



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA**

**TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Especies de *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas aisladas en centros de cuidado materno-infantil de la ciudad de Loja.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**AUTOR:** Obaco Díaz, Erika Anabel

**DIRECTOR:** Simaluiza Masabanda, Rosa Janneth, Mgtr.

**LOJA – ECUADOR  
2016**



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>*

Septiembre, 2016

## APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magister.

Rosa Janneth Simaluiza Masabanda

### DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: **Especies de *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas aisladas en centros de cuidados materno – infantil de la ciudad de Loja**, realizado por Erika Anabel Obaco Díaz, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, 21 de noviembre de 2016

.....

Mgtr. Janneth Simaluiza  
Directora

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Erika Anabel Obaco Díaz declaro ser autor(a) del presente trabajo de titulación: **Especies de *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas aisladas en centros de cuidados materno-infantil de la ciudad de Loja**, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo la Mgr. Janneth Simaluiza director (a) del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.....

Erika Anabel Obaco Díaz

CI. 1104725450

## DEDICATORIA

A mi familia.

A mis padres que siempre me han apoyado, principalmente a Ud. mami que ha sido el gran ejemplo, ayuda y motivación para poder cumplir este objetivo, que con su afecto y sabias palabras día a día me inspiro a seguir adelante y no dejarme vencer por las adversidades que se presentaban en el camino.

A mi hermano el cual ha sido uno de mis modelos a seguir ya que con su constancia y esfuerzo que ha realizado cada día siempre me demostró que todo se puede lograr si lo deseas y luchas por cumplir ese objetivo.

A mis amigos que cada día con su apoyo, bromas y demás hicieron de esta etapa más llevadera.

A mi migui que has sido una de las mejores personas que he conocido y que en cada momento que te he necesitado has estado ahí incondicionalmente, te quiero.

***Erika Anabel.***

## AGRADECIMIENTO

Principalmente a mi madre porque sin su sacrificio y entrega este sueño nunca lo hubiese logrado.

Al Dr. Heriberto Fernández que sin su colaboración en este proyecto posiblemente aún no se lo hubiese terminado.

A mi directora de tesis Mgtr. Janeth Simaluiza por su asesoría en el desarrollo del presente proyecto.

A la Mgtr. Zorayda Toledo por sus enseñanzas y paciencia en todo este transcurso de tiempo.

A mis compañeros de laboratorio David y Alexis quienes colaboraron durante el transcurso del proyecto.

Así mismo agradecer a todos quienes de una u otra manera se hicieron presentes he hicieron posible la finalización de este proyecto.

Gracias a todos.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARATULA .....	I
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS .....	III
DEDICATORIA .....	IV
AGRADECIMIENTO .....	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	VI
ÍNDICE DE TABLAS .....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
RESUMEN.....	X
ABSTRACT .....	XI
INTRODUCCIÓN.....	12
CAPÍTULO 1 .....	14
MARCO TEÓRICO.....	14
1.1 <i>Campylobacter</i> .....	15
1.2 Reservorios de <i>Campylobacter</i> .....	15
1.3 Clasificación taxonómica .....	15
1.3.1 Especies termófilas. ....	16
1.4 Epidemiología.....	17
1.5 Morfología y características fisiológicas .....	18
1.6 Patogenia y factores de virulencia.....	19
1.6.1 Motilidad y quimiotaxis. ....	20
1.6.2 Adherencia.....	20
1.6.3 Producción de toxinas.....	21
1.6.4 Síndrome de Guillain-Barré.....	21
1.7 Manifestaciones clínicas.....	22
1.8 Diagnóstico de laboratorio .....	23
1.8.1 Microscopía. ....	23
1.8.2 Cultivos.....	23
1.8.3 Identificación molecular. ....	24
1.9 Tratamiento.....	25
1.9.1 Resistencia a antimicrobianos. ....	25

CAPÍTULO 2 .....	27
METODOLOGÍA.....	27
CAPITULO 3 .....	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIONES.....	40
RECOMENDACIONES.....	41
Bibliografía.....	42
ANEXOS.....	48
ANEXO 1: PREPARACIÓN DE MEDIO SELECTIVO BUTZLER.....	49
ANEXO 2: PREPARACIÓN DE MEDIO MUELLER HINTON .....	50
ANEXO 3: COLORACIONES PARA IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE <i>CAMPYLOBACTER</i> .....	51
ANEXO 4: IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA.....	52
ANEXO 5: MÉTODO DE FILTRACIÓN EN MEBRANA DE NITROCELULOSA DE 0,45µm .....	53
ANEXO 6: PREPARACIÓN DE INÓCULO PARA ANTIBIOGRAMAS. ....	54
ANEXO 7: CRIOCONSERVACIÓN DE CEPAS .....	54
ANEXO 8: PROTOCOLO PARA EXTRACCIÓN DE DNA DE CÉLULAS CULTIVADA .....	55
ANEXO 9: PCR – MULTIPLEX.....	57
ANEXO 10: ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA .....	58

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Secuencias de primers utilizados para el ensayo de PCR – MULTIPLEX y tamaño de productos de PCR. ....	31
<b>Tabla 2.</b> Frecuencia de aislamiento de <i>Campylobacter spp.</i> en muestras fecales de niños.....	33
<b>Tabla 3.</b> Frecuencia de aislamiento de especies de <i>Campylobacter.</i> ....	34
<b>Tabla 4.</b> Condiciones para PCR .....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Colonias puras de <i>Campylobacter spp.</i> en medio selectivo butzler .....	28
<b>Figura 2.</b> <i>Campylobacter spp.</i> observado en lente de 100x .....	13
<b>Figura 3.</b> Antibiograma de colonias aisladas de.....	30
<b>Figura 4.</b> Especies de <i>Campylobacter</i> .....	35
<b>Figura 5.</b> Actividad antimicrobiana de 6 drogas frente al género <i>Campylobacter spp.</i> ..	36
<b>Figura 6.</b> Actividad antimicrobiana de 6 drogas frente a <i>C. jejuni</i> . .....	37
<b>Figura 7.</b> Actividad antimicrobiana de 6 drogas frente a <i>C.coli</i> .....	38
<b>Figura 8.</b> Medios Butzler.....	49
<b>Figura 9.</b> Coloración con Tinción Hucker. ....	51
<b>Figura 10.</b> Prueba de hidrolisis del hipurato .....	52
<b>Figura 11.</b> Filtración en membrana de nitrocelulosa.....	53
<b>Figura 12.</b> Electroforesis en gel de agarosa .....	58

## RESUMEN

La campilobacteriosis es una zoonosis de distribución mundial, causada por *Campylobacter spp.* el cual se halla habitualmente como comensal del tracto gastrointestinal de animales domésticos y salvajes. Las zoonosis alimentarias se han convertido en un grave problema para la Salud Pública en países desarrollados como en vías de desarrollo por lo cual se ha considerado de gran importancia investigar la prevalencia y resistencia que presentan en la población y de esta manera proporcionar al laboratorio y a la clínica, elementos objetivos para enfrentar la aparición emergente de cepas resistentes a fluoroquinolonas. Se analizó muestras de heces de niños de 0 – 4 años de centros de cuidado materno infantil de la ciudad de Loja, obteniendo 13,4% (17/127) de muestras positivas para *Campylobacter spp.* de los cuales el 58,8% (10/17) pertenecen a *Campylobacter jejuni* y 41,2% (7/17) a *Campylobacter coli*. Al analizar la actividad antimicrobiana se encontró que presentaban resistencia hacia ácido nalidíxico, ciprofloxacino, eritromicina y ampicilina con 76,5%, 76,5%, 5,9% y 17,7% respectivamente.

**Palabras clave:** Campilobacteriosis, *Campylobacter*, *C. jejuni*, *C. coli*

## ABSTRACT

*Campylobacteriosis* is a worldwide zoonosis caused by *Campylobacter* spp. which is usually found as a commensal of the gastrointestinal tract of domestic and wild animals. Foodborne zoonoses have become a serious problem for public health in developed countries and in developing and therefore has been considered of great importance to investigate the prevalence and resistance present in the population and thus provide the laboratory and clinic, aims to address the emerging emergence of resistant strains to fluoroquinolones elements. children stool samples were analyzed 1 - 4 years of maternal and child care centers in the city of Loja, obtaining 13.4% (17/127) of samples positive for *Campylobacter* of which 58.8% (10 / 17) belonging to *Campylobacter jejuni* and 41.2% (7/17) to *Campylobacter coli*. By analyzing the antimicrobial activity found to exhibit resistance to nalidixic acid, ciprofloxacin, erythromycin and ampicillin 76.5%, 76.5%, 5.9% and 17.7% respectively.

**Keywords:** *Campylobacteriosis*, *Campylobacter*, *C. jejuni*, *C. coli*

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias del género *Campylobacter* son bacilos Gram-negativos, no esporulados, helicoidales y finos, que pueden presentar diversas morfologías. Son móviles y de crecimiento lento. La mayoría de las cepas son microaerófilas y necesitan una atmósfera especial para crecer, con 10% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y 85% de N<sub>2</sub> (Paucar *et al.*, 2014).

El género *Campylobacter* comprende 25 especies y seis subespecies, de las cuales las más frecuentemente detectadas en enfermedades humanas son *Campylobacter jejuni* (subespecies *jejuni*) y *Campylobacter coli*. Las bacterias *Campylobacter* son una de las principales causas de las enfermedades diarreicas de transmisión alimentaria del ser humano y las bacterias más comunes causantes de gastroenteritis en el mundo entero (OMS, 2011).

La campilobacteriosis es una zoonosis de distribución mundial, causada por *Campylobacter spp.* el cual se halla habitualmente como comensal del tracto gastrointestinal de animales domésticos y salvajes, entre los cuales las aves de corral constituyen el principal reservorio y vehículo de transmisión del patógeno. Muchos casos de enteritis humana por *Campylobacter spp.* han sido asociados al contacto con animales o al consumo de agua contaminada, de leche cruda o de alimentos de origen animal parcialmente cocidos (Tamborini *et al.*, 2012).

En los últimos años, las especies termotolerantes de *Campylobacter* han emergido como una causa común de diarrea en los seres humanos (Tresierra *et al.*, 1995). La infección gastrointestinal por *Campylobacter spp.* supera en algunos países la producida por *Salmonella spp.* o *Shigella spp.* En la mayoría de los casos es una diarrea de corta duración, clínicamente moderada, autolimitada y tratada con medidas de soporte (González & Alonso, 2013).

La dosis infectante es de 10<sup>4</sup> microorganismos, los cuales se multiplican en el intestino delgado, destruyen la mucosa intestinal, invaden el epitelio y producen inflamación con infiltración de leucocitos en la lámina propia, y se puede observar la presencia de leucocitos en las heces en 25 a 80% de los casos y posee un periodo de incubación de 2 a 10 días (Orrego *et al.*, 2014).

La mayor parte de las personas infectadas con *Campylobacter spp.* se recuperan sin ningún tratamiento médico, excepto en casos severos y en pacientes inmunocomprometidos, en donde se hace necesaria la aplicación de antimicrobianos (Nachamkin *et al.*, 2000).

En el tratamiento antimicrobiano de la campilobacteriosis cabe destacar que *Campylobacter spp.* es sensible a diversas clases de antibióticos, incluido macrólidos, especialmente eritromicina, y quinolonas como ciprofloxacina, siendo estos fármacos considerados de primera línea a la hora de aplicar el tratamiento clínico (Rivera *et al.*, 2011). Sin embargo, en los años recientes, la emergencia de resistencia a estos grupos de antimicrobianos ha complicado su tratamiento empírico (Arestrup, 2001). Hay trabajos científicos que consideran que la resistencia bacteriana a antimicrobianos se debe principalmente al excesivo uso de los mismos en seres humanos. Como asociación a esta situación, el incremento de la resistencia de *Campylobacter spp.* a quinolonas en los reservorios animales puede conducir a fallos en el tratamiento de las diarreas producidas por estos microorganismos en el hombre. Para reducir la resistencia de *Campylobacter spp.* a fluoroquinolonas se ha recomendado no utilizar estos antimicrobianos en animales con fines profilácticos (Rivera *et al.*, 2011). La determinación precisa de la susceptibilidad *in vitro* de *Campylobacter spp.*, es de vital importancia para garantizar una terapia antimicrobiana adecuada de los pacientes con formas graves de la enfermedad y, también, para el monitoreo eficaz de la resistencia a los antimicrobianos en *Campylobacter spp.* a nivel mundial (Lehtopolku *et al.*, 2012).

Al analizar que en el país no existe mucha información acerca de la resistencia que presenta el género *Campylobacter* y que la misma ha aumentado significativamente durante los últimos años por el uso excesivo de estos tanto en tratamiento de humanos como en profilaxis de animales de granja y de compañía. El presente estudio pretende dar a conocer la distribución ecológica y la actividad antimicrobiana de cepas de *Campylobacter jejuni* y de *Campylobacter coli* resistentes a fluoroquinolonas y establecer su frecuencia de aislamiento en centros de cuidado materno infantil de la ciudad de Loja.

## **CAPÍTULO 1**

### **MARCO TEÓRICO**

## 1.1 *Campylobacter*

*Campylobacter* es un género de bacterias perteneciente a la familia *Campylobacteraceae*, que produce enfermedades diarreicas y generalizadas a los seres humanos, además figura entre las causas más difundidas de infección en el mundo. Afecta a varios millones de personas cada año, predominando en bebés menores de un año, adolescentes, adultos jóvenes y, en general, en aquellas personas que viven en condiciones sanitarias deficientes, ya que la malnutrición es un factor importante en la frecuencia y gravedad de esta infección (Brooks *et al.*, 2014).

## 1.2 Reservorios de *Campylobacter*

Muchos casos de enteritis humana por *Campylobacter spp.* han sido asociados al contacto con animales o al consumo de agua contaminada, de leche cruda o de alimentos de origen animal parcialmente cocidos (Tamborini *et al.*, 2012).

Se reconoce como reservorio natural a una gran variedad de animales tanto domésticos como de vida silvestre, tales como ganado vacuno, cerdos, ovejas, aves de corral, cabras, perros, gatos y roedores, entre otros (Cervantes & Cravioto, 2007).

Estudios han señalado la manipulación de aves de corral y al consumo de productos obtenidos de estas como factores de riesgo importante, responsables de un porcentaje variable de los casos. Además, se ha identificado la contaminación cruzada por *Campylobacter* en los alimentos preparados como un factor de riesgo (FAO, 2009). Se calcula que un 50% a 70% de los casos de diarreas en humanos, al menos en países industrializados, se asocia con la ingesta de pollo o se deben a contaminación cruzada entre la carne de éstos y otros alimentos; incluso se ha demostrado que *Campylobacter* puede sobrevivir varias horas, entre los surcos de las tablas utilizadas para picar y cortar alimento (Rojas *et al.*, 1996).

## 1.3 Clasificación taxonómica

La familia *Campylobacteraceae* está compuesta por los géneros *Arcobacter* y *Campylobacter* los cuales agrupan a báculos gram negativos curvos de carácter zoonótico que poseen una amplia distribución en la naturaleza (Fernández *et al.*, 2007). En el género *Campylobacter* se incluyen: *Campylobacter fetus* (*C. fetus* subsp *fetus* y *C. fetus* subsp

*venerealis*), *Campylobacter coli*, *Campylobacter hyointestinales* (*C. hyointestinales* subsp *hyointestinalis* y *C. hyointestinales* supsp *lawsonni*), *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni* subsp *jejuni* y *C. jejuni* subsp *doylei*), *Campylobacter lari*, *Campylobacter sputorum* (*C. sputorum* subsp *bubulos* y *C. sputorum* subsp *fecalis*) y *Campylobacter upsaliensis* (Vilar M, 2007).

Aunque existen varias especies que pueden causar enfermedad en los seres humanos, la mayor parte de los casos de campilobacteriosis son producidos por el grupo de los denominados "*Campylobacter* termófilos", los cuales se caracterizan por su capacidad para crecer a temperaturas de incubación de 42° C (García *et al.*, 2006).

### 1.3.1 Especies termófilas.

Son aquellas capaces de crecer a 42 - 43°C pero no a 25°C, comprende *C. jejuni* (subespecies *jejuni* y *doylei*), *C. coli*, *C. lari* y *C. upsaliensis*. De este grupo, *Campylobacter jejuni* (subespecie *jejuni*) es el agente causal de diarreas, siendo considerado el más virulento por su mayor resistencia a la fagocitosis; mientras la diarrea que produce el *C. coli*, se considera más benigna (Farace & Viñas, 2007).

*C. jejuni* es uno de los microorganismos más comunes en los casos esporádicos de enteritis bacteriana en los países desarrollados, siendo una de las principales causas de toxiinfecciones alimentarias a nivel mundial, con mayor tasa de incidencia en niños y adultos jóvenes (Vilar, 2007). *C. jejuni* carece de fimbrias y se ha demostrado que elementos estructurales como el flagelo, algunas proteínas de membrana externa y el lipopolisacarido actúan como adhesinas que le permiten fijarse a la célula epitelial y al muco intestinal. La forma curva y el movimiento típico en "sacacorcho" de *Campylobacter*, como también la atracción quimiotáctica que ejerce el muco intestinal sobre la bacteria, facilitan el contacto de ésta con el epitelio (Fernández, 2008).

En estos últimos años *C. coli* es reconocido como agente de diarrea entre el 5 y el 10% de todos los casos por *Campylobacter*. Sin embargo, en Sudamérica, *C. coli* ha sido aislado con mayor frecuencia, representando cerca del 25% de los casos de diarrea producidos por especies del género (Fernández, 2011). No existen grandes diferencias entre *C. coli* y *C. jejuni* en lo que respecta a su patogenicidad, composición antigénica, características epidemiológicas relacionadas con los mecanismos de transmisión y su distribución en animales (Fernández, 2008). Estas especies colonizan con mayor frecuencia el tracto

intestinal de las aves de corral, bovinos, cerdos, ovejas, cabras, perros y gatos (Gutiérrez, *et al.*, 2015).

La infección por *C. lari* fue descrita por primera vez en 1980 en la que se aisló el microorganismo de gaviotas del género *Larus* (Skirrow & Benjamin, 1980). El organismo fue nombrado *Campylobacter laridis* en 1983 y el nombre fue cambiado a *C. lari* en 1990. El principal reservorio de *C. lari* es gaviotas, gallinas, otras aves y algunos mamíferos domésticos, aunque no parece causar infección evidente en estos animales (Werno *et al.*, 2002).

*C. upsaliensis* se encuentra con frecuencia en gatos y perros, independientemente si los animales están enfermos o sanos (prevalencia, 66% en gatos vs 48% en perros). Se ha postulado que estos animales son la principal fuente de *C. upsaliensis* que produce la enfermedad en los seres humanos, sin embargo, no se ha establecido un enlace definitivo (Labarca *et al.*, 2002). En el hombre produce diarrea y bacteremia en niños y adultos inmunocompetentes e inmunocomprometidos. Sus mecanismos de patogenicidad aún no están definidos aunque se le reconoce capacidad de adherencia a células de origen endotelial. Su frecuencia real de aislamiento en procesos infecciosos del hombre y su distribución ecológica, tanto en diferentes países como en animales no se conocen (Fernández, 2008).

#### **1.4 Epidemiología**

La campilobacteriosis es una zoonosis de distribución mundial que afecta mayoritariamente los países en vías de desarrollo. Esta bacteria constituye la principal causa de gastroenteritis en el hombre, por delante incluso de los géneros *Salmonella* y *Shigella*. (Alvarez, 2007). Según reportes de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), durante 1996, 46% de las gastroenteritis bacterianas comprobadas por cultivo en Estados Unidos tuvieron como agente etiológico a *Campylobacter spp.* (García *et al.*, 2009).

El *C. jejuni* es la especie más frecuentemente aislada, tanto en los países en vías de desarrollo como en los países industrializados y, en los últimos, *C. coli* es reconocido como agente de diarrea entre el 5 y el 10% de todos los casos de diarrea por *Campylobacter*. Sin embargo, en Sudamérica, el *C. coli* ha sido aislado con mayor frecuencia, representando cerca del 25% de los casos de diarrea producidos por especies del género. En vista que en la región, *C. coli* ha sido aislado a partir de agua de río, de hígados de pollo para consumo humano y de diversos reservorios animales. Tanto domésticos como silvestres, incluyendo especies de la fauna amazónica, materia fecal de pollos, carne de aves y aguas servidas, es

posible que exista una vinculación del medio ambiente y el consumo de alimentos con la mayor frecuencia de aislamiento de *C. coli* como agente de diarrea en esta región. Probablemente, el estado de portador sano de *Campylobacter* en países de América del Sur se relaciona con aspectos ligados a bajas condiciones de saneamiento básico, las que pueden promover mayores oportunidades de transmisión de las especies diarrogénicas de *Campylobacter*, especialmente a niños de corta edad, desde sus reservorios y fuentes de contaminación (Fernández, 2011).

En Chile en estudios realizados hace 20 años en las ciudades de Concepción, Valparaíso y Santiago, este agente ocupaba el tercer lugar entre las diarreas agudas de causa bacteriana en niños menores de dos años de edad (Prado *et al.*, 1985).

### **1.5 Morfología y características fisiológicas**

El género *Campylobacter* comprende bacilos Gram negativos curvos, espiralados o con forma de “S” itálica, con un tamaño que varía entre los 0,2 a 0,9  $\mu\text{m}$  de ancho y 0,5 a 5  $\mu\text{m}$  de largo. Son móviles por flagelación monótrica o anfítrica, que le proporciona un movimiento característico, con giros rápidos sobre su propio eje en forma de sacacorchos, característica por la cual su presencia puede ser distinguida de otras bacterias, por microscopía de contraste de fase (Jara, 2006). No son esporoformadores, en cultivos viejos, aireados y en condiciones subóptimas, toman forma esférica o cocoide. En agar selectivo tienen apariencia húmeda y son de color gris, blanco – gris, cremoso (Alvarez, 2007).

Las características de cultivo son muy importantes para el aislamiento y la identificación de *Campylobacter*, se necesitan de medios selectivos y una atmósfera microaerófila (5-10% de oxígeno). Todas las especies son capaces de desarrollarse a 37°C, pero *C. jejuni* tiene una temperatura óptima de crecimiento de 42°C, por lo que es práctica habitual en el laboratorio la incubación a esta temperatura con el fin de facilitar el aislamiento selectivo del principal patógeno humano del género (Mendez & Cols, 2003). Son quimioorganotróficos, no utilizan los hidratos de carbono como fuente principal de energía, siendo los aminoácidos u otros compuestos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, necesarios para su desarrollo. Además son oxidasa positivos y catalasa positivos o variables (Jara, 2006).

## 1.6 Patogenia y factores de virulencia

La infección se adquiere por vía oral proveniente de alimentos, bebidas o por el contacto con animales infectados o productos animales. *C. jejuni* es susceptible al ácido gástrico y por lo general se necesita la ingestión de aproximadamente  $10^4$  microorganismos para producir la infección (Brooks *et al.* 2014).

Afecta al hombre, causando diarrea y otras enfermedades como septicemia, meningitis o complicaciones, como artritis reactivas y el Síndrome de Guillian-Barré (GBS). Los síntomas generalmente se presentan después de un período de incubación de 1 a 7 días y la severidad varía desde diarrea acuosa a sanguinolenta, con fiebre y calambres abdominales (Lapierre, 2013).

La enfermedad gastrointestinal por *C. jejuni* se caracteriza por la aparición de una lesión histológica en la superficie mucosa del yeyuno, íleon y colon. Esta superficie mucosa aparece ulcerada, edematosa y hemorrágica, con abscesos en las criptas de las glándulas epiteliales e infiltración de la lámina propia por neutrófilos, células mononucleares y eosinófilos. El proceso inflamatorio es compatible con la invasión del tejido intestinal por los microorganismos. Aún no se ha podido establecer el papel preciso de las toxinas citopáticas, las enterotoxinas y la actividad endotóxica que se han detectado en las cepas de *C. jejuni*. Por ejemplo, las cepas que carecen de actividad enterotóxica continúan conservando toda su capacidad de virulencia. Se ha descrito una adhesina que interviene en la unión de los microorganismos a la capa mucosa; las cepas carentes de adhesina, al igual que las inmóviles, son avirulentas (Hernandez & Hernández, 2007).

La instalación de *C. jejuni subsp. jejuni* en el tracto intestinal depende tanto de los mecanismos de patogenicidad de la bacteria como de los mecanismos defensivos del huésped y de la dosis infectante, sugiriendo que en la infección por *Campylobacter* pueden aparecer diferencias en la susceptibilidad individual al microorganismo como también variaciones en la virulencia de la cepa infectante. La invasividad, la producción de enterotoxina y de citotoxinas son los tres determinantes principales de virulencia reconocidos el *C. jejuni subsp. jejuni*. La capacidad de adherencia al epitelio intestinal ha sido propuesta como un cuarto factor de virulencia en estas bacterias (Fernandez *et al.*, 1996).

### 1.6.1 Motilidad y quimiotaxis.

La motilidad de *Campylobacter* es proporcionada por un flagelo polar compuesto de flagelina glicosilada, que es pieza clave en la aproximación y adherencia a las células del epitelio intestinal. Este hecho se demostró por la inhabilidad de mutantes no flagelados de *C. jejuni* para colonizar el intestino de animales de experimentación (Klotz *et al.*, 2013).

En el *Campylobacter spp.* el flagelo no solo interviene en la movilidad de la bacteria, sino también en la colonización de hospedadores y en la patogénesis. Está constituido mayoritariamente por una proteína denominada flagelina, cuyo locus está formado por dos genes en tándem: flaA y flaB, los cuales poseen una homología del 95% entre sus secuencias de ADN. El gen flaA codifica para la flagelina, mientras que el gen flaB constituye una “reserva genética” de variación, con la que flaA podría, mediante recombinación, variar su secuencia y por tanto evadir la respuesta inmune del hospedador (Perez, 2014).

Asimismo, la glicosilación de la flagelina podría dar mayor fuerza, rigidez y carga al flagelo, facilitando el paso a través de la capa viscosa de mucina. Como en otras bacterias, la motilidad de *Campylobacter* es regulada por señales quimiotácticas que le permiten seguir un gradiente favorable en el medio en el que se encuentra. Estudios con una cepa mutante de *C. jejuni* no quimiotáctica revelaron una reducción en la colonización del hospedador, indicando que el correcto reconocimiento de los parámetros ambientales vía sistema quimiosensores es crítico para una efectiva colonización y crecimiento in vivo (Jurado, 2014).

### 1.6.2 Adherencia.

Para invadir al hospedador *Campylobacter* debe cruzar la pared celular y así adherirse a las células epiteliales, lo cual provoca daño en las mucosas e inflamación. Se han propuesto muchos factores como posibles adhesinas de *Campylobacter*, pero todos los estudios parecen indicar que realmente son el flagelo y otros lipopolisacáridos de membrana los que propician la adhesión. Se ha especulado sobre la producción de fimbrias, pero en el genoma de la cepa tipo de *C. jejuni* no se ha encontrado claramente ningún gen candidato (Hernandez & Hernández, 2007).

El flagelo se requiere para la colonización, la virulencia y la invasión de las células epiteliales, y también actúa como un aparato de secreción para antígenos de invasión; el

sistema N-glicosilación modifica algunas proteínas periplásmicas y de membrana externa. El N-glicano es importante para la colonización, la adherencia y la invasión de células epiteliales, pero el papel de este glicano en estos procesos aún no es completamente claro. También se ha descrito que entre las cepas de *C. jejuni* se conserva un antígeno de superficie (PEB1) que parece ser la adhesina principal y que se considera un candidato para el desarrollo de una vacuna (Castro *et al.*, 2013).

### **1.6.3 Producción de toxinas.**

Un factor de virulencia muy importante es la toxina distendente citoletal (CDT por sus siglas en inglés cytolethal distending toxin), que consta de tres subunidades: CdtA, CdtB, y CdtC. Al parecer la CdtA y la CdtC se unen a un receptor desconocido en la superficie de la célula hospedera; la CdtB, mediante un transporte activo, es llevada al núcleo en el cuál la toxina rompe la doble cadena de DNA y detiene el ciclo celular, por lo que la CdtB puede actuar como una DNasa para causar daño directamente al DNA (Castro *et al.*, 2013).

El conjunto de enzimas que posee *Campylobacter* también es importante en la supervivencia de la bacteria dentro de un huésped. Se resaltan la superóxido dismutasa y la catalasa, que protegen a la bacteria de fenómenos oxidativos al transformar compuestos tóxicos del oxígeno (Klotz *et al.*, 2013).

### **1.6.4 Síndrome de Guillain-Barré.**

Se conoce como síndrome de Guillain-Barré (SGB) a una serie heterogénea de neuropatías periféricas de alivio espontáneo mediadas inmunológicamente. El hallazgo común en ellas es la polirradiculoneuropatía de evolución rápida que se desencadena casi siempre después de un proceso de tipo infeccioso. Se manifiesta frecuentemente con parálisis motora simétrica, con o sin pérdida de la sensibilidad, y en ocasiones con alteraciones de tipo autonómico. La debilidad de los músculos se agrava al máximo en las dos o tres semanas posteriores al inicio del cuadro y la recuperación parcial o total ocurre en semanas o meses (Romano *et al.*, 2007).

El SGB que ocurre después de la infección por *C. jejuni* es generalmente más grave relacionada con una extensa lesión axonal. También se asocian a una mayor probabilidad de necesidad de ventilación mecánica y un mayor riesgo de daño neurológico irreversible. El riesgo de desarrollar SGB se incrementa después de la infección con ciertos serotipos de *C. jejuni*. En los Estados Unidos el tipo O:19 es más comúnmente asociado con SGB, en

Sudáfrica, el tipo O:41 se reporta con frecuencia con SGB. En contraste, la gravedad de la infección por *C. jejuni* no está asociado con un mayor riesgo del desarrollo de SGB. Aunque las infecciones por *C. jejuni* son comunes en la población general, el riesgo de desarrollar SGB después de la infección *C. jejuni* es en realidad muy bajas (1 en 1.000 pacientes desarrolla SGB después de la infección *C. jejuni*) lo que sugiere que los factores genéticos del huésped están involucrados en desarrollar la enfermedad (Nyati & Nyati, 2013).

No se conoce con exactitud la patogenia del síndrome, se piensa que el organismo infeccioso induce una respuesta inmunológica, tanto de origen humoral como celular, que debido a la forma homóloga de sus antígenos con los del tejido neuronal a nivel molecular, produce una reacción cruzada con componente gangliósido de la superficie de los nervios periféricos (Romano *et al.*, 2007).

### **1.7 Manifestaciones clínicas**

Las infecciones gastrointestinales por *C. jejuni*, *C. coli* y *C. upsaliensis* cursan generalmente como una enteritis aguda con diarrea, malestar general, fiebre y dolor abdominal, aunque las consecuencias clínicas de la infección son variables, dependiendo del sistema inmunitario del huésped. El principal síntoma de la infección en humanos es una enterocolitis aguda, indistinguible de otras gastroenteritis agudas. Los pacientes afectados pueden tener 10 o más deposiciones al día durante el periodo de máxima actividad de la enfermedad (Hernandez & Hernández, 2007). La diarrea normalmente se desarrolla poco después de la aparición del dolor abdominal y varía significativamente desde una presentación leve no inflamatoria, hasta una acuosa grave y sanguinolenta. La infección dura en promedio siete días en individuos inmunocompetentes. Las características clínicas de la enfermedad presentan dos tipologías: una que inicia con síntomas similares a una gripa y termina con diarrea y la otra que se manifiesta directamente como diarrea (Klotz *et al.*, 2013).

El dolor abdominal severo puede llegar a confundirse con una peritonitis aguda. Ocasionalmente estos pacientes, principalmente adolescentes y adultos jóvenes, pueden desarrollar una peritonitis de una apendicitis aguda, pero en la mayoría de éstos se observa una inflamación del íleon y el yeyuno con adenitis mesentérica. Puede haber complicaciones locales como la colecistitis, pancreatitis y peritonitis (Cervantes & Cravioto, 2007).

La dosis infectiva parece influir en la duración del periodo de incubación y del proceso patológico. Pese a ser una enfermedad de sintomatología autolimitada, debido al alto

número de casos anuales que produce, causa un importante coste económico, tanto en gasto médico como en horas perdidas de trabajo (Perez, 2014).

## **1.8 Diagnóstico de laboratorio**

Debido a la escasa resistencia de estas bacterias a condiciones ambientales hostiles, la tasa de aislamiento está muy influenciada por la técnica empleada, la naturaleza de la muestra, el número de microorganismos presentes en la misma y el estado fisiológico en que se encuentren (Hernandez & Hernández, 2007).

### **1.8.1 Microscopía.**

El *Campylobacter* spp. es un bacilo gramnegativo, curvo o en forma de S o gaviota de 0,2 - 0,9  $\mu\text{m}$  de ancho y 0,5 - 5  $\mu\text{m}$  de largo, no esporulado (Chanqueo *et al.*, 2005).

El primer paso en la identificación de las posibles cepas de *Campylobacter* es la tinción de Gram; sin embargo, esta bacteria no se tiñe bien con la safranina, por la que ésta se sustituye por fucsina fenicada o también se puede teñir con la tinción de Hucker que es mucho más eficaz para identificarlos en el microscopio. Con estas tinciones se observan bacilos pequeños, curvados en forma de C o de S, monotricos bipolares.

### **1.8.2 Cultivos.**

Para el aislamiento a partir de materias fecales, los medios de cultivo selectivos más comunes se basan en agar sangre y antibióticos; los más usados son Skirrow, Butzler y Campy-BAP. Los caldos de enriquecimiento no suelen ser necesarios ya que los individuos enfermos excretan grandes cantidades de bacterias ( $10^6$  -  $10^9$ ) por gramo de materia fecal (Mendez & Cols, 2003).

En ocasiones, y con el fin de recuperar las bacterias que pudieran encontrarse en condiciones subletales a causa del procesado de la muestra, tales como refrigeración o congelación, esta debe ser sometida a un preenriquecimiento en caldo nutritivo no selectivo durante un periodo corto de tiempo el mismo que puede ser de 2 a 4 horas a 37°C en condiciones de aerobiosis (Hernandez & Hernández, 2007).

Se han desarrollado varios medios selectivos para el aislamiento de *C. jejuni* y *C. coli*, tales como Skirrow, Butzler, Blaser, Preston, etc., los cuales favorecen el crecimiento de estas

dos especies sobre otras del mismo género y en general sobre la microbiota acompañante. El efecto selectivo de dichos medios se da por la adición de antibióticos (suplemento selectivo) como la vancomicina, trimetoprim, polimixina B, anfotericina, cefalotina, actidiona, colistina y rifampicina. Además de lo anterior el medio debe contener sustancias que estimulen el crecimiento y conservación de *Campylobacter* tales como sulfato ferroso, metabisulfito de sodio, piruvato de sodio, cisteína, hematina, sangre de caballo y extracto de levadura (Klotz *et al.*, 2013).

### **1.8.3 Identificación molecular.**

El descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la clonación, la secuenciación y la tecnología de detección por fluorescencia, así como la accesibilidad a una gran cantidad de información en la web ayudó al desarrollo de nuevas herramientas moleculares, cuyo uso ha aumentado enormemente la habilidad para detectar y cuantificar bacterias patógenas en agua y alimentos, entre estas, muchas bacterias emergentes, como por ejemplo; *Escherichia coli* O157, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter spp.*, las cuales han representado una seria amenaza para la salud pública mundial. La segunda generación de métodos moleculares para la detección e identificación de géneros y especies son la PCR, la PCR múltiplex, la secuenciación de genes específicos, el análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado, entre otros (Palomino & González, 2014).

#### **1.8.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

La PCR se basa en el mecanismo de la replicación in vivo del ADN: el ADN bicatenario se desenrolla y pasa a ADN monocatenario, se duplica y se vuelve a enrollar. Esta técnica consiste en ciclos repetitivos de:

- Desnaturalización del ADN por fusión a temperatura elevada, a fin de convertir el ADN bicatenario en ADN monocatenario;
- Unión (anillamiento) de dos oligonucleótidos, utilizados como cebadores, al ADN diana;
- Extensión de la cadena de ADN por adición de nucleótidos a partir de los cebadores utilizando ADN polimerasa como catalizador, en presencia de iones  $Mg^{2+}$  (Somma & Querci, 2009).

## 1.9 Tratamiento

Generalmente no se requiere tratamiento, excepto la reposición de electrolitos y la rehidratación. El tratamiento antimicrobiano (eritromicina, tetraciclina, quinolonas) está recomendado en casos invasivos (cuando las bacterias invaden las células de la mucosa intestinal y dañan los tejidos) o bien para suprimir la condición de portador (es decir, cuando una persona es portadora de *Campylobacter* en su organismo y sigue diseminando las bacterias sin padecer los síntomas de la enfermedad (OMS, 2011).

### 1.9.1 Resistencia a antimicrobianos.

El amplio y extendido uso de antibióticos como aditivos en la alimentación animal pudo contribuir al desarrollo de poblaciones de bacterias patógenas para el hombre que sean resistentes a drogas usadas en el tratamiento de infecciones. Esta preocupación hizo que en los años 70 se empezasen a prohibir algunos antibióticos como promotores de crecimiento: tetraciclinas y penicilinas en 1976 y oleandomicina en 1979. En 1998 se prohibió el uso como promotores de crecimiento de la bacitracina y la avoparcina y un año después la espiromicina y la virginiamicina. Finalmente en 2005, fueron prohibidos la avilamicina y el flavofosfolipol (Castanon, 2007).

La mayoría de estudios de resistencias de cepas de *Campylobacter spp.* aisladas en aves se centran en la especie *C. jejuni*, ya que es la principal especie aislada en carne de pollo. Estos estudios hacen hincapié en aquellos antibióticos que pueden interferir en el tratamiento de campilobacteriosis en el hombre, es decir, quinolonas y macrólidos y en menor número las tetraciclinas (Perez, 2014).

#### 1.9.1.1 Quinolonas.

Las quinolonas constituyen una familia de antibióticos bactericidas contra microorganismos grampositivos y gramnegativos, de amplio espectro, bloquean la duplicación bacteriana del DNA, al inhibir la topoisomerasa bacteriana II (DNA-girasa) y la topoisomerasa IV. Por su amplio espectro son de elección para iniciar un tratamiento empírico, sin embargo, a pesar de su eficacia, no siempre constituyen el antibiótico de primera elección, ya que inducen resistencia de los microorganismos a las quinolonas, lo que da lugar a una pérdida de su utilidad clínica (Campos *et al.*, 2008). En el caso de *Campylobacter*, los porcentajes de resistencia no solo se han mantenido estables, sino que han aumentado. La resistencia a quinolonas en *Campylobacter*, se produce de forma rápida y persistente observándose un

aumento en la concentración mínima inhibitora a este antibiótico (por ejemplo, de 0.25 µg/ml a 32 µg/ml) tras tratamiento con fluoroquinolonas (Zhao *et al.*, 2010).

### **1.9.1.2 Macrólidos.**

Los macrólidos son una amplia familia de antibióticos naturales y semisintéticos obtenidos a partir de productos metabólicos del *Streptomyces spp.* La eficacia de este grupo de fármacos contra infecciones humanas de creciente importancia ha estimulado el desarrollo de miembros con superior actividad antibacteriana, ventajas farmacocinéticas con respecto a la eritromicina y escasos efectos colaterales (Lucas *et al.*, 2007).

Los macrólidos se unen de forma reversible al dominio V del ARN ribosómico 23S. La unión se realiza mediante la formación de puentes de hidrógeno entre diferentes radicales hidroxilo del macrólido (especialmente entre el OH en posición 2' del azúcar desosamina) y determinadas bases del ARNr. Los macrólidos desarrollan una actividad antibacteriana lenta, predominantemente dependiente del tiempo y con efecto postantibiótico (EPA). La actividad se considera bacteriostática contra la mayoría de los microorganismos. Sin embargo, a concentraciones elevadas, en medio alcalino y/o frente a determinados microorganismos como *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*, especialmente cuando se hallan en fase de crecimiento logarítmico, pueden comportarse como bactericidas (Cobos *et al.*, 2009).

La resistencia a macrólidos en especies de *Campylobacter* es principalmente una consecuencia del uso de antimicrobianos en la producción de alimentos de origen animal. La infección con cepas de *Campylobacter spp.* resistentes a macrólidos se ha asociado con un riesgo mayor de enfermedad invasora o muerte comparado con la infección por cepas sensibles (González & Alonso, 2013).

**CAPÍTULO 2**  
**METODOLOGÍA**

## 2.1 Recolección de muestras

Se analizó un total de 127 muestras fecales obtenidas de los centros de cuidado materno infantil de la ciudad de Loja, en niños de edades que comprendían entre 0 – 4 años, las mismas se llevaron al laboratorio de Microbiología Clínica de la Universidad Técnica Particular de Loja para su posterior procesamiento.

## 2.2 Procesamiento de muestras

### 2.2.1 Siembra en medios selectivos.

La siembra se realizó directamente de las muestras fecales en medio base suplementado con 5 % de sangre y antibiótico Butzler (**Anexo 1**). A la par de la siembra se filtró las muestras diluyéndolas en suero fisiológico y colocando sobre filtros de membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm para eliminar la flora bacteriana acompañante.

La incubación se realizó en una atmósfera de microaerofilia que es dotada por sobres de anaerobiosis CampyGen™ 2,5L y temperatura de 42°C, e incubadas durante 48 horas.

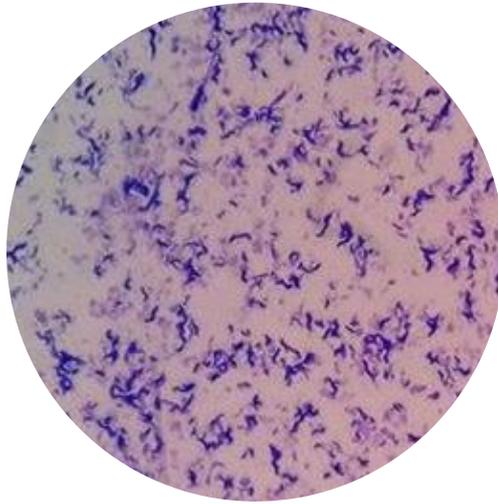
### 2.2.2 Identificación macroscópica y microscópica de las muestras presuntivas.

Una vez culminado el tiempo de incubación se analizó que en el cultivo existan colonias características las cuales son brillantes, planas, de un color translucido y que sigan la línea del estriado (**Figura 1**). Para confirmar las colonias se realizó la Tinción de Hucker (**Anexo 3**) y se procedió a observar en el microscopio en el cual se debe observar que sean bacilos curvos en forma de “s” o de alas de gaviota (**Figura 2**).



**Figura 1. Colonias puras de *Campylobacter* spp. en medio selectivo butzler**

Fuente: La autora



**Figura 2. *Campylobacter* spp. observado en lente de 100x**

**Fuente:** La autora

### **2.2.3 Identificación bioquímica.**

Se realizó la prueba de hidrólisis del hipurato para la identificación de las especies de *C. jejuni* y *C. coli*. Las especies pertenecientes a *C. jejuni* tienen la capacidad para hidrolizar el hipurato de sodio a ácido benzoico y glicina por acción de la enzima hipuricasa que reaccionará con la Ninhidrina provocando un cambio de color **(Figura 10) (Anexo 4)**.

### **2.3 Determinación de resistencia a fluoroquinolonas.**

Se determinó la resistencia utilizando la técnica de difusión en agar en medio Mueller Hinton **(Anexo 6)**, utilizando los discos de ácido nalidíxico (NA-30µg), ciprofloxacina (CIP-5µg), eritromicina (ER-15 µg), gentamicina (GM-10 µg), ampicilina (AMP-10 µg) y amoxicilina más ácido clavulánico (AMC-20/10 µg) siguiendo las recomendaciones del EUCAST 2016.



**Figura 3. Antibiograma de colonias aisladas de *Campylobacter spp.***  
Fuente: La autora

#### **2.4 PCR - MULTIPLEX**

Se realizó la extracción de ADN de las muestras mediante el kit Wizard® Genomic DNA Purification (**Anexo 8**).

La PCR – Multiplex se realizó en un termociclador SimpliAmp Thermal Cycler con condiciones preestablecidas (**Tabla 4**). El producto fue corrido en gel de agarosa al 1,5 % (**Anexo 10**) y revelado en el equipo ENDURO™ GDS TOUCH Labnet.

Se hizo la interpretación dependiendo del peso molecular de cada especie.

**Tabla 1. Secuencias de primers utilizados para el ensayo de PCR – MULTIPLEX y tamaño de productos de PCR.**

<b>Especies</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Gen Diana</b>	<b>Primer</b>	<b>Secuencia (5' a 3')</b>
<i>Campylobacter</i>	816	16S rRNA	C412F	5'-GGATGACACTTTTTCGGAGC-3'
<i>Campylobacter hyointestinalis</i> subsp. <i>Hyointestinalis</i>	611	23S rRNA	C1228R* HYO1F	5'-CATTGTAGCACGTGTGTC-3' 5'-ATAATCTAGGTGAGAATCCTAG-3'
<i>C. coli</i>	502	<i>askf</i>	HYOFET23SR CC18F CC519R	5'-GCTTCGCATAGCTAACAT-3' 5'-GGTATGATTTCTACAAAGCGAG-3' 5'-ATAAAAGACTATCGTCGCGTG-3'
<i>C. fetus</i>	359	<i>cstA</i>	MG3F CF359R	5'-GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT-3' 5'-AGCCAGTAACGCATATTATAGTAG-3'
<i>C. lari</i>	251	<i>glyA</i>	CLF CLR	5'-TAGAGAGATAGCAAAAGAGA-3' 5'-TACACATAATAATCCCACCC-3'
<i>C. jejuni</i>	161	<i>Cj0414§</i>	C-1 C-3	5'-CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT-3' 5'-CCATAAGCACTAGCTAGCTGAT-3'
<i>C. upsaliensis</i>	86	<i>lpxA</i>	CU61F CU146R	5'-CGATGATGTGCAAATTGAAGC-3' 5'-TTCTAGCCCCTTGCTTGATG-3'

**Fuente:** (Yamazaki *et al.*, 2007).

**CAPITULO 3**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En el presente estudio se realizó el análisis de 127 muestras de niños de 0 – 4 años en centros de cuidado materno infantil de la ciudad de Loja, de las cuales se obtuvo que el 13,4% (17/127) de muestras eran positivas para *Campylobacter spp.* (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Frecuencia de aislamiento de *Campylobacter spp.* en muestras fecales de niños

3	N° de muestras	Porcentaje (%)
<b>Negativas</b>	110	86,6
<b>Positivas</b>	17	13,4
<b>Total</b>	127	100

**Fuente:** La autora

La campilobacteriosis es una enfermedad transmitida por alimentos muy común en el mundo, con gran impacto en América Latina, donde Argentina, Ecuador, Paraguay y Perú reportan las prevalencias más altas (Gutiérrez *et al.*, 2015).

Datos similares a nuestro estudio son los reportados en Perú 13,4%; México 15,7%; Chile 15,3% y Argentina 15,2%, en los cuales se informa que ha existido un aumento considerable durante los últimos años (Fernández *et al.*, 2008; Jara, 2006; Kaakoush *et al.*, 2015; Perales *et al.*, 2002; Tamborini *et al.*, 2012).

En países como Estados Unidos, Canadá y Sudáfrica los porcentajes son mayores presentando 28,9%, 36,9% y 31% respectivamente. Es importante señalar que en un estudio realizado en nuestro país en el año 1987 a niños de 1 – 24 meses encontraron que el 23% de casos estudiados eran positivo para *Campylobacter spp.* (Guarderian *et al.*, 1987; Kaakoush *et al.*, 2015).

Datos menores se han reportado en Uruguay en los cuáles se hizo el estudio a niños menores de 15 años que ingresaban a la unidad de internación de diarrea en el cual se reportó una frecuencia del 5,9%, en Colombia el porcentaje encontrado en el año 2006 reveló una infección con *Campylobacter* de 2,3% en niños menores de 5 años con diarrea, y en la ciudad de Loja se hizo el estudio en una entidad de salud en la cual se observó un porcentaje de 7% (Manrique *et al.*, 2006; Narvaez, 2015; Notejane *et al.*, 2015).

Por el porcentaje encontrado hay que tomar en cuenta el hecho de que eran niños de bajos recursos económicos por lo que estados de malnutrición y condiciones ambientales son factores importantes.

Se han identificado casos de portadores sanos en países de América del Sur en el cuál en el 2011 se informó que probablemente este hecho se relacione con aspectos ligados a bajas condiciones de saneamiento básico las que pueden promover mayores oportunidades de transmisión de las especies diarrogénicas de *Campylobacter*, especialmente a niños de corta edad, desde sus reservorios y fuentes de contaminación, mientras que en países desarrollados no es frecuente que existan casos de portadores asintomáticos(Fernández, 2011). En estos países en desarrollo se encuentra mayor frecuencia de aislamiento y presencia de especies *Campylobacter* entre los niños desnutridos lo cual podría estar relacionado con una alteración en la condición inmunológica. La malnutrición puede predisponer a la infección por un impacto negativo en la barrera de protección de la membrana mucosa intestinal y mediante la inducción de cambios en las funciones inmunes, ya que se da un deterioro de las células Ddull en los niños desnutridos y puede ser uno de los mecanismos implicados en la inmunodeficiencia en estos niños (Fernández *et al.*, 2008).

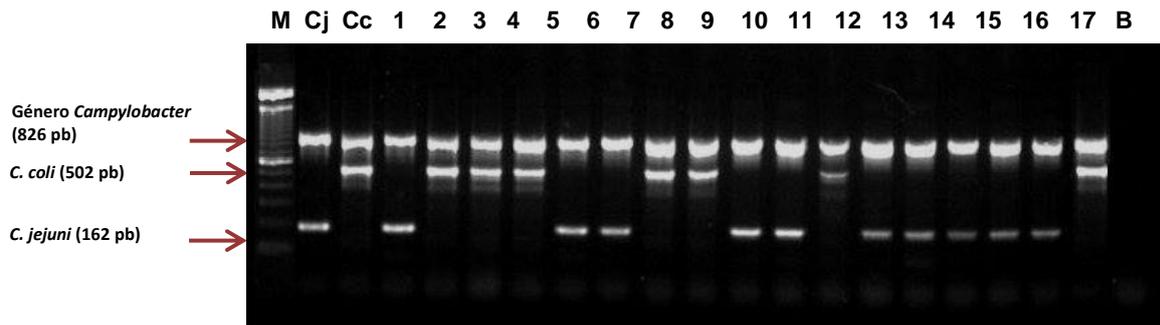
Un factor adicional que se ha planteado en la prevalencia de infecciones por *Campylobacter* es la inmunidad a nivel de población, en los países en desarrollo, donde la campilobacteriosis es endémica, la infección se limita generalmente a los niños y disminuye con la edad, lo que sugiere que la exposición temprana en la vida podría conducir al desarrollo de una inmunidad protectora. Esto podría reflejar qué infecciones asintomáticas son comunes en las naciones en desarrollo, lo que también podría tener un impacto en la transmisión de *Campylobacter* en estas regiones debido a la excreción asintomática (Kaakoush *et al.*, 2015).

Con base en el análisis de PCR (**Figura 4**) de las muestras analizadas se obtuvo que el 58,8% (10/17) corresponde a *C. jejuni* y 41,2% (7/17) a *C. coli* (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Frecuencia de aislamiento de especies de *Campylobacter*.

	Nº	Porcentaje (%)
<i>C. jejuni</i>	10	58,8
<i>C. coli</i>	7	41,2
<b>Total</b>	17	100

Fuente: La autora



M= Marcador de peso molecular; Cj= *C. jejuni*; Cc= *C. coli*; Muestras 1 – 17; B= Blanco

**Figura 4.** Especies de *Campylobacter*

Fuente: La autora

Clínicamente las especies de *Campylobacter* más importantes son los miembros del grupo que incluye termófilo *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, y *C. upsaliensis*, con *C. jejuni* responsable de la mayoría de los casos humanos, por lo cual se requiere una identificación precisa de estos organismos con el fin de decidir las medidas terapéuticas adecuadas, para entender la patología de la enfermedad, y para proporcionar datos clínicos y epidemiológicos para el control de la enfermedad (Wang *et al.*, 2002).

*C. jejuni* es la especie más frecuentemente aislada, tanto en los países en vías de desarrollo como en los países industrializados y, en estos últimos, *C. coli* es reconocido como agente de diarrea entre el 5 y el 10% de todos los casos ocasionados por *Campylobacter*. Sin embargo, en Sudamérica, *C. coli* ha sido aislado con mayor frecuencia, representando cerca del 25% de los casos de diarrea producidos por especies del género (Fernández, 2011).

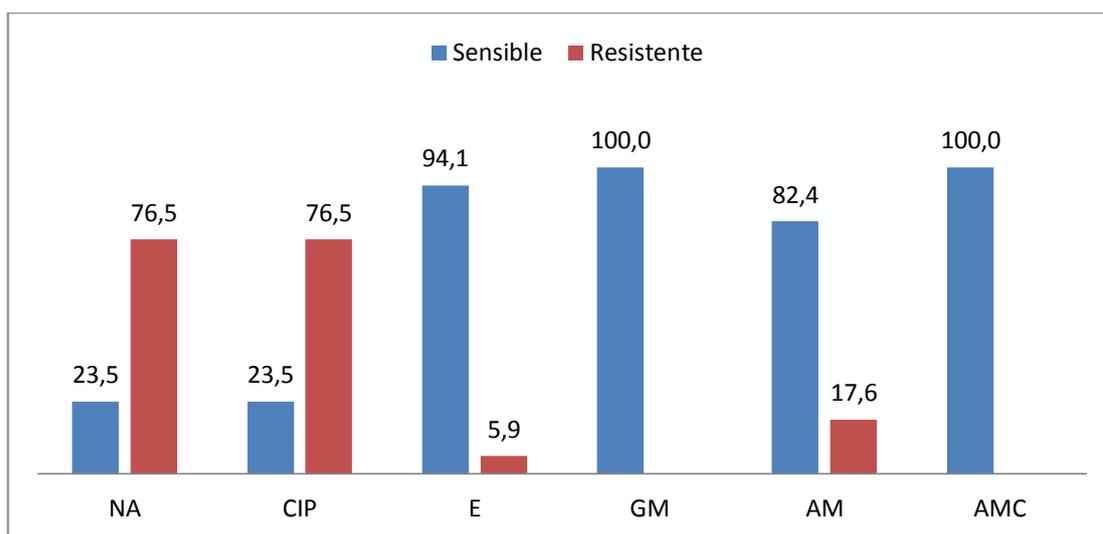
La especie *C. jejuni* presenta una mayor prevalencia en los aislamientos que se ha hecho en diferentes países, nuestro estudio tiene similitud a lo encontrado en nuestro país en el cual se reportó una incidencia del 66,7% de *C. jejuni* en comunidades tanto de zona rural como urbana y en estudios realizados en el sur de Irlanda en el cual *C. jejuni* es la especie predominante, representando el 66% del total de especies de *Campylobacter* detectadas (Kaakoush *et al.*, 2015; Vasco *et al.*, 2014).

Porcentajes mayores al presente estudio son los encontradas en Chile en donde de 70 muestras analizadas 87,1% (61) eran positivas para *C. jejuni* y en Argentina mostraron una incidencia del 96% en niños menores de 4 años (Jara, 2006; Tamborini *et al.*, 2012). Sin embargo datos reportados en otros países de Sudamérica demuestran porcentajes menores, en Perú 23,0%, Paraguay 18,4%, Colombia 14,4%, Uruguay 14,3%, Venezuela 13,0%, Bolivia 10,5% y Brasil con 9,6%. En Europa en un estudio realizado en Países bajos dio un porcentaje de 4,1% (Kaakoush *et al.*, 2015).

La especie de *C. coli* fue aislada en 41,2% (7/17) de los casos el cual muestra porcentajes similares a los estudios realizados en el país en el cual hubo un 33,3% de infecciones por esta especie (Vasco *et al.*, 2014), y en un estudio realizado en Bolivia en el año 2009 con un porcentaje de 30% (Orietta, 2009). Porcentajes menores se han reportado en estudios realizados en Argentina 4%, Chile 8,6%, Colombia 2,4%, Paraguay 0,6 %, Perú 11,9%. Brasil 6% (Kaakoush *et al.*, 2015; Pollett *et al.*, 2012; Tamborini *et al.*, 2012).

Por lo visto anteriormente *C. jejuni* sigue siendo la especie predominante a lo largo de los años aunque según los casos estudiados el *C. coli* va teniendo una mayor incidencia lo que preocuparía a la salud pública ya que hay que tener en consideración este punto porque una de las especies (*C. jejuni*) puede generar enfermedades de mayor riesgo si no son tratadas adecuadamente.

En el estudio de la actividad antimicrobiana en el género *Campylobacter* se encontró resistencia hacia quinolonas como ácido nalidixico y ciprofloxacino con 76,5 % y a eritromicina y ampicilina con 5,9% y 17,6% respectivamente (**Figura 5**).



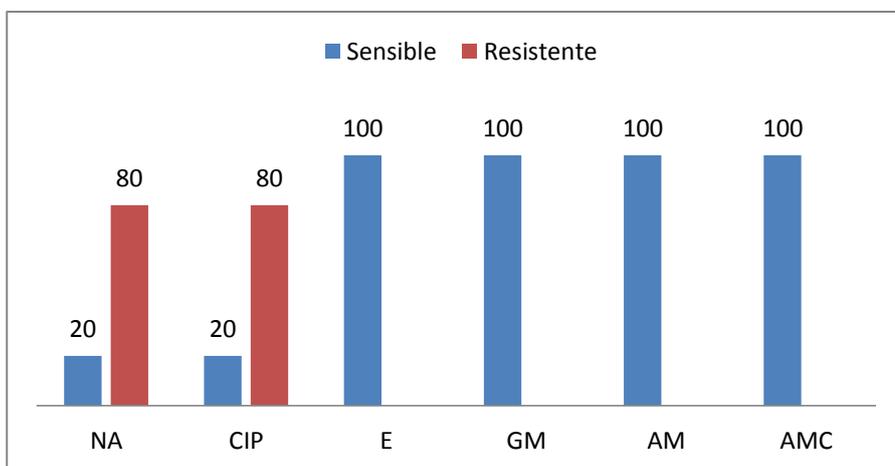
NA= Ácido nalidíxico; CIP= Ciprofloxacino; E= Eritromicina; GM= Gentamicina; AM= Ampicilina; AMC= Amoxicilina + Ácido clavulánico

**Figura 5.** Actividad antimicrobiana de 6 drogas frente al género *Campylobacter spp.*  
**Fuente:** La autora

En 1995, la incidencia de la resistencia a fluoroquinolonas en aislados de *Campylobacter* en Tailandia se informó un 84% y, en el período 1997-1998, la incidencia en España fue de 72%. La resistencia a las fluoroquinolonas también ha aumentado en los Estados Unidos, Reino Unido y los Países Bajos (Alfredson & Korolik, 2007). En países de América latina la

resistencia a quinolonas ha presentado datos significativos, en Brasil y Perú fue de 72,2% y 78% respectivamente. Datos menores al presente estudio se han encontrado en Argentina 59,6 %, Bolivia 47%, Chile 50% y Paraguay 49% (Tamborini et al., 2012).

La especie de *C. jejuni* presento resistencia del 80% hacia ácido nalidíxico y ciprofloxacino y sensibilidad a los demás antibióticos estudiados (**Figura 6**).

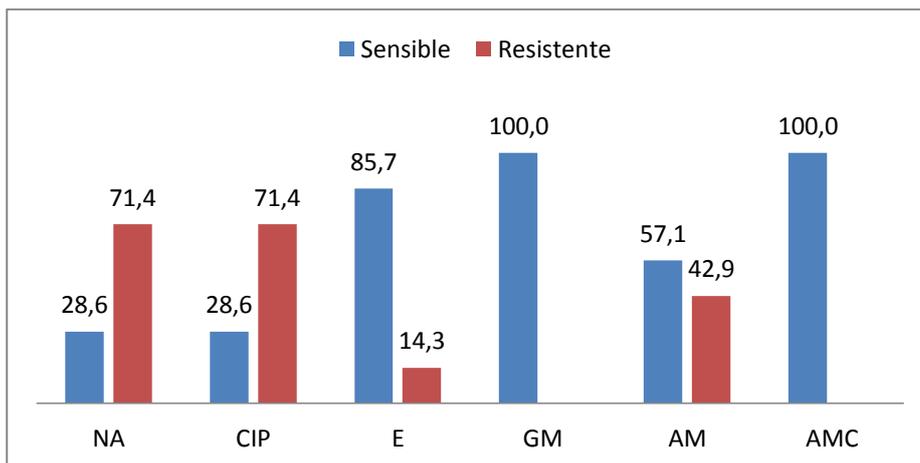


NA= Ácido nalidíxico; CIP= Ciprofloxacino; E= Eritromicina; GM= Gentamicina; AM= Ampicilina; AMC= Amoxicilina + Ácido clavulánico

**Figura 6.** Actividad antimicrobiana de 6 drogas frente a *C. jejuni*.  
**Fuente:** La autora

Porcentajes que son similares a los encontrados en Perú en el cual la resistencia aumentó del 42,1% en 2001 a 91,1% en 2010 hacia Ciprofloxacino (Pollett et al., 2012). En Bolivia al analizar muestras de hospitales determinaron que el 70,4% de muestras identificadas como *C. jejuni* eran resistentes a ciprofloxacino (Orietta, 2009). Porcentajes menores se han reportado en Argentina, en un estudio realizado en 2012 se encontró que presentaban un 65% de resistencia hacia Ciprofloxacino, mientras el 100% era sensible a eritromicina (Tamborini et al., 2012). En Chile en el 2011 se halló resistencia del 32,4 % hacia ciprofloxacino (García et al., 2009).

La especie *C. coli* presento resistencia hacia ácido nalidíxico, ciprofloxacino, eritromicina y ampicilina con un porcentaje de 71,4%, 14,3%, y 42,9 % respectivamente (**Figura 7**).



NA= Ácido nalidíxico; CIP= Ciprofloxacino; E= Eritromicina; GM= Gentamicina; AM= Ampicilina; AMC= Amoxicilina + Ácido clavulánico

**Figura 7.** Actividad antimicrobiana de 6 drogas frente a *C. coli*.  
Fuente: La autora

Porcentajes similares a un estudio realizado en Perú en el cual de las cepas aisladas de *C. coli* del 2006 al 2010 el 87,4% era resistente a ciprofloxacino y el 10% a eritromicina (Pollett *et al.*, 2012).

En muchos países la resistencia a eritromicina se asocia con mayor frecuencia a *C. coli* (68%) ya que su principal reservorio son los cerdos y estos son tratados con Tylosin (macrólido) como estimulante de crecimiento (Orietta, 2009). En Estados Unidos y países europeos la resistencia a macrólidos a aumentado de 18 a 80 % en aislados de pollos y cerdos, así mismo en Asia el 62% de *C. coli* aislados fueron resistentes a esta clase de antimicrobianos (Luangtongkum *et al.*, 2009).

La resistencia encontrada en fluoroquinolonas según estudios nos indican que se debe a una mutación existente en una subunidad de la DNA girasa (GryA) la cual juntas con la topoisomerasa IV son las responsables de la replicación, transcripción, recombinación y reparación del ADN. Las quinolonas forman un complejo que bloquea la funcionalidad de la enzima uniéndose a la subunidad GryA pero al existir la mutación en esta subunidad confiere un fenotipo de elevada resistencia hacia fluoroquinolonas en *C. jejuni* y *C. coli* (Hormeño, 2016). Así como también al uso indiscriminado de antimicrobianos ya sea en humanos como el uso de estos antimicrobianos en la industria avícola en reservorios animales, el consumo de carne mal cocida podría transmitir bacterias previamente resistentes (Orrego *et al.*, 2014).

El principal mecanismo de resistencia hacia macrólidos en *Campylobacter* se debe, como en otras bacterias, a la mutación del gen rRNA 23S, que está triplicado en el cromosoma de *Campylobacter*. En las cepas resistentes a la eritromicina, generalmente todas las copias tienen mutaciones asociadas a la resistencia a macrólidos (Hormeño, 2016).

En proporción con estos resultados, se ha descrito que las cepas de *C. coli* presentan resistencia a diversos antimicrobianos, especialmente macrólidos y fluoroquinolonas, más frecuentemente que los aislados de *C. jejuni*. Aunque no se conoce la causa de esta diferencia, una posible explicación sería la diferencia en la estabilidad a mutaciones o diferencias en la capacidad para intercambiar material genético entre distintas cepas (Ugarte, 2015).

En la presente investigación, la resistencia a ciprofloxacino se encontró en aislados de pacientes pediátricos en los cuales no se recomienda usar las fluoroquinolonas como tratamiento empírico de diarrea. Dada esta situación, la probabilidad de adquisición de este tipo de resistencia intra-tratamiento es escasa, y es más probable que la infección fuese provocada por cepas de *Campylobacter* ya resistentes provenientes de reservorios.

## CONCLUSIONES

- ✓ Del total de muestras analizadas se obtuvo 13,4% (17/127) de muestras positivas para el género *Campylobacter*.
- ✓ Las especies encontradas fueron *C. jejuni* 58,8% (10/17) y *C. coli* 41,2% (7/17).
- ✓ Al analizar la actividad antimicrobiana de 6 drogas frente a *Campylobacter spp.* se encontró que presentaban resistencia hacia ácido nalidíxico 76,5%, ciprofloxacino 76,5%, ampicilina 17,6% y eritromicina 5,9%.
- ✓ Al analizar la actividad antimicrobiana de 6 drogas frente a *C. jejuni* se encontró que el 80% presentaban resistencia hacia ácido nalidíxico y ciprofloxacino.
- ✓ Al analizar la actividad antimicrobiana de 6 drogas frente a *C. coli* se encontró que presentaron resistencia hacia ácido nalidíxico 71,4%, ciprofloxacino 71,4%, ampicilina 42,9% y eritromicina 14,3%.

## RECOMENDACIONES

- ✓ Antes de aplicar un tratamiento antimicrobiano realizar un análisis de las causas de la gastroenteritis y si es estrictamente necesario dar uso de los mismos para evitar el aumento de resistencia en estos.
- ✓ Realizar un análisis a fondo de todos los productos que pueden ser el foco de infección, así como de los animales de compañía que también pueden ocasionar el contagio con esta bacteria.
- ✓ Dar a conocer la resistencia que puede ocasionar el uso indiscriminado de antibióticos en profilaxis de animales de consumo para así poder disminuir la resistencia que estos adquieren a los antibióticos.
- ✓ Realizar más estudios en el país para poder contar con mayor información acerca de las diarreas ocasionadas por *Campylobacter spp.* tanto en niños como adultos mayores que son los grupos más sensibles.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alfredson, D., & Korolik, V. (2007). Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 277(2), 123–132. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00935.x>
- Alvarez, C. S. (2007). *Determinación de actividad contra Campylobacter jejuni por extractos etanolicos de cinco plantas*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Retrieved from [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2566.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2566.pdf)
- Campos, A., Martínez, M., & Mendoza, N. (2008). Quinolonas. *Rev Fac Med UNAM*, 51(4), 173–177.
- Castanon, J. I. R. (2007). History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds. *Poultry Science*, 86(11), 2466–2471. <http://doi.org/10.3382/ps.2007-00249>
- Castro, G., Aguilera, M. G., & Hernández, C. (2013). *Campylobacter jejuni*: ¿Una bacteria olvidada? Situación en México. *Enf Inf Microbiol*, 33(2), 77–84. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2013/ei132f.pdf>
- Cervantes, E., & Cravioto, A. (2007). *Campylobacter* y enfermedades asociadas. *Revista de La Facultad de Medicina de La UNAM*, 50(1), 31–35. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2007/un071j.pdf>
- Chanqueo, L., García, P., León, E., & Bluf, A. (2005). Evaluación de la tinción de Hucker para la búsqueda rutinaria de *Campylobacter* sp en el estudio de un síndrome diarreico agudo. *Rev Chil Infect*, 22(3), 242–246.
- Cobos, N., Ateka, O., Pitart, C., & Vila, J. (2009). Macrólidos y cetólidos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 27(7), 412–418. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.06.002>
- FAO. (2009). Evaluación de riesgos de *Campylobacter* spp . en pollos para asar, 56.
- Farace, M., & Viñas, M. (2007). Manual de Procedimientos Para el Aislamiento y Caracterización de *Campylobacter* spp., 1–34.
- Fernández, H. (2008). Género *Campylobacter*: un grupo de bacterias de importancia en Salud Pública. *Temas de Zoonosis*, 4, 205–214.
- Fernández, H. (2011a). *Campylobacter* and campylobacteriosis: a view from South America. *Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Pública*, 28(1), 121–127. <http://doi.org/10.1590/S1726-46342011000100019>

- Fernández, H. (2011b). Campylobacter Y CAMPYLOBACTERIOSIS: *Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Pública*, 28, 121–127.
- Fernandez, H., Folch, H., Eller, G., Navarrete, N., Andrews, E., & Gajardo, T. (1996). Intervention of Campylobacter jejuni subsp . jejuni flagella in the adhesion to cellular cultures: Bacteriological and immunological evidences. *Rev Med Chile*, (124), 1029–1035. Retrieved from [https://www.researchgate.net/profile/Heriberto\\_Fernandez/publication/14022323\\_Intervencion\\_of\\_Campylobacter\\_jejuni\\_subsp.\\_jejuni\\_flagella\\_in\\_the\\_adhesion\\_to\\_cellular\\_cultures\\_bacteriological\\_and\\_immunological\\_evidence/links/0f31753a9f531511a7000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Heriberto_Fernandez/publication/14022323_Intervencion_of_Campylobacter_jejuni_subsp._jejuni_flagella_in_the_adhesion_to_cellular_cultures_bacteriological_and_immunological_evidence/links/0f31753a9f531511a7000000.pdf)
- Fernández, H., Vera, F., & Villanueva, M. (2007). Especies de Arcobacter y Campylobacter en aves y mamíferos del sur de Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 39, 163–165. <http://doi.org/10.4067/S0301-732X2007000200011>
- Fernández, H., Vera, F., Villanueva, M., & García, A. (2008). Occurrence of campylobacter species in healthy well-nourished and malnourished children. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 56–58. <http://doi.org/10.1590/S1517-83822008000100013>
- García, F., Pérez, I., & Echeita, a. (2006). Campilobacteriosis: Aspectos clínicos y epidemiológicos. Programas de seguimiento y control. *Pofesión Veterinaria*, 16(64), 66–74.
- García, P., Valenzuela, N., Rodríguez, V., León, E., & Fernández, H. (2009). Susceptibilidad antimicrobiana de Campylobacter jejuni aislado de coprocultivos en Santiago de Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 26(6), 511–514. <http://doi.org/10.4067/S0716-10182009000700004>
- González, M., & Alonso, M. (2013). Incidencia y sensibilidad de Campylobacter jejuni en pacientes pediátricos: implicación en bacteriemia. *Rev Esp Quimioter*, 26(2), 92–96.
- Guarderian, R., Ordoñez, G., & Bossano, R. (1987). Diarrea aguda asociada a Campylobacter y otros patogenos en Quito, Ecuador. *Hospital Vozandes, Departamento de Investigaciones Clínicas Y Pediatría*.
- Gutiérrez, V. R., Osorio, L. G., & García, N. V. (2015). Campylobacter spp . en productos aviares y su impacto en salud pública, 10(2), 203–213.
- Hernandez, J., & Hernández, E. (2007). Campylobacter: líder en patología intestinal infecciosa, 1–48. Retrieved from [http://www.ramcv.com/Discursos/Dr. Hernandez Haba.pdf](http://www.ramcv.com/Discursos/Dr._Hernandez_Haba.pdf)
- Hormeño, L. (2016). *Resistencia frente a los antimicrobianos de mayor interés clínico en*

*cepas de Campylobacter aisladas del hombre y los animales. Universidad de Extremadura.*

- Jara, M. (2006). Especies del género *Campylobacter* y del género *arcobacter* en muestras de deposiciones humanas y animales. *Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias*, 3, 1–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/myaccess.library.utoronto.ca/pubmed/11720961>
- Jurado, C. (2014). Caracterización de la interacción patógeno - hospedador. *Universidad de Córdoba.*
- Kaakoush, N., Castaño, N., Mitchell, H., & Si Ming, M. (2015). Global epidemiology of campylobacter infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 687–720. <http://doi.org/10.1128/CMR.00006-15>
- Klotz, B., Garcés, F., Romero, J., & Ramirez, R. (2013). Perfil del riesgo *Campylobacter* spp en pollos de engorde.
- Labarca, J. a, Sturgeon, J., Borenstein, L., Salem, N., Harvey, S. M., Lehnkering, E., ... Mascola, L. (2002). *Campylobacter upsaliensis*: Another pathogen for consideration in the United States. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 34(11), E59–E60. <http://doi.org/10.1086/340266>
- Lapierre, L. (2013). Factores de Virulencia asociados a especies zoonóticas de *Campylobacter* spp., 28, 25–31.
- Luangtongkum, T., Jeon, B., Han, J., Plummer, P., Logue, C. M., & Zhang, Q. (2009). Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. *Future Microbiology*, 4(2), 189–200. <http://doi.org/10.2217/17460913.4.2.189>. Antibiotic
- Lucas, M. F., Mestorino, N., & Errecalde, J. O. (2007). Macrólidos : novedades de un clásico grupo de antimicrobianos macrolides : news about a classic group of antimicrobials. *Analecta Veterinaria*, 27(1), 36–45.
- Manrique, F., Billon, D., Bello, S., & Ospina, J. (2006). Agentes causantes de diarrea en niños menores de 5 años en Tunja, Colombia. *Revista de Salud Pública*, 8(1), 88–97. <http://doi.org/10.1590/S0124-00642006000100008>
- Mendez, H., & Cols, J. (2003). *Campylobacter*, 69–77.
- Narvaez, I. (2015). Prevalencia de las especies termotolerantes de *Campylobacter* (*C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. coli*, *C. lari* y *C. upsaliensis* en niños con y sin diarrea del Hospital Manuel Ygancio Monteros, durante el periodo Septiembre - Diciembre 2014 (Tesis Pregrado). *UTPL, Loja*.

- Notejane, M., Pandolfo, S., García, L., & Parada, M. (2015). Gastroenteritis aguda : formas de presentación clínica y etiología en niños hospitalizados en el Hospital Pediátrico , Centro Hospitalario Pereira Rossell , año 2012. *Arch Pediatr Urug*, 86(2), 91–97.
- Nyati, K. K., & Nyati, R. (2013). Role of *Campylobacter jejuni* Infection in the Pathogenesis of Guillain-Barré Syndrome : An Update. *BioMed Research International*, 2013.
- Orietta, L. (2009). Monitoreo de la resistencia antimicrobiana de *Campylobacter* spp. en cuatro hospitales de la ciudad de La Paz - Bolivia (Tesis para licenciatura). *Universidad Mayor de San Andres*, 1–97.
- Orrego, M., Weiler, N., Portillo, R., Lird, G., Acosta, L., Ortiz, F., Alvarez, M. (2014). Síndrome diarreico agudo causado por *Campylobacter* spp. en pacientes menores de 11 años y su resistencia antimicrobiana a las drogas de elección para tratamiento 2010-2012, Paraguay. *Pediatría (Asunción)*, 41(2), 127–130. Retrieved from [http://scielo.iics.una.py/scielo.php?pid=S1683-98032014000200005&script=sci\\_arttext](http://scielo.iics.una.py/scielo.php?pid=S1683-98032014000200005&script=sci_arttext)
- Palomino, C., & González, Y. (2014). Molecular techniques for detection and identification of pathogens in food: advantages and limitations. *Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Pública*, 31(3), 535–546. Retrieved from [http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342014000300020&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000300020&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
- Paucar, M., Ugarte, G., & Gonzales, E. (2014). Bacteremia por *Campylobacter coli* en paciente con inmunodeficiencia primaria *Campylobacter coli*. *Instituto Nacional de Salud Del Niño*, 379–380.
- Perales, M., Camiña, M., & Quiñones, C. (2002). Infección por *Campylobacter* y *Shigella* como causa de Diarrea Aguda Infecciosa en niños menores de dos años en el Distrito de la Victoria, Lima-Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 19(4), 186–192. Retrieved from [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342002000400004&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342002000400004&lng=es&nrm=iso)
- Perez, D. (2014). *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas en etapas iniciales de la producción de pollo de engorde en España . Relaciones con cepas de origen clínico. *Universidad Complutense MAadrid*.
- Pollett, S., Rocha, C., Zerpa, R., Patiño, L., Valencia, A., Camiña, M., ... Kasper, M. (2012). *Campylobacter* antimicrobial resistance in Peru: a ten-year observational study. *BMC Infectious Diseases*, 12(1), 193. <http://doi.org/10.1186/1471-2334-12-193>
- Rivera, N., Bustos, R., Montenegro, S., Sandoval, M., Castillo, J., Fernández, H., ... Quevedo, I. (2011). Genotipificación y resistencia antibacteriana de cepas de

- Campylobacter spp aisladas en niños y en aves de corral. *Revista Chilena de Infectología*, 28(6), 555–562. <http://doi.org/10.4067/S0716-10182011000700008>
- Rojas, X., Rojas, Y., & Soto, L. (1996). Campylobacter sp. en pollos para consumo humano, 17, 34–39.
- Romano, M., Cañizá, M. J., María, A., & Araujo, E. (2007). Síndrome de Guillain Barré. *Revista de Posgrado de La VI Cátedra de Medicina*, 168, 15–18.
- Skirrow, M. B., & Benjamin, J. (1980). “1001” Campylobacters: cultural characteristics of intestinal campylobacters from man and animals. *Journal of Hygiene*, 85(3), 427. <http://doi.org/10.1017/S0022172400063506>
- Somma, M., & Querci, M. (2009). Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. *World Health Organization*, 18. Retrieved from <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual ES/Sesi?n4.pdf>
- Tamborini, A., Casanova, L., Viñas, M., Asato, V., Hoffer, A., Lucero, M., Pichel, M. (2012). Campylobacter spp. : Prevalencia y caracterización fenotípica de aislamientos de pacientes con diarrea y de sus mascotas en la provincia de La Pampa , Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 44(4), 266–271.
- Tresierra, A., Fernández, H., Bendayán, M. E., Pereyra, G., & Bernuy, A. (1995). Aislamiento de especies termotolerantes de Campylobacter en dos poblaciones de pollos criados con y sin confinamiento. *Revista de Saúde Pública*, 29(5), 389–392. <http://doi.org/10.1590/S0034-89101995000500008>
- Ugarte, M. (2015). *Detección y Caracterización de “Campylobacter” procedentes de animales, alimentos y agua residual*. Universidad Complutense Madrid. Retrieved from <http://eprints.ucm.es/33724/1/T36573.pdf>
- Vasco, G., Trueba, G., Atherton, R., Calvopiña, M., Cevallos, W., Andrade, T., Eisenberg, J. N. S. (2014). Identifying etiological agents causing diarrhea in low income Ecuadorian communities. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(3), 563–569. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0744>
- Vilar, M. (2007). Desarrollo del análisis de peligros y puntos de control crítico en explotaciones de vacuno lechero en galicia: estudio epidemiológico de patógenos zoonóticos. *UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA*.
- Wang, G., Clark, C. G., Taylor, T. M., Pucknell, C., Barton, C., Price, L., Rodgers, F. G. (2002). Colony Multiplex PCR Assay for Identification and Differentiation of Campylobacter jejuni, C. coli, C. lari, C. upsaliensis, and C. fetus subsp. fetus. *Society*, 40(12), 4744–4747. <http://doi.org/10.1128/JCM.40.12.4744>

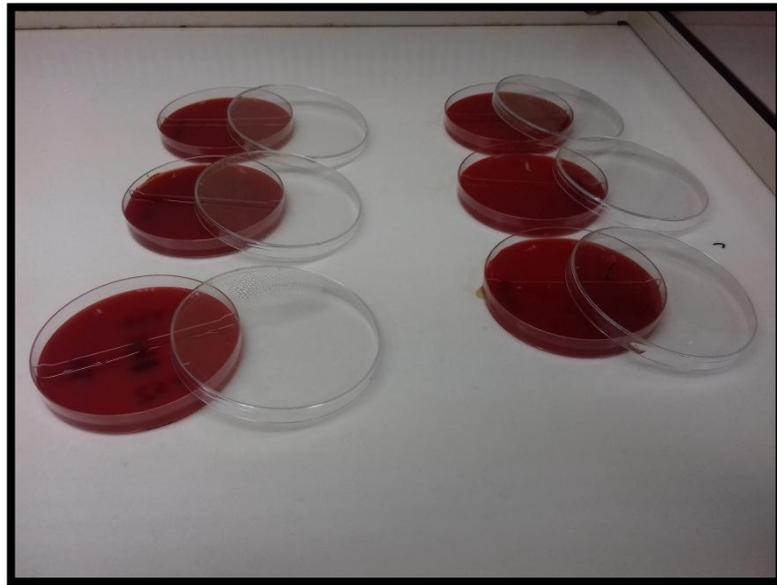
- Werno, A. M., Klena, J. D., Shaw, G. M., Murdoch, R., & Murdoch, D. R. (2002). Fatal Case of *Campylobacter lari* Prosthetic Joint Infection and Bacteremia in an Immunocompetent Patient Fatal Case of *Campylobacter lari* Prosthetic Joint Infection and Bacteremia in an Immunocompetent Patient. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(3), 40–43. <http://doi.org/10.1128/JCM.40.3.1053>
- Yamazaki, W., Taguchi, M., Seto, K., Kawahara, R., Kawatsu, K., Kumeda, Y., Tsukamoto, T. (2007). Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. *Journal of Medical Microbiology*, *56*(11), 1467–1473. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.47363-0>
- Zhao, S., Young, S. R., Tong, E., Abbott, J. W., Womack, N., Friedman, S. L., & McDermott, P. F. (2010). Antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates from retail meat in the united states between 2002 and 2007. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(24), 7949–7956. <http://doi.org/10.1128/AEM.01297-10>

## **ANEXOS**

## ANEXO 1: PREPARACIÓN DE MEDIO SELECTIVO BUTZLER

### Para un volumen final de 1000 ml, 5% de sangre

- Pesar 25 g de Agar Caldo Nutritivo N°2.
- Pesar 10 g de extracto de levadura y 16 g de agar - agar.
- Agregar 940 ml de agua destilada.
- Ajustar el pH en un rango de 6.5 a 6.9 utilizando ácido clorhídrico diluido al 25%.
- Esterilizar en autoclave a 121°C y 1 atm de presión por 20 minutos.
- Reconstituir el antibiótico (*Campylobacter* selective supplement Butzler).
- Adicionar antibiótico en el medio de cultivo autoclavado cuando se encuentre a 50°C.
- Agregar la sangre al medio de cultivo (50 ml) y homogenizar evitando la formación de burbujas.
- Dispensar aproximadamente 20 ml de medio por cada caja Petri o Bipetri.
- Almacenar las cajas de forma invertida a 4°C previamente rotuladas.



**Figura 8. Medios Butzler**

Fuente: La autora

## **ANEXO 2: PREPARACIÓN DE MEDIO MUELLER HINTON**

### **Para un volumen final de 1000 ml, 5% de sangre**

- Pesar 38 g de Agar Mueller Hinton y 5 de extracto de levadura.
- Agregar 950 ml de agua destilada.
- Ajustar el pH en un rango de 7.0 – 7.2 utilizando ácido clorhídrico diluido al 25%.
- Esterilizar en autoclave a 121°C y 1 atm de presión por 20 minutos.
- Agregar la sangre al medio de cultivo 5 % (50 ml) y homogenizar evitando la formación de burbujas.
- Dispensar el medio en cada caja Petri.
- Almacenar las cajas de forma invertida a 4°C previamente rotuladas.

### ANEXO 3: COLORACIONES PARA IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE *CAMPYLOBACTER*

#### COLORACIÓN GRAM

- Preparar un frotis de la muestra a analizar.
- Cubrir con cristal violeta por un minuto, luego lavar con agua.
- Verter la solución de lugol y dejarlo por 1 minuto.
- Escurrir la solución y lavar con agua, escurrir.
- Cubrir con la solución de safranina por 10 segundos.
- Lavar con agua y dejar secar.

**Nota:** El colorante de contraste safranina puede cambiarse por fuscina fenicada, porque el contraste es muy pobre y es difícil de visualizar la bacteria.

#### COLORACIÓN DE HUCKER

- Realizar un frotis de las colonias sospechosas en una placa porta objetos y fijar con calor.
- Colocar sobre el frotis una gota de colorante violeta cristal y una gota de bicarbonato de sodio al 1% por 2 minutos.
- Lavar la placa con agua y dejar secar.
- Observar al microscopio óptico con el lente de 100x.

**Nota:** Los cultivos viejos pueden variar la morfología de *Campylobacter* spp tomando una forma esférica o cocoide no viable.



**Figura 9. Coloración con Tinción Hucker.**

**Fuente:** La autora

## ANEXO 4: IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

### CATALASA

- Tomar con un asa estéril colonias puras de un cultivo fresco y colocar en un porta objetos.
- Adicionar una gota de peróxido de hidrógeno al 3%.
- Lectura de resultados: **Positivo:** Formación de burbujas, **Negativo:** Ausencia de burbujas.

### OXIDASA

- Tomar con un asa estéril las colonias puras de un cultivo fresco.
- Inocular en tiras reactivas Oxistrip de Hardy Diagnostics.

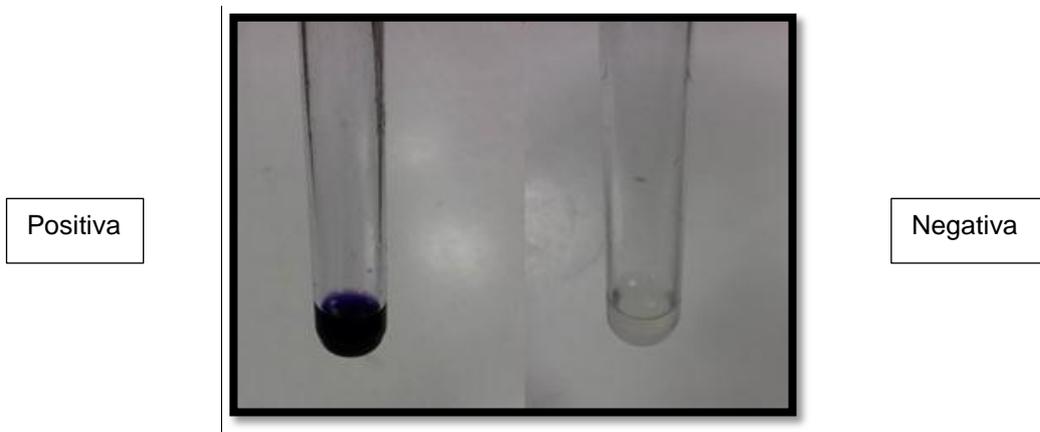
Lectura de resultados: **Positivo:** Coloración azul – violeta en la tira reactiva, **Negativo:** Ausencia de coloración en la tira reactiva.

### HIDROLISIS DEL HIPURATO

- Tomar 400 ul de solución de hipurato de sodio al 1% en un tubo.
- Colocar de tres a cuatro asadas del cultivo puro en la solución de hipurato y dar vórtex.
- Incubar en baño maría a 37°C por un período de 2 horas.
- Agregar 200 ul de solución de ninhidrina y reposar 10 minutos más en el baño maría.

Interpretación de resultados: **Positivo:** Coloración azul – violeta intenso

**Negativo:** Coloración azul tenue o ausencia de coloración.



**Figura 10.** Prueba de hidrolisis del hipurato

**Fuente:** La autora

## ANEXO 5: MÉTODO DE FILTRACIÓN EN MEMBRANA DE NITROCELULOSA DE 0,45µm

- Tomar de dos a tres asadas de las colonias de *Campylobacter spp.* colocarlas en 250 ul de solución salina y dar vórtex.
- Colocar el filtro de membrana de nitrocelulosa sobre las placas de medio selectivo.
- Colocar los 200 ul de la solución sobre el filtro con una micropipeta, esperar hasta que se complete la filtración por un tiempo mínimo de 30 minutos.
- Retirar el filtro con la ayuda de pinzas estériles.
- Incubar las placas de forma invertida en una atmósfera de microaerofilia a 42°C ± 2°C durante 48 horas.
- Verificar la pureza de las cepas mediante tinción Hucker.



**Figura 11. Filtración en membrana de nitrocelulosa**

**Fuente:** La autora

## **ANEXO 6: PREPARACIÓN DE INÓCULO PARA ANTIBIOGRAMAS.**

- En un tubo estéril colocar 1 ml de suero fisiológico
- De un cultivo fresco tomar de 2 – 3 asadas de colonias y colocar en el tubo.
- Incubar durante 10 minutos a 37°C.
- Tomar con un hisopo estéril el contenido del tubo.
- Colocar el hisopo en medio Mueller Hinton y estriar de manera continua en toda la placa.
- Colocar los discos antibióticos respectivos (AM, GM, E, CIP, AmC, NA)
- Incubar a 42°C  $\pm$ 2 en un ambiente de microaerofilia durante 48 horas.

## **ANEXO 7: CRIOCONSERVACIÓN DE CEPAS**

- Tomar con un hisopo estéril las colonias puras de un cultivo fresco.
- Inocular asépticamente el hisopo dentro del criotubo CRIOBANK™ MIXED (COPAN Diagnostics, Inc).
- Agitar el criotubo por 10 segundos.
- Dejar los criotubos invertidos por 20 minutos.
- Retirar el exceso de glicerina con la ayuda de una micropipeta.
- Almacenar los criotubos a -70°C.

## ANEXO 8: PROTOCOLO PARA EXTRACCIÓN DE DNA DE CÉLULAS CULTIVADA

### Aislamiento de ADN genómico de bacterias y bacterias gram negativas

#### **Materiales y equipos:**

- Microcentrifuga de 13000 x g
- Tubos de 1,5 mL para microcentrifuga.
- Baño María, bloque de calor o incubadora a 80 °C y 37°C.
- Isopropanol
- Etanol al 70%.
- Baño María, bloque de calor o incubadora a 65°C (opcional).

#### **PROCEDIMIENTO:**

1. Añadir 1 ml de un cultivo de una noche a un tubo de 1,5 ml de microcentrífuga.
2. Centrifugar a 13,000-16,000 × g durante 2 minutos para sedimentar las células. Eliminar el sobrenadante.
3. Añadir 600µl de Nuclei Lysis Solution. Pipetear suavemente hasta que se vuelven a suspender las células.
4. Incubar a 80 ° C durante 5 minutos para lisar las células; a continuación, enfriar a temperatura ambiente.
5. Añadir 3µl de RNase Solution al lisado celular. Invierta el tubo 2-5 veces para mezclar.
6. Incubar a 37 ° C durante 15-60 minutos. Enfriar la muestra a temperatura ambiente.
7. Agregar 200µl de Protein Precipitation Solution al lisado celular tratado con RNasa.
8. Dar Vortex vigorosamente a alta velocidad durante 20 segundos para mezclar la Protein Precipitation Solution con el lisado celular.
9. Incubar la muestra en hielo durante 5 minutos.
10. Centrifugar a 13,000-16,000 × g durante 3 minutos.
11. Transferir el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo de 1,5 ml de microcentrífuga limpio que contenga 600µl de isopropanol a temperatura ambiente.  
**Nota:** Algunos sobrenadantes pueden permanecer en el tubo original que contiene los pellets de proteína. Dejar este líquido residual en el tubo para evitar la contaminación de la solución de ADN con la proteína precipitada.
12. Mezclar suavemente por inversión hasta que las hebras de hilo de ADN formen una masa visible.

- 13.** Centrifugar a 13,000-16,000 × g durante 2 minutos.
- 14.** Vierta cuidadosamente el sobrenadante y drene el tubo sobre papel absorbente limpio. Añadir 600µl de etanol al 70% a temperatura ambiente y suavemente invierta el tubo varias veces para lavar el sedimento de ADN.
- 15.** Centrifugar a 13,000-16,000 × g durante 2 minutos
- 16.** Aspirar cuidadosamente el etanol.
- 17.** Drene el tubo sobre papel absorbente limpio y deje que el precipitado se seque al aire durante 10-15 minutos.
- 18.** Añadir 100 µl de solución de rehidratación de ADN en el tubo y rehidratar el ADN mediante incubación a 65 °C durante 1 hora. Periódicamente mezclar la solución golpeando suavemente el tubo. Alternativamente, rehidratar el ADN mediante la incubación de la solución durante la noche a temperatura ambiente a ó 4 ° C.
- 19.** Almacenar el ADN a 2-8 ° C.

## ANEXO 9: PCR – MULTIPLEX

En un tubo de microcentrifuga se colocará cada uno de los componentes para realizar el mix.

Especies	Componentes	1X (ul)
	Buffer	5,00
	dNTPs	0,50
	Cl2Mg	1,50
	<b>Primers:</b>	
<b><i>Campylobacter</i></b>	C412F	0,05
	C1228R	0,05
<b><i>C. jejuni</i></b>	C-1	0,05
	C-3	0,05
<b><i>C. coli</i></b>	CC18F	0,05
	CC519R	0,05
<b><i>C. upsaliensis</i></b>	CU61F	0,05
	CU146R	0,05
<b><i>C. fetus</i></b>	MG3F	0,05
	CF359R	0,05
<b><i>C. lari</i></b>	CLF	0,05
	CLR	0,05
<b><i>C.hyointestinalis</i> <i>subsp.hyointestinalis</i></b>	HYO1F	0,05
	HYOFET235R	0,05
	Taq	0,125
	H2O	16,17
	DNA	1,00
		<b>25,00</b>

Al culminar este proceso se debe llevar al termociclador el cual debe estar programado con las siguientes condiciones:

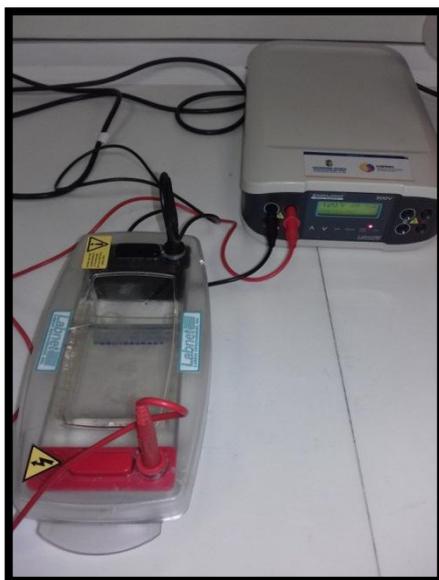
**Tabla 4.** Condiciones para PCR

Condiciones:	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	N° ciclos
<b>Desnaturalización inicial</b>	94	2	1
<b>Desnaturalización</b>	94	0,4	30
<b>Anillamiento</b>	54	1,4	
<b>Extensión</b>	72	1	
<b>Extensión final</b>	72	5	1

## ANEXO 10: ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Para preparación de un gel de 35 mL.

- En una probeta colocar 11,6 mL de gel red y 3,5 mL de TBE 10x y aforar a 35 mL.
- Pesar 0,525 g de agarosa UltraPure™ de Invitrogen y colocar en un vaso de precipitación de 50 mL y adicionar el contenido de la probeta.
- Disolver por calentamiento la solución evitando llegar a temperatura de ebullición para no perder producto con la evaporación.
- Verter la solución en la bandeja de electroforesis.
- Colocar la peineta en la bandeja.
- Dejar solidificar el gel por alrededor de 15 minutos.
- En la cubeta para electroforesis colocar gel y adiciona el buffer TBE 1x hasta cubrir completamente el gel.
- Adicionar 1  $\mu$ l del marcador de peso molecular y 2  $\mu$ l de los productos de la PCR Múltiplex (controles y muestras).
- Tapar la cubeta conectando a la fuente de poder Enduro™ marca Labnet.
- Programar la corrida por 45 minutos a 120 Volt y 300 mA.
- Revelar el gel mediante luz UV a 300 nm en el Transluminador UV Labnet.



**Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa**

**Fuente:** La autora