *Campylobacter jejuni* association and invasion of Hep-2 cells. *Microbiology and pathogenesis* 5: 71-76.
- EFSA. 2007. Report of the Task Force of Zoonoses, data Collection including a proposal for a harmonized monitoring scheme of antimicrobial resistance in *Salmonella* in fowl (*Gallus gallus*), turkeys, and pigs and *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in broilers. *The EFSA Journal* 96: 1-46.
- Falk, P.G., Hooper, L.V., Midtvedt, T., Gordon, J.I. 1998. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 1157-1170.
- Garriga, M., Pascual, M., Monfort, J.M., Hugas, M. 1998. Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. *Journal of Applied Microbiology* 84: 125-132.
- Gerard, P., Brezillon, C. 2008. Characterization of cecal microbiota and response to an orally administered lactobacillus probiotic strain in the broiler chicken. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 14: 115-122.

- Giovanardi, D., Campagnari, E., Sperati, R.L., Pesente, P., Ortali, G., Furlattini, V. 2005. Avian pathogenic *Escherichia coli* transmission from broiler breeders to their progeny in an integrated poultry production chain. *Avian Pathology* 34: 313-318.
- Havenaar, R., Huis in't Veld, J.H.J. 1992. Probiotics: a general view. The lactic acid bacteria. En: The lactic acid bacteria in health and disease. Wood B.J.B. (Ed). Elsevier Applied Science. Londres, p. 209-224.
- Hakkinen, M., Schneitz, C. 1999. Efficacy of a commercial competitive exclusion product against *Campylobacter jejuni*. *British Journal of Poultry Science* 40: 619-621.
- Heres, L. 2004. *Campylobacter* and *Salmonella* control in chickens and the role of fermented food. *Tijdschr Diergeneeskd* 129: 332-335.
- Hugdahl, M.B., Beery, J.T., Doyle, M.P. 1988. Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity* 56: 1560-1566.
- Isolauri, E. 2001. Probiotics in human disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 73: 1142S-1146S.
- Jin, L.Z., Ho, Y.W., Abdullah, N., Jalaludin, S. 1996. Antagonistic effects of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken. *Letters in Applied Microbiology* 23: 67-71.
- Kirjavainen, P., Ouwehand, A.C., Isolauri, E., Salminen, S. 1998. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters* 167: 185-189.
- Kizerwetter-Swida, M., Binek, M. 2006. Adhesion properties of *Lactobacillus* strain of poultry origin and characterization of its antibacterial product. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 50: 439-443.
- Lee, M.D., Newell, D.G. 2006. *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. *Avian Disease* 50: 1-9.
- Lowry, O.H., Rosbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Ma, Y.L., Guo, T., Xu, Z.R., Ma, J.F. 2006. Effect of *Lactobacillus* isolates on the adhesion of pathogens to chicken intestinal mucus in vitro. *Letters in Applied Microbiology* 42: 369-374.
- Madsen, K., Cornish, A., Soper, P., McKaigney, C., Jijon, H., Yachimec, C., Doyle, J., Jewell, L., De Simone, C. 2001. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 121: 580-591.
- Missotten, J.A.M., Michiels, J., Goris, J., Herman, L., Heyndrickx, M., De Smet, S., Dierick, N.A. 2007. Screening of two probiotic products for use in fermented liquid feed. *Livestock Science* 108: 232-235.
- Morishita, T.Y., Aye, P.P., Harr, B.S., Cobb, B.W., Clifford, J.R. 1997. Evaluation of an avian-specific probiotic to reduce the colonization and shedding of *Campylobacter jejuni* in broilers. *Avian Disease* 41: 850-855.
- Mulder, R.W.A.W., Bolder, N.M. 1991. Reduction of *Campylobacter* infection in broilers by competitive exclusion treatment of day-old broiler chicks-a field study. Academic Press. San Diego.
- Nikoskelainen, S., Salminen, S., Bylund, G., Ouwehand, A. 2001. Characterization of the properties of human and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2430-2435.
- Nurmi, E., Rantala, M. 1973. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature* 241: 210-211.



- Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Grönlund, M.M., Isolauri, E., Salminen, S. 1999. Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. *International Dairy Journal* 9: 623-630.
- Ouwehand, A.C., Salminen, S. 2003. *In vitro* adhesion assays for probiotics and their in vivo relevance: a review. *Microbial Ecology in Health and Disease* 15: 175-184.
- Rastall, R.A., Gibson, G.R., Harsharnjit, S.G., Guarner, F., Klaenhammer, T.R., Pot, B., Reid, G., Rowland, I.R., Sanders, M.E. 2005. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 26: 137-142.
- Sahin, O., Zhang, Q., Meitzler, J.C., Harr, B.S., Morishita, T.Y., Mohan, R. 2001. Prevalence, antigenic specificity, and bactericidal activity of poultry anti-*Campylobacter* maternal antibodies. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3951-3957.
- Salminen, S.J., Gueimonde, M., Isolauri, E. 2005. Probiotics That Modify Disease Risk. *Journal of Nutrition* 135:1294-1298.
- Sarra, P.G., Morelli, L., Bottazzi, V. 1992. The lactic acid microflora of fowl. En: *The lactic acid bacteria*. Wood, B.J.B. (Ed). Elsevier Applied Science. Londres, p. 3-19.
- Saxelin, M. 1997. *Lactobacillus* GG-a human probiotic strain with thorough clinical documentation. *Food Reviews International* 13: 293-313.
- Scheitz, C. 2005. Competitive exclusion in poultry-30 years of research. *Food Control* 16: 657-667.
- Shanker, S., Lee, A., Sorrell, T.C. 1988. Experimental colonization of broiler chicks with *Campylobacter jejuni*. *Epidemiology and Infection* 100: 27-34.
- Shanker, S., Lee, A., Sorrell, T.C. 1990. Horizontal transmission of *Campylobacter jejuni* amongst broiler chicks: experimental studies. *Epidemiology and Infection* 104: 101-110.
- Smirnov, A., Sklan, D., Uni, Z. 2004. Mucin dynamics in the chick small intestine are altered by starvation. *Journal of Nutrition* 134: 736-742.
- Soerjadi, A.S., Snoeyenbos, G.H., Weinack, O.M. 1982. Intestinal colonization and competitive exclusion of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in young chicks. *Avian Disease* 26: 520-524.
- Soerjadi-Liem, A.S., Snoeyenbos, G.H., Weinack, O.M. 1984. Comparative studies on competitive exclusion of three isolates of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in chickens by negative gut microflora. *Avian Disease* 28: 139-146.
- Stavric, S. 1992. Defined cultures and prospects. *International Journal of Food Microbiology* 15: 245-263.
- Stern, N.J., Bailey, J.S., Blankenship, L.C., Cox, N.A., McHan, F. 1988. Colonization characteristics of *Campylobacter jejuni* in chick ceca. *Avian Disease* 32: 330-334.
- Stern, N.J. 1992. Reservoirs for *Campylobacter jejuni* and approaches for intervention in poultry. American Society for Microbiology. Washington D.C.
- Stern, N.J. 1994. Mucosal competitive exclusion to diminish colonization of chickens by *Campylobacter jejuni*. *Poultry Science* 73: 402-407.

- Stern, N.J., Cox, N.A., Bailey, J.S., Berrang, M.E., Musgrove, M.T. 2001. Comparison of mucosal competitive exclusion and competitive exclusion treatment to reduce *Salmonella* and *Campylobacter* spp. colonization in broiler chickens. *Poultry Science* 80: 156-160.
- Sylvester, F.A., Philpott, D., Gold, B., Lastovica, A., Forstner, J.F. 1996. Adhesion to lipids and intestinal mucin by a recently recognized human pathogen, *Campylobacter upsaliensis*. *Infection and Immunity* 64: 4060-4066.
- Szymanski, C.M., King, M., Haardt, M., Armstrong, G.D. 1995. *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 cells. *Infection and Immunity* 63: 4295-4300.
- Van Deun, K., Pasmans, F., Ducatelle, R., Flahou, B., Vissenberg, K., Martel, A., Van den Broeck, W., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F. 2008. Colonization strategy of *Campylobacter jejuni* results in persistent infection of the chicken gut. *Veterinary Microbiology* 130: 285-297.
- Verma, M., Madhu, M., Marrota, C., Lakshmi, C.V., Davidson, E.A. 1994. Mucin coding sequences are remarkably conserved. *Cancer Biochemistry Biophysics* 14: 41-51.
- Vicente, J.L., Torres-Rodríguez, A., Higgins, S.E., Pixley, C., Tellez, G., Donoghue, A.M., Hargis, B. 2008. Effect of a selected *Lactobacillus* spp.-based probiotic on *Salmonella enterica* serovar *enteritidis*-infected broiler chicks. *Avian Disease* 52: 143-146.
- Willis, W.L., Reid, L. 2008. Investigating the effects of dietary probiotic feeding regimens on broiler chicken production and *Campylobacter jejuni* presence. *Poultry Science* 87: 606-611.
- Young, K.T., Davis, L.M., DiRita, V.J. 2007. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 5: 665-679.

# Anexos

**Tabla A.1.** Influencia de las condiciones de incubación durante los ensayos de adherencia e invasividad sobre la viabilidad bacteriana. Resultados expresados como la media del Log ufc/mL  $\pm$  la desviación estándar para N=3, n=2. AERO = incubación en condiciones de aerofilia a 37° C. VAIN 1 h = incubación en condiciones de microaerofilia durante 1 h, VAIN 3 h = incubación en condiciones de microaerofilia durante 3 h, 5% CO<sub>2</sub> 1 h = incubación con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 1 h, 5% CO<sub>2</sub> 3 h = incubación con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 h.

Microorganismo	Condición del control	Control		5% CO <sub>2</sub>	
		1 h	3 h	1 h	3 h
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	VAIN	8,36 $\pm$ 0,09	8,22 $\pm$ 0,04	8,41 $\pm$ 0,07	8,16 $\pm$ 0,13
<i>C. jejuni</i> NCTC 11351	VAIN	7,62 $\pm$ 0,22	7,41 $\pm$ 0,07	7,60 $\pm$ 0,02	7,52 $\pm$ 0,16
<i>C. jejuni</i> LP1	VAIN	9,53 $\pm$ 0,03	9,53 $\pm$ 0,03	9,54 $\pm$ 0,12	9,68 $\pm$ 0,06
<i>C. jejuni</i> 118	VAIN	7,97 $\pm$ 0,08	8,06 $\pm$ 0,01	8,06 $\pm$ 0,05	8,07 $\pm$ 0,05
<i>C. coli</i> LP2	VAIN	9,52 $\pm$ 0,06	9,67 $\pm$ 0,02	9,18 $\pm$ 0,12	9,80 $\pm$ 0,62
<i>S. typhimurium</i> ATCC 1428	AERO	6,72 $\pm$ 0,01	8,25 $\pm$ 0,06	6,70 $\pm$ 0,01	8,48 $\pm$ 0,02
<i>E. coli</i> ATCC 25922	AERO	6,24 $\pm$ 0,04	8,31 $\pm$ 0,03	6,34 $\pm$ 0,01	8,13 $\pm$ 0,02
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	AERO	6,50 $\pm$ 0,04	8,39 $\pm$ 0,02	6,48 $\pm$ 0,01	8,19 $\pm$ 0,11
<i>Klebsiella</i> spp. IFb	AERO	6,24 $\pm$ 0,11	8,17 $\pm$ 0,01	6,29 $\pm$ 0,10	8,20 $\pm$ 0,04
<i>S. sonnei</i> CECT 457	AERO	6,57 $\pm$ 0,02	8,09 $\pm$ 0,01	6,44 $\pm$ 0,03	8,15 $\pm$ 0,02

**Tabla A.2.** Efecto del pH del medio (7, 6, 5) sobre la viabilidad de cultivos de células epiteliales Caco-2 no diferenciadas. y cultivos en fase exponencial de *C. jejuni* LP1. Resultados expresados como la media del porcentaje de células epiteliales viables o el Log de ufc/mL  $\pm$  la desviación estándar. N=número de muestras, n=número de repeticiones. P-valor calculado con respecto al control (pH 7).

<b>Células Caco-2</b>				<b><i>C. jejuni</i> LP1</b>		
pH	N	n	% de células viables	N	n	Log ufc/ml
7	3	2	83,92 $\pm$ 1,71	3	2	8,56 $\pm$ 0,10
6	3	2	84,64 $\pm$ 5,30	3	2	8,53 $\pm$ 0,05
5	3	2	87,50 $\pm$ 7,80	3	2	8,58 $\pm$ 0,05

**Tabla A.3.** Relación entre el pH intestinal de pollos y la capacidad de colonización de *C. jejuni*. Valores del pH de diferentes secciones del intestino de pollos (duodeno, jejunio, ileon y ciego) de 28 días de edad, expresados como la media del pH  $\pm$  la desviación estándar. (+) Capacidad de colonización moderada, (++) Capacidad de colonización alta.

	Duodeno	Yeyuno	Ileon	Ciego	Referencia
<b>pH</b>	6,2 $\pm$ 0,2	5,9 $\pm$ 0,5	6,6 $\pm$ 0,9	7,5 $\pm$ 0,2	Juarez Estrada, M.A., Nava Morales, G.M., Merino Guzmán, R. 2007. Anticoccidial vaccine effect on physiological and immunological parameters in broiler chickens. <i>Veterinaria México</i> 38: 303-318.
<b>Colonización</b>	+	+	+	++	Beery, J.T., Hughdahl, M.B., Doyle, M.P. 1988. Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by <i>Campylobacter jejuni</i> . <i>Applied and Environmental Microbiology</i> 54: 2365-2370.

**Tabla A.4.** Influencia de diferentes concentraciones de gentamicina (GTM), antibiótico utilizado en las pruebas de invasividad, sobre la viabilidad de los diferentes microorganismos. (+) Crecimiento bacteriano, (-) Ausencia de crecimiento bacteriano. (\*) Mínima concentración de GTM capaz de inhibir el crecimiento bacteriano y, por tanto, seleccionada para las pruebas de invasividad.

Microorganismo	Concentración GTM (mg/ml)			
	0	100	250	500
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	+	-*	-	-
<i>C. jejuni</i> NCTC 11351	+	-*	-	-
<i>C. jejuni</i> LP1	+	-*	-	-
<i>C. jejuni</i> 118	+	-*	-	-
<i>C. coli</i> LP2	+	-*	-	-
<i>S. typhimurium</i> ATCC 1428	+	+	+	-*
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	-*	-
<i>Klebsiella</i> spp. IFb	+	+	-*	-
<i>S. sonnei</i> CECT 457	+	+	-*	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	-*	-

**Tabla A.5.** Influencia de los diferentes compuestos empleados en pruebas de adherencia e invasividad sobre la viabilidad de cultivos de células epiteliales Caco-2. Resultados expresados como la media del % de células viables  $\pm$  la desviación estándar para N=3, n=2. ND=células no diferenciadas, DF=células diferenciadas, GTM=gentamicina, POS=oligosacáridos pécticos, MAN=D-manosa, LEC=levaduras calentadas, PAC=paredes de levaduras calentadas, ME=manoproteína enzimática, MT=manoproteína térmica, MTP=manoproteína térmica hidrolizada con pronasa, MTPI=manoproteína térmica hidrolizada con pronasa inactiva, MTHA=manoproteína térmica sometida a hidrólisis ácida. P-valor con respecto al control.

	Concentración		% de células viables		
	(mg/ml)	Diferenciación	N	n	
Control	-	ND	3	2	83,92 $\pm$ 1,71
	-	DF	4	2	89,47 $\pm$ 3,80
GTM	0,50	ND	3	2	83,64 $\pm$ 6,72
	0,50	DF	3	2	89,61 $\pm$ 5,49
POS	2,50	ND	4	2	83,05 $\pm$ 3,33
	2,50	DF	4	2	81,53 $\pm$ 7,63
MAN	15,00	ND	3	2	84,12 $\pm$ 2,70
LEC	15,00	ND	3	2	85,61 $\pm$ 4,26
PAC	15,00	ND	3	2	86,35 $\pm$ 4,35
ME	15,00	ND	2	2	83,95 $\pm$ 14,88
MT	15,00	ND	2	2	83,16 $\pm$ 3,44
MTP	15,00	ND	3	2	82,70 $\pm$ 9,75
MTPI	15,00	ND	3	2	82,90 $\pm$ 11,25
MTHA	15,00	ND	3	2	83,04 $\pm$ 6,00



**Tabla A.6.** Efecto de los diferentes compuestos empleados en pruebas de adherencia e invasividad sobre la viabilidad de *C. jejuni* (LP1, NCTC 11168, NCTC 11351), *C. coli* LP2, *S. typhimurium* ATCC 1428, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. planticola* CECT 843 y *S. sonnei* CECT 457. Resultados expresados como la media del Log ufc/mL  $\pm$  la desviación estándar para N=2, n=2. POS=oligosacáridos pécticos, GMP=glicomacropéptidos, SOS=oligosacáridos sialilados, MAN=D-manosa, LEC=levaduras calentadas, PAC=paredes de levaduras calentadas, MOS=manooligosacáridos, ME=manoproteína enzimática, MT=manoproteína térmica, MTP=manoproteína térmica hidrolizada con pronasa, MTPI=manoproteína térmica hidrolizada con pronasa inactiva, MTHA=manoproteína térmica sometida a hidrólisis ácida. P-valor calculado con respecto al control de la cepa en cuestión.

Microorganismo	Compuesto	Concentración	
		(mg/ml)	Log ufc/ml
<i>C. jejuni</i> NCTC 11351	Control	-	7,95 $\pm$ 0,45
<i>C. jejuni</i> NCTC 11351	POS	2,5	8,21 $\pm$ 0,13
<i>C. jejuni</i> LP1	Control	-	8,56 $\pm$ 0,10
<i>C. jejuni</i> LP1	MAN	15	8,60 $\pm$ 0,03
<i>C. jejuni</i> LP1	LEC	15	8,58 $\pm$ 0,11
<i>C. jejuni</i> LP1	PAC	15	8,60 $\pm$ 0,04
<i>C. jejuni</i> LP1	MOS	15	9,11 $\pm$ 0,22
<i>C. jejuni</i> LP1	ME	15	8,77 $\pm$ 0,09
<i>C. jejuni</i> LP1	MT	15	8,56 $\pm$ 0,13
<i>C. jejuni</i> LP1	MTP	15	8,51 $\pm$ 0,06
<i>C. jejuni</i> LP1	MTPI	15	8,50 $\pm$ 0,11
<i>C. jejuni</i> LP1	MTHA	15	8,47 $\pm$ 0,09
<i>S. typhimurium</i> ATCC 1428	Control	-	8,02 $\pm$ 0,03
<i>S. typhimurium</i> ATCC 1428	MTHA	15	8,37 $\pm$ 0,04
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Control	-	8,63 $\pm$ 0,07
<i>E. coli</i> ATCC 25922	MTHA	15	8,72 $\pm$ 0,01
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Control	-	7,52 $\pm$ 0,06
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	MTHA	15	7,53 $\pm$ 0,02
<i>K. planticola</i> CECT 843	Control	-	8,62 $\pm$ 0,01
<i>K. planticola</i> CECT 843	MTHA	15	8,63 $\pm$ 0,01
<i>S. sonnei</i> CECT 457	Control	-	8,29 $\pm$ 0,12
<i>S. sonnei</i> CECT 457	MTHA	15	8,20 $\pm$ 0,08

```

118          GATTGATCAGCTTAAAAATTTTGTAGCAGCGAAGAGGAAAAAGCTTATATAGAATATTT 60
11168       GATTGATCAGCTTAAAAATTTTGTAGCAGCGAAGAGGAAAAAGCTTATATAGAATATTT 60
Lp1        GATTGATCAGCTTAAAAATTTTGTAGCAGCGAAGAGGAAAAAGCTTATATAGAATATTT 60
11351       GATTGATCAGCTTAAAAATTTTGTAGCAACGAAGAGGAAAAAGCTTATATAGAATATTT 60
Lp2        GATTGATATATTAGAACAAATAGCTAATAATGAAGATGAGTTAGCTTATATAGAGTATTT 60
*****    *  ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
118          TGAAAAATTTAAATTTAGCGTTTTGTGAAAAAGATGAAGATAGGGTTATAAAAAGCTTGGCA 120
11168       TGAAAAATTTAAATTTAGCGTTTTGTGAAAAAGATGAAGATAGGGTTATAAAAAGCTTGGCA 120
Lp1        TGAAAAATTTAAATTTAGCGTTTTGTGAAAAAGATGAAGATAGGGTTATAAAAAGCTTGGCA 120
11351       TGAAAAATTTAAATTTGGCATTTTGTGAAAAAGACGAAGATAGAGTTATAAAAAGCTTGGCA 120
Lp2        TCAAAAGCTAAAAC TAGCTTTTTGTGAAAAGGAAGAAGAAAAGGTTATAGGAGCGTGGCA 120
* **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
118          AGAAGCTGAATTTGCTTGGATGAAAGTAAAATCACCTTTACAAGTGGGACATCCTTTAGA 180
11168       AGAAGCTGAATTTGCTTGGATGAAAGTAAAATCACCTTTACAAGTGGGACATCCTTTAGA 180
Lp1        AGAAGCTGAATTTGCTTGGATGAAAGTAAAATCACCTTTACAAGTGGGACATCCTTTAGA 180
11351       AGAAGCTGAATTTGCTTGGATGAAAGTAAAATCACCTTTACAAGTGGGACATCCTTTAGA 180
Lp2        AGAGGCTGAATTTGCATGGATGAAAGTCAAATCTCCATTACAAGTAGGTCATCCTTTAGA 180
*** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
118          ATATTATGAAGATAATTATACTCATGCGGTGGCATTAGAATGGGATATAAGAATAGAAGA 240
11168       ATATTATGAAGATAATTATACTCATGCGGTGGCATTAGAATGGGATATAAGAATAGAAGA 240
Lp1        ATATTATGAAGATAATTATACTCATGCGGTGGCATTAGAATGGGATATAAGAATAGAAGA 240
11351       ATATTATGAAGATAATTATACTCATGCGGTGGCATTAGAATGGGATATAAGAATAGAAGA 240
Lp2        ATACTATGAAGATAATTACACTCATGCTGTAGCTTTAGAGTGGGATATAAGAATAGAAGA 240
*** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
118          TGAAAAATGATTTTGATGTTTTGAAATTTGGTAATGAAATTAAGGAAAAGTTTGAACATGT 300
11168       TGAAAAATGATTTTGATGTTTTGAAATTTGGTAATGAAATTAAGGAAAAGTTTGAACATGT 300
Lp1        TGAAAAATGATTTTGATGTTTTGAAATTTGGTAGTGAAATTAAGGAAAAGTTTGAACATGT 300
11351       TGAGAATGATTTTGATGTTTTGAAATTTGGTAATGAAATTAAGGAAAAGTTTGAACATGT 300
Lp2        TGAGAGTGATTTTGATGCCTTGAAATTTTCAAAGATATCAAGCAAAGCTTTATGCGCGCT 300
*** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
118          TTATAAAAATATAGGACTTGAAGATTGTGAATTAGAAAAAGAAGTTTTATCTAATATAGA 360
11168       TTATAAAAATATAGGACTTGAAGATTGTGAATTAGAAAAAGAAGTTTTATCTAATATAGA 360
Lp1        TTATAAAAATATAGGACTTGAAGATTGTGAATTAGAAAAAGAAGTTTTATCTAATATAGA 360
11351       TTATAAAAATATAGGACTTGAAGATTGTGAATTAGAAAAAGAAGTTTTATCTAATATAGA 360
Lp2        ATATGAAAAATATCGGAATTCAAGATGAGCAACTTAAAAATGAAGTTTTGCATAATATTGA 360
*** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
118          AAAAACTCAACTTTATATTTGCACTCCGATGATATTTTATGGTGCTGAACTTAAAGGTTT 420
11168       AAAAACTCAACTTTATATTTGCACTCCGATGATATTTTATGGTGCTGAACTTAAAGGTTT 420
Lp1        AAAAACTCAACTTTATATTTGCACTCCGATGATATTTTATGGTGCTGAACTTAAAGGTTT 420
11351       AAAAACTCAACTTTATATTTGCACTCCGATGATATTTTATGGTGCTGAACTTAAAGGTTT 420
Lp2        TAAAACACAGCTTTATGTTTGTGCGCCAATGATTTATTATGGAGCTGAGCTTAAAGGTTT 420
***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
118          ATTCTCAGCTCAAGTC 436
11168       ATTCTCAGCTCAAGTC 436
Lp1        ATTCTCAGCTCAAGTC 436
11351       ATTCTCAGCCCAAGTC 436
Lp2        GTTTTCTGCGCAAGTT 436
** ** * * * * *

```

**Fig. A.1.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del gen *ciaB* de las cepas *C. jejuni* 118 (118), *C. jejuni* NCTC 11168 (11168), *C. jejuni* LP1 (LP1), *C. jejuni* NCTC 11351 (11351) y *C. coli* LP2 (LP2). Secuencias comparadas con base de datos.

```

118          TTAGACTTGGTTATCATTTTGACGATTTTGGCTTGATCAATTAGAATTTGGGTTAGAGC 60
11168       TTAGACTTGGTTATCATTTTGACGATTTTGGCTTGATCAATTAGAATTTGGGTTAGAGC 60
LP1        TTAGACTTGGTTATCATTTTGACGATTTTGGCTTGATCAATTAGAATTTGGGTTAGAGC 60
11351       TTAGACTTGGTTATCATTTTGACGATTTTGGCTTGATCAATTAGAATTTGGCTTAGAGC 60
LP2        TTAGACTAGGGTATCATTTTGATGATTTTGGCTTGATCAATTAGAAGTACTAGGTTTGAAC 60
          ***** ** ***** * ***** * ** ***** *

118          ATTATTCTGATGTTAAATATACAAATACAAATAAAACTACAGATATTACAAGAAGCTTATT 120
11168       ATTATTCTGATGTTAAATATACAAATACAAATAAAACTACAGATATTACAAGAAGCTTATT 120
LP1        ATTATTCTGATGTTAAATATACAAATACAAATAAAACTACAGATATTACAAGAAGCTTATT 120
11351       ATTATTCTGATGTTAAATATACAAATACAAATAAAACTACAGATATTACAAGAAGCTTATT 120
LP2        ATTACTCGGATGTTAAATATACAAATCTACTCTTACCACCGATATTACTAGAAGCTTATT 120
          **** * ** * ** * ** * * * * ** * ** * ** * ** *

118          TGAGTGCTATTTAAAGGTATTGATGTAGGTGAGAAATTTTATTTCTATGGTTTAGCAGGTG 180
11168       TGAGTGCTATTTAAAGGTATTGATGTAGGTGAGAAATTTTATTTCTATGGTTTAGCAGGTG 180
LP1        TGAGTGCTATTTAAAGGTATTGATGTGGGTGAGAAATTTTATTTCTATGGTTTAGCAGGTG 180
11351       TGAGTGCTATTTAAAGGTATTGATGTGGGTGAGAAATTTTATTTCTATGGTTTAGCAGGTG 180
LP2        TGAGTGCTATTTAAAGGCATTGATTTAGGTGAGAAATTTTATTTCTATGGTTTAGCTGGTG 180
          ***** * ** * ** * ** * * ** * ** * ** * ** * ** *

118          GAGGATATGAGGATTTTCAAATGCTGCTTATGATAATAAAAGCGGTGGATTTGGACATT 240
11168       GAGGATATGAGGATTTTCAAATGCTGCTTATGATAATAAAAGCGGTGGATTTGGACATT 240
LP1        GAGGATATGAAGATTTTCAAATGCTGCTTATGATAATAAAAGCGGTGGATTTGGACATT 240
11351       GAGGATATGAGGATTTTCAAATGCTGCTTATGATAATAAAAGCGGTGGATTTGGACATT 240
LP2        GGGGATATGAGGATTTTCTAAAGCGCTTTTATGATAATAAAAGTGGAGGATTTGGCCATT 240
          * ***** * ** * ** * ** * * ** * ** * ** * ** * ** *

118          ATGGCGCGGGTGTAAAATCCGCTTAGTGATTCTTTGGCTTTAAGACTTGAAGACTAGAG 300
11168       ATGGCGCGGGTGTAAAATCCGCTTAGTGATTCTTTGGCTTTAAGACTTGAAGACTAGAG 300
LP1        ATGGCGCGGGTGTAAAATCCGCTTAGTGATTCTTTGGCTTTAAGACTTGAAGACTAGAG 300
11351       ATGGTGCAGGGTGTAAAATCCGCTTAGTGATTCTTTGGCTTTAAGACTTGAAGACTAGAG 300
LP2        ATGGAGCAGGTTTAAAATTTCCGCTTAGTGATTCTTTAGCTTTAAGACTTGAACAAGAG 300
          ***** * ** * ** * ** * * ** * ** * ** * ** * ** *

118          ATCAAATT 308
11168       ATCAAATT 308
LP1        ATCAAATT 308
11351       ATCAAATT 308
LP2        ATCAAATT 308
          *****

```

**Fig. A.2.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del gen *cadF* de las cepas *C. jejuni* 118 (118), *C. jejuni* NCTC 11168 (11168), *C. jejuni* LP1 (LP1), *C. jejuni* NCTC 11351 (11351) y *C. coli* LP2 (LP2). Secuencias comparadas con base de datos

```

118          AGTGAGGCGAAATTCCAACCTTAGTGTTAAAAAAGACTTTTTGAAAATTTACTAGGACTA 60
11168        AGTGAGGCGAAATTCCAACCTTAGTGTTAAAAAAGACTTTTTGAAAATTTACTAGGACTA 60
LP2          AGTGAGGCGAAATTCCAACCTTAGTGTTAAAAAAGACTTTTTGAAAATTTACTAGGACTA 60
LP1          AGTGAGGCGAAATTCCAACCTTAGTGTTAAAAAAGACTTTTTGAAAATTTACTAGGACTA 60
11351        AGTGAGGCGAAATTCCAACCTTAGTGTTAAAAAAGACTTTTTGAAAATTTACTAGGACTA 60
*****

118          GATGAAAAATATTATATAGCCTTACTCAAACCTCTTGGTGGCAAATTTATGAGCATTCT 120
11168        GATGAAAAATATTATATAGCCTTACTCAAACCTCTTGGTGGCAAATTTATGAGCATTCT 120
LP2          GATGAAAAATATTATATAGCCTTACTCAAACCTCTTGGTGGCAAATTTATGAGCATTCT 120
LP1          GATGAAAAATATTATATAGCCTTACTCAAACCTCTTGGTGGCAAATTTATGAGCATTCT 120
11351        GATGAAAAATATTATATAGCCTTACTCAAACCTCTTGGTGGCAAATTTATGAGCATTCT 120
*****

118          TCTCCTTTTAGAGAAACCAACTATCAACCAGAATTTTTTATAGATCTTCCTTTATATCTT 180
11168        TCTCCTTTTAGAGAAACCAACTATCAACCAGAATTTTTTATAGATCTTCCTTTATATCTT 180
LP2          TCTCCTTTTAGAGAAACCAACTATCAACCAGAATTTTTTATAGATCTTCCTTTATATCTT 180
LP1          TCTCCTTTTAGAGAAACCAACTATCAACCAGAATTTTTTATAGATCTTCCTTTATATCTT 180
11351        TCTCCTTTTAGAGAAACCAACTATCAACCAGAATTTTTTATAGATCTTCCTTTATATCTT 180
*****

118          AAAGATTATGAATTTTTTAACAATCTACGCGTAGGTATATTGCATGAAAGCAATGGCAAG 240
11168        AAAGATTATGAATTTTTTAACAATCTACGCGTAGGTATATTGCATGAAAGCAATGGCAAG 240
LP2          AAAGATTATGAATTTTTTAACAATCTACGCGTAGGTATATTGCATGAAAGCAATGGCAAG 240
LP1          AAAGATTATGAATTTTTTAACAATCTACGCGTAGGTATATTGCATGAAAGCAATGGCAAG 240
11351        AAAGATTATGAATTTTTTAACAATCTACGCGTAGGTATATTGCATGAAAGCAATGGCAAG 240
*****

118          GGAGATGAGAATTTACAATCTCGCTCATGGAATAGAATTTATGTATCTACTGCTATTTTA 300
11168        GGAGATGAGAATTTACAATCTCGCTCATGGAATAGAATTTATGTATCTACTGCTATTTTA 300
LP2          GGAGATGAGAATTTACAATCTCGCTCATGGAATAGAATTTATGTATCTACTGCTATTTTA 300
LP1          GGAGATGAGAATTTACAATCTCGCTCATGGAATAGAATTTATGTATCTACTGCTATTTTA 300
11351        GGAGATGAGAATTTACAATCTCGCTCATGGAATAGAATTTATGTATCTACTGCTATTTTA 300
*****

118          TATAATAAATTTTATTTGTTCCACGCCTTTGGTATAGAAT 341
11168        TATAATAAATTTTATTTGTTCCACGCCTTTGGTATAGAAT 341
LP2          TATAATAAATTTTATTTGTTCCACGCCTTTGGTATAGAAT 341
LP1          TATAATAAATTTTATTTGTTCCACGCCTTTGGTATAGAAT 341
11351        TATAATAAATTTTATTTGTTCCACGCCTTTGGTATAGAAT 341
*****

```

**Fig. A.3.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del gen *pldA* de las cepas *C. jejuni* 118 (118), *C. jejuni* NCTC 11168 (11168), *C. jejuni* LP1 (LP1), *C. jejuni* NCTC 11351 (11351) y *C. coli* LP2 (LP2). Secuencias comparadas con base de datos

```

LP1      AAGGCTATGGATGAGCAACTTAAAATCTTAGATACAATTAAAACCTAAGGCAACTCAAGCA 60
LP2      AAGGCTATGGATGAGCAACTTAAAATCTTAGATACAATCAAAACTAAGGCAACTCAAGCA 60
11351    AAGGCTATGGATGAGCAACTTAAAATCTTAGATACAATCAAAACTAAGGCAACTCAAGCA 60
11168    AAGGCTATGGATGAGCAACTTAAAATCTTAGATACAATCAAAACTAAGGCAACTCAAGCG 60
118      AAGGCTATGGATGAGCAACTTAAAGATCTTAGATACTATCAAGACCAAAGCTACTCAAGCC 60
*****

LP1      GCTCAAGATGGACAAAGTTTAAAAACAAGAACCATGCTTCAAGCAGATATCAACCGTTTA 120
LP2      GCTCAAGATGGACAAAGTCTAAAAACAAGAACCATGCTTCAAGCAGATATCAACCGTTTA 120
11351    GCTCAAGATGGACAAAGTTTAAAAACAAGAACCATGCTTCAAGCAGATATCAACCGTTTA 120
11168    GCTCAAGATGGACAAAGTTTAAAAACAAGAACCATGCTTCAAGCAGATATCAACCGTTTA 120
118      GCTCAAGATGGTCAAAGTCTAAAAACAAGAACCATGCTTCAAGCAGATATAAACCGCTTA 120
*****

LP1      ATGGAAGAACTTGACAATATCGCAAATACTACTTCATTTAACGGTAAGCAACTTTTAAGT 180
LP2      ATGGAAGAACTTGACAATATCGCAAATACTACTTCATTTAACGGTAAGCAACTTTTAAGT 180
11351    ATGGAAGAACTTGATAATATCGCAAATACTACTTCATTTAACGGTAAACAACCTTTTAAGT 180
11168    ATGGAAGAACTTGACAATATCGCAAATACTACTTCATTTAACGGTAAACAACCTTTTAAGT 180
118      ATGGAAGAACTTGATAATATCGCAAATACTACTTCATTTAACGGTAAACAACCTTTTAAGT 180
*****

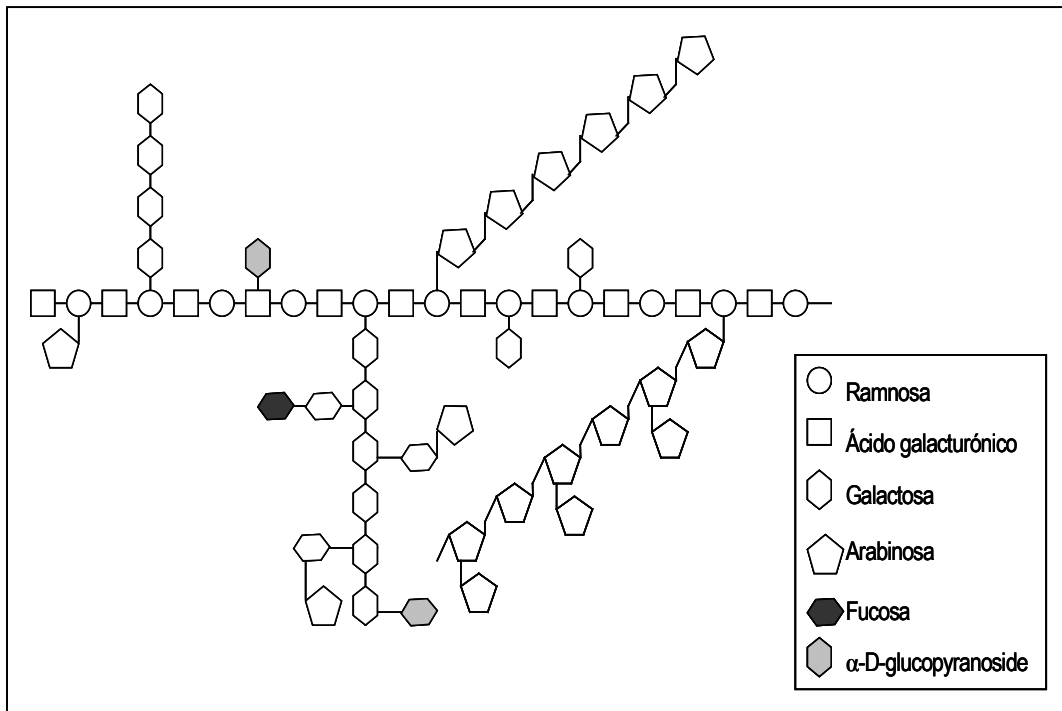
LP1      GGAAATTTTATCAATCAAGAATTTCAAATCGGCGCAAGTTCAAATCAAACGTGTAAGCT 240
LP2      GGAAATTTTATCAATCAAGAATTTCAAATCGGTGCTAGTTCAAATCAAACGTATAAAGCT 240
11351    GGAAATTTTATCAATCAAGAATTTCAAATCGGTGCTAGTTCAAATCAAACGTGTAAGCT 240
11168    GGAAATTTTATCAATCAAGAATTTCAAATCGGTGCAAGTTCAAATCAAACGTGTAAGCT 240
118      GGTGGTTTACCAATCAAGAATTTCAAATCGGTCAAGTTCAAATCAAACGTGTAAGCA 240
**      *****

LP1      ACCATAGGAGCAACTCAATCTTCTAAGATAGGTTAACACGCTTTGAAACAGGAGGAAGA 300
LP2      ACTATAGGAGCAACTCAATCTTCTAAGATAGGTTAACACGCTTTGAAACAGGAGGAAGA 300
11351    ACCATAGGAGCAACTCAATCTTCTAAGATAGGTTAACACGCTTTGAAACAGGAGGAAGA 300
11168    ACTATAGGAGCAACTCAATCTTCTAAGATAGGTTAACACGCTTTGAAACAGGAGGAAGA 300
118      ACTATAGGTGCAACTCAGTCTTCAAAAATCGGTGTTACAAGATTTGAAACAGGTTACAA 300
**      *****

LP1      ATTTTCATCTAGTGGCGAAGTG 321
LP2      ATTTTCATCTAGTGGTGAAGTG 321
11351    ATTTTCATCTAGTGGTGAAGTG 321
11168    ATTTCAACTAGTGGCGAAGTA 321
118      AGTGTAACCTCAGGTGTAGTA 321
* * * * *

```

**Fig. A.4.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del gen *flaA* de las cepas *C. jejuni* 118 (118), *C. jejuni* NCTC 11168 (11168), *C. jejuni* LP1 (LP1), *C. jejuni* NCTC 11351 (11351) y *C. coli* LP2 (LP2). Secuencias comparadas con base de datos



**Fig. A.5.** Modelo de la estructura del ramnogalacturonano I. El esqueleto está formado de disacáridos de 4- $\alpha$ -d-AGal-(2)- $\alpha$ -L-Ram-(1). Las ramificaciones están conformadas por oligosacáridos compuestos principalmente por residuos de  $\alpha$ -L-arab y  $\beta$ -D-Gal unidos al carbono C4 de algunos de los residuos de Ram. Algunos de los residuos de Ram pueden estar también O-acetilados en el carbono C2 o C3. Agal (ácido galacturónico), Ram (ramnosa), Ara (arabinosa), Gal (galactosa). Adaptado de: Ridley, B.L., O'Neil, M.A., Mohnen, D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis and oligagalacturonide-related signalling. *Phytochemistry* 57: 929-967.