



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 de ganado porcino y bovino en la provincia de Loja.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Chamba Sánchez, Alexis Fernando

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

Magíster

Rosa Janneth Simaluiza Masabanda

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: **“Especies de *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas aisladas de ganado porcino y bovino en la provincia de Loja”** realizado por: Chamba Sánchez Alexis Fernando, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, noviembre de 2016

f).....

Mgtr. Rosa Janneth Simaluiza Masabanda.

DECLARATORIA DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Chamba Sánchez Alexis Fernando declaro ser autor (a) del presente trabajo de titulación: **“Especies de *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas aisladas de ganado porcino y bovino en la provincia de Loja”**, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo la Mgtr. Rosa Janneth Simaluiza Masabanda directora 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 o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f).....

Autor: Alexis Fernando Chamba Sánchez

Cédula: 1105172587

DEDICATORIA

Primeramente a Dios, a la Virgen Santísima y al Divino niño Jesús por haberme permitido cumplir este objetivo, por darme fuerza y salud durante todo este trayecto.

A mis padres quienes gracias a su amor y apoyo incondicional me supieron llenarme de motivo y valor para seguir adelante.

A mis hermanos por estar presentes brindándome su ayuda durante el desarrollo de la tesis.

A todas las personas quienes estuvieron en el transcurso de toda esta etapa, amigos, compañeros, docentes que me han ayudado para seguir adelante.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por estar siempre junto a mí llenándome de bendiciones y siendo mi fortaleza en mis momentos malos de la vida.

Mi infinito agradecimiento a mis padres por su sacrificio durante todos estos años de universidad, todos estos logros se los debo a ellos.

Al Dr. Heriberto Fernández por compartir sus conocimientos y lograr acabar este proyecto.

A mi directora de tesis Mgtr. Janneth Simaluiza por haberme guiado y orientado en el desarrollo de esta investigación, gracias por su paciencia y la confianza que me ha brindado.

A la Mgtr. Zorayda Toledo por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto y haberme ayudado en cada inquietud durante el desarrollo del presente estudio.

A mis compañeros de investigación David, Cristian, Erika, Vinicio, Juan que colaboraron en transcurso del proyecto.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA.....	i
APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARATORIA DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO 1.....	5
MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. <i>Campylobacter</i> spp.....	6
1.1.1 Taxonomía.....	6
1.1.2 Reservorios.....	6
1.1.3 Distribución geográfica.....	7
1.2. Especies termófilas.....	7
1.3. <i>Campylobacteriosis</i>	8
1.3.1 Epidemiología.....	8
1.3.2 Patogenia.....	9
1.3.3 Tratamiento.....	10
1.3.4 En humanos.....	10
1.3.5 En animales.....	10
1.4. <i>Campylobacteriosis</i> en ganado bovino.....	11
1.4.1 Síntomas.....	11
1.4.2 Diagnóstico.....	11
1.5. <i>Campylobacteriosis</i> en ganado porcino.....	12
1.5.1 Síntomas.....	12
1.5.2 Diagnóstico.....	12
1.6. Actividad antimicrobiana.....	12
1.6.1 Resistencia a fluoroquinolonas.....	12
1.6.2 Resistencia a macrólidos y cetólidos.....	13

1.7.	Identificación de especies de <i>Campylobacter</i>	13
1.7.1	Identificación presuntiva.	13
1.7.2	Identificación final.	14
1.8.	Identificación molecular de <i>Campylobacter</i>	15
CAPÍTULO 2	16
METODOLOGÍA	16
2.1.	Recolección de muestras.....	17
2.2.	Aislamiento e identificación fenotípica de <i>Campylobacter</i> spp.	17
2.2.1	Crecimiento bacteriano	17
2.2.2	Cultivo por filtración pasiva	17
2.2.3	Identificación bioquímica de <i>Campylobacter</i> spp.	17
2.3.	Actividad antimicrobiana	18
2.4.	Crioconservación	18
2.5.	Identificación molecular de <i>Campylobacter</i> spp.	18
CAPÍTULO 3	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
3.1.	Prevalencia de <i>Campylobacter</i> spp. en ganado bovino.....	21
3.2.	Identificación de especies de <i>Campylobacter</i> en ganado bovino.	22
3.3.	Actividad antimicrobiana frente a <i>Campylobacter</i> spp. en ganado bovino.....	23
3.4.	Prevalencia de <i>Campylobacter</i> spp. en ganado porcino	24
3.5.	Identificación de especies de <i>Campylobacter</i> en ganado porcino	25
3.6.	Actividad antimicrobiana frente a <i>Campylobacter</i> spp. en ganado porcino.....	26
3.7.	Análisis molecular de <i>Campylobacter</i> spp en ganado bovino y porcino.	28
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFÍA	31
ANEXOS	37
PROTOCOLOS	38
ANEXO 1:	Tinción de Hucker	38
ANEXO 2:	Preparación de medio de Transporte (TEC).....	39
ANEXO 3:	Preparación de medio de cultivo Butzler	40
ANEXO 4:	Aislamiento de <i>Campylobacter</i> spp	41
ANEXO 5:	Filtración en membrana de nitrocelulosa	42
ANEXO 6:	Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>Campylobacter</i> spp.	43

ANEXO 7: Determinación de la Actividad Antimicrobiana.....	44
ANEXO 8: Crioconservación	45
ANEXO 9: Extracción de DNA bacteriano	46
ANEXO 10: PCR – Multiplex para <i>Campylobacter</i> spp.....	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de primers utilizados para la PCR-MMULTIPLEX para identificación de especies de <i>Campylobacter</i> spp.	19
Tabla 2. Identificación de <i>Campylobacter</i> spp, en muestras fecales de ganado bovino.	21
Tabla 3. Identificación de especies de <i>Campylobacter</i> en ganado bovino.....	22
Tabla 4. Identificación de <i>Campylobacter</i> spp, en muestras fecales de ganado porcino.	25
Tabla 5. Identificación de especies de <i>Campylobacter</i> en ganado porcino.....	25
Tabla 6. Master mix para PCR multiplex.	48
Tabla 7. Condiciones de temperaturas para PCR Múltiplex.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Acitividad antimicrobiana de especies de <i>Campylobacter</i> en ganado bovino	23
Figura 2. Actividad antimicrobiana de especies de <i>Campylobacter</i> en ganado porcino.....	27
Figura 3. Especies de <i>Campylobacter</i> aisladas de muestras de ganado bovino.....	28
Figura 4. Especies de <i>Campylobacter</i> aisladas de muestras de ganado porcino.	29
Figura 5. <i>Campylobacter</i> spp. Aislado de muestras fecales	38
Figura 6. Aislamiento de especies de <i>Campylobacter</i> spp.	41
Figura 7. Filtración para aislamiento de <i>Campylobacter</i> spp.	42
Figura 8. Hidrolisis del hipurato.	43
Figura 9. Determinación de la susceptibilidad bacteriana.....	44
Figura 10. Crioconservación de <i>Campylobacter</i> spp.	45

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>C. fetus</i>	<i>Campylobacter fetus</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>C. lari</i>	<i>Campylobacter lari</i>
<i>C. upsaliensis</i>	<i>Campylobacter upsaliensis</i>
CA-SFM	Comité de Antibiograma de la Sociedad Francesa de Infectología
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CIM	Concentración Mínima Inhibitoria
EUCAST	Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana
FlaA	Flagelina tipo A
<i>flaA</i>	Gen que codifica la Flagelina tipo A
FlaB	Flagelina tipo B
<i>flaB</i>	Gen que codifica la Flagelina tipo B
FQ	Fluorquinolonas
GTPasas	Enzima guanosina trifosfatasa
ISP	Instituto de Salud Pública de Chile
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
WHO	World Health Organization

RESUMEN

Campylobacter es un patógeno bacteriano transmitido por los alimentos que generalmente causa gastroenteritis en humanos. Este organismo patógeno es cada vez más resistente a los antibióticos, especialmente fluoroquinolonas y macrólidos, que son los antimicrobianos utilizados con mayor frecuencia para el tratamiento de la campilobacteriosis cuando se justifica terapia clínica. El presente estudio determinó la prevalencia de especies de *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas aisladas de ganado porcino y bovino en la provincia de Loja. Se recolectaron 100 muestras de heces de ganado bovino donde la prevalencia para *Campylobacter* spp. fue de 15%, de las cuales el 73% (11/15) fueron *C. jejuni* y el 23% (4/15) *C.coli*. En cuanto al ganado porcino se recolectaron 30 muestras obteniendo una prevalencia del 27% de las cuales 100% (8/8) fueron *C.coli*. No se registró aislamiento de *C. jejuni*. Los análisis de la actividad antimicrobiana en ganado bovino se determinaron una resistencia del 87% a ácido nalidixico y a ciprofloxacina y en cepas aisladas de ganado porcino presentaron una resistencia del 100% frente a ácido nalidixico y a ciprofloxacina.

Por lo tanto el presente estudio brinda valiosa información sobre la presencia de especies termotolerantes de *Campylobacter* en nuestra región y su relación epidemiológica con las cepas aisladas lo cual permitirá fortalecer la vigilancia de *Campylobacter* spp. en ganado bovino y porcino, ya que dichos animales presentan riesgo zoonótico por ser portadores asintomáticos del patógeno.

PALABRAS CLAVE: *Campylobacter*, *C. jejuni*, *C.coli*, susceptibilidad antimicrobiana

ABSTRACT

Campylobacter is a foodborne bacterial pathogen that usually causes gastroenteritis in humans. This pathogenic organism is increasingly resistant to antibiotics, especially fluoroquinolones and macrolides which are the most frequently used antimicrobials for the treatment of campylobacteriosis when clinical therapy is warranted. The present study determined the prevalence of fluoroquinolone resistant Campylobacter species isolated from porcine and bovine cattle in the province of Loja. A hundred samples of bovine faeces were collected where the prevalence for Campylobacter spp. was 15%, of which 73% (11/15) were *C. jejuni* and 23% (4/15) *C. coli*. As for pigs, 30 samples were collected, obtaining a prevalence of 27%, of which 100% (8/8) were *C. coli*. No isolation of *C. jejuni* was recorded. Analysis of the antimicrobial activity in bovine cattle showed a resistance of 87% to nalidixic acid and to ciprofloxacin and in strains isolated from pigs presented a resistance of 100% against nalidixico acid and ciprofloxacina.

Therefore, the present study provides valuable information on the presence of Campylobacter thermotolerant species in our region and its epidemiological relationship with isolated strains, which will allow the strengthening of Campylobacter spp. in cattle and pigs, as these animals present zoonotic risk because they are asymptomatic carriers of the pathogen.

Keywords: *Campylobacter*, *C. jejuni*, *C.coli*, antimicrobial susceptibility

INTRODUCCIÓN

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. La falta de notificación es un problema en la mayoría de los países y las tasas de incidencia sólo corresponden con los casos confirmados en laboratorio (Chatur, Brahmbhatt, Modi, & Nayak, 2014).

Actualmente comprende 25 especies, la mayoría de las cuales reconoce como reservorio natural a mamíferos y aves, tanto domésticos como de vida libre (Lynch *et al*, 2011), de las cuales las más frecuentemente detectadas en enfermedades humanas son *Campylobacter jejuni* (*subspecies jejuni*) y *Campylobacter coli*. Otras especies como *Campylobacter lari* y *Campylobacter upsaliensis* también han sido aisladas en pacientes con enfermedades diarreicas, pero su notificación es menos frecuente. La mayoría de las especies prefieren una atmósfera microaeróbica (que contenga entre un 3% y un 10% de oxígeno) para su crecimiento (Unicomb *et al.*, 2006)

En la naturaleza *Campylobacter* está presente en un gran depósito, incluyendo el tracto intestinal de los animales domésticos y de producción así como también en aguas no tratadas. En los países industrializados, la enfermedad es más común en adultos, mientras que en los países en desarrollo afecta principalmente a los niños y contribuye a una considerable tasa de mortalidad infantil (Lehtopolku, 2011). Son colonizadores frecuentes del intestino del ganado bovino, ovejas y cerdo. El ganado bovino y las ovejas son colonizados fundamentalmente por *C. jejuni*, *C.coli*, *C. hyointestinalis* y *C. fetus*, mientras que los cerdos son colonizados predominantemente por *C.coli*. En mamíferos jóvenes, la proporción es más alta que en animales más viejos (Kassenborg *et al.*, 2004).

Muchos animales llevan *Campylobacter* spp. de forma asintomática y los eliminan del organismo en sus heces. Las aves de corral, en particular los pollos de engorde, son una fuente muy importante de la bacteria, aunque por lo general no se enferman (Cervantes & Cravioto, 2007).

Se han aislado enormes cantidades de *Campylobacter* en ganado joven, como lechones, corderos y terneros con enteritis, pero los microorganismos también se han encontrado en animales sanos (Delsol *et al.*, 2004).

Para el tratamiento clínico de la *Campylobacteriosis* el fármaco a elección es la eritromicina que es un macrólido, aunque las fluoroquinolonas (FQ) son también de uso frecuente debido a su amplio espectro de actividad frente a patógenos entéricos. También existen medicamentos alternativos que incluyen tetraciclinas y gentamicina, que se utilizan en casos de infección sistémica con *Campylobacter* (Bae *et al.*, 2005).

El desarrollo y transmisión de *Campylobacter* resistentes a los antibióticos se complica por el hecho de que *Campylobacter* es un patógeno zoonótico y por lo tanto está expuesto a los antibióticos utilizados en la producción animal y de la medicina humana. Por lo tanto, se requiere un enfoque ecológico para comprender la emergencia, la transmisión y la persistencia de *Campylobacter* resistente a los antibióticos (Nelson, Chiller, Powers, & Angulo, 2007).

Las fluoroquinolonas tales como ciprofloxacina se han utilizado comúnmente para el tratamiento de infecciones causadas por *Campylobacter*. Sin embargo, en los años recientes, la emergencia de resistencia a estos grupos de antimicrobianos ha complicado el tratamiento empírico de la campilobacteriosis. La prevalencia de fluoroquinolonas resistentes a *C. jejuni* en los EE.UU. fue del 0% en 1990, aumentando a 13% en 1997, y al 18% en 1999, tras la aprobación de las fluoroquinolonas para el uso en la avicultura en 1995 (Butzler, 2004).

La resistencia a fluoroquinolonas en *Campylobacter* se debe a la presión selectiva que ejercen estas drogas induciendo a mutaciones en los genes *gyrA* y/o *parC* responsables de la codificación de la subunidad de las DNA girasas topoisomerasa tipo II y topoisomerasa IV, enzimas que corresponden a los sitios blancos primario y secundario de acción de las fluoroquinolonas respectivamente (Fernández *et al.*, 2009)

Ante esta situación la presente investigación pretende contribuir con información sobre el uso de antimicrobianos en cerdos y bovinos en la ciudad de Loja, ante los pocos estudios sobre la epidemiología y actividad antimicrobiana del grupo de las fluoroquinolonas en animales de granja, así mismo conocer si la administración de fluoroquinolonas en estos animales conllevan un riesgo a la salud pública.

Por otra parte es necesario comprobar si existe relación entre el uso veterinario de fluoroquinolonas con el desarrollo de resistencia a las fluoroquinolonas en humanos, permitiéndonos de esta manera mejorar los sistemas de diagnóstico y detección de cepas resistentes de *Campylobacter* a fluoroquinolonas tanto en la clínica humana como en la clínica veterinaria de la ciudad.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1. *Campylobacter* spp.

Las especies del género *Campylobacter* abarcan bacilos Gram negativos curvos, de forma espiral o de S que presenta un flagelo único en uno o ambos extremos. En cultivos de varios días (más de tres) degeneran en formas esféricas u ovoides donde se pierde su viabilidad (Centro de seguridad alimentaria y Pública, 2013).

Campylobacter spp. se puede transmitir al hombre a través del contacto directo con animales o canales infectadas o indirectamente a través de los alimentos y del agua contaminada.

De una manera general, la refrigeración (0-10 °C) detiene el crecimiento de estas bacterias y puede destruir una pequeña parte de la población. A pesar que algunas especies más patógenas son termo tolerantes, se puede considerar que son sensibles al calor, pues no sobreviven a tratamientos térmicos superiores a 60 °C (Centro de seguridad alimentaria y Pública, 2013).

1.1.1 Taxonomía.

Al comienzo, estos microorganismos fueron clasificados dentro del género *Vibrio*. Sin embargo, más tarde, debido a que presentan diferencias fundamentales con relación a la constitución del DNA y por su incapacidad de fermentar los hidratos de carbono, fueron agrupados en un nuevo género bacteriano denominado *Campylobacter* (campylo = curvo) (bacter = bacteria). Actualmente se han incorporado nuevas especies y se ha creado la familia *Campylobacteriaceae*, la cual está compuesta por dos géneros: *Campylobacter*, *Arcobacter*, y un género de afiliación incierta *Helicobacter*.(Salud, 2001).

1.1.2 Reservorios.

Hay presencia de *Campylobacter* spp. en diversos ambientes. Los animales silvestres y domésticos, en especial aves de corral, aves silvestres y el ganado, son reservorios importantes, aunque también pueden serlo los animales de compañía y otros animales. Los alimentos, incluidos la carne y la leche no pasteurizada, son fuentes importantes de infecciones por *Campylobacter*. El agua también es una fuente significativa. Se ha comprobado que la presencia de los microorganismos en aguas superficiales está fuertemente ligada a la pluviosidad, la temperatura del agua y la presencia de aves acuáticas (Fernández, 2011).

Los animales con *Campylobacter* en su tracto digestivo se comportan como portadores asintomáticos, desarrollando la enfermedad clínica en raras ocasiones (Brief, 2013).

1.1.3 Distribución geográfica.

La *Campylobacteriosis* es una zoonosis de distribución mundial (Fao, 2009).

1.2. 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. laridi* (biovar ureasa + y -), y *C. upsaliensis* (Centro de seguridad alimentaria y Pública, 2013).

✓ *Campylobacter jejuni* (subespecie *jejuni*).

La *subespecie jejuni* simplemente es referida como *C. jejuni* y, desde 1970, se la reconoce como la bacteria más aislada a partir de humanos con gastroenteritis. Además, está involucrada en otras enfermedades, tales como: proctitis, septicemia, meningitis, aborto y enfermedades autoinmunes, esta especie se encuentra ampliamente en el reino animal comúnmente en las heces de animales, se asocia comúnmente a las aves de corral, y, naturalmente, coloniza el tracto digestivo de muchas especies de aves (WHO, 2007).

A pesar de que los individuos sanos de Estados Unidos y Europa no son portadores de *C. jejuni*, esta bacteria es aislada frecuentemente a partir del ganado bovino, los pollos, los pájaros e inclusive las moscas libres de enfermedades. Debido a que los mecanismos patogénicos de *C. jejuni* aún siguen siendo materia de estudio, es difícil diferenciar las cepas patogénicas de las que no lo son. Sin embargo, parece ser que la mayoría de las cepas aisladas de los pollos son patógenas. También es común en el ganado, y aunque es normalmente un comensal inocuo del tracto gastrointestinal en estos animales, puede causar la campilobacteriosis en los terneros (Giacoboni, Puchuri, & Cerdá, 1999).

✓ *Campylobacter coli*.

Campylobacter coli, junto con *C. jejuni*, es una de las especies más comunes del género y es un agente importante de gastroenteritis y enterocolitis aguda en los seres humanos (Fernández, *et al.* 2008).

Esta especie de bacteria coloniza el epitelio intestinal a tal punto que puede romper la capa epitelial y propagarse al torrente sanguíneo. *C.coli* es muy versátil y tiene un ciclo de ácido

cítrico completo, incluyendo una compleja cadena respiratoria que permite tanto la respiración aeróbica y anaeróbica. Estas características permiten vivir y sobrevivir en una serie de ambientes, incluyendo el intestino. *C.coli* es muy similar a sus bacterias relativas, *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*); puede causar la inflamación del intestino y causar diarrea en los animales infectados y los seres humanos (Giacoboni *et al.*, 1999).

✓ ***Campylobacter upsaliensis*.**

Raramente es aislado de diarreas, produce bacteriemias en huéspedes inmunocomprometidos. Son más resistentes al poder bactericida del suero que las otras especies termófilas, por lo que puede sobrevivir en sangre. Si bien su fuente de infección no está bien definida, se ha relacionado con animales, especialmente perros, alimentos como leche no pasteurizada y sus derivados (Hoffer, 1981).

✓ ***Campylobacter fetus* (*subsp. fetus y veneralis*).**

Son microorganismos de gran importancia veterinaria producen aborto esporádico en el ganado bovino y ovino. Se transmite en bovino, ovino y caprino por ingestión, tras el contacto con heces, descargas vaginales, fetos abortados y membranas fetales. También se puede transmitir por vía venérea, al igual que *C. fetus subsp. venerealis*. Las infecciones genitales se pueden diseminar por fomites, incluyendo semen contaminado, instrumentos contaminados y camas (Hoffer, 1981).

1.3. *Campylobacteriosis*.

Campylobacteriosis es el nombre común que describe las enfermedades infecciosas causadas por especies del género bacteriano *Campylobacter* y constituyen un problema de salud pública con un coste social cada día más elevado. Las únicas formas de *Campylobacteriosis* que revisten importancia para la salud pública son las debidas a *C. jejuni* y *C.coli*. Como ya se ha descrito el ratio de incidencia a nivel mundial de la campilobacteriosis se ha ido incrementando en los últimos años superando al número de casos de salmonelosis y shigelosis (Iranzo *et al.*, 2015).

1.3.1 Epidemiología.

Campylobacter es una de las causas más comunes de gastroenteritis bacteriana humana. Por ejemplo, se estima que 2 millones de casos de enteritis por *Campylobacter* se producen cada año en los EE.UU., que representan el 5-7% de los casos de gastroenteritis. Por otra parte, en

el Reino Unido durante el año 2000, *Campylobacter jejuni* estuvo involucrado en el 77,3% de todos los casos de enfermedades transmitidas por alimentos. Alrededor de 15 por cada 100.000 personas son diagnosticadas con campilobacteriosis cada año, y con muchos casos no denunciados, hasta el 0,5% de la población en general sin saberlo, pueden albergar *Campylobacter* en los intestinos. (Orrego *et al.*, 2014).

En países desarrollados, la diarrea por *Campylobacter* es más frecuente en los meses de verano, siendo afectados todos los grupos étnicos de ambos sexos, no encontrándose portadores sanos. Se considera que un alto porcentaje de infecciones es provocado por consumo de carne de ave mal cocida. En países en vías de desarrollo la enfermedad parece ser más frecuente en niños de corta edad (Salud, 2001)

C. jejuni y *C.coli* son causas importantes de diarreas agudas en viajeros que visitan zonas en vías de desarrollo (Salud, 2001). No soportan durante mucho tiempo situaciones de desecación o congelamiento, característica que limita su transmisión. Sobreviven en la leche, otros alimentos o el agua a 4°C durante una semana. La desinfección con cloro y la pasteurización destruye al microorganismo. De la misma forma que con otros patógenos entéricos, es importante la transmisión fecal - oral (Instituto de Salud Pública de Chile, 2014)

1.3.2 Patogenia.

Como ya se señaló anteriormente, por lo general, *Campylobacter* no actúa como patógeno en el tracto intestinal de los animales. En humanos, no obstante, *Campylobacter* es la causa de gastroenteritis bacteriana más importante a nivel mundial siendo *C. jejuni* y *C.coli* las especies más importantes, seguidas de *C. lari* y *C. upsaliensis* (Bae *et al.*, 2005).

La descripción de la patogenia de *Campylobacter* se centra por tanto en la especie *C. jejuni* por ser esta la especie más estudiada, si bien existen algunas que hacen que aún existan aspectos por comprender en su totalidad. Actualmente se conocen por ejemplo, las diferencias entre *C. jejuni* y otras bacterias que causan gastroenteritis en la expresión de un gran número de factores de virulencia. En este sentido, y con la finalidad de ayudar en la comprensión de la patogénesis de *C. jejuni*, diversos autores han llevado a cabo estudios para determinar las características genéticas, rasgos metabólicos y potenciales factores de virulencia de las cepas de alta virulencia de *C. jejuni* en comparación con el resto de cepas, no obstante, los investigadores señalan que los factores dependientes del hospedador deberían tenerse en

cuenta al discutir la patogenicidad de *Campylobacter* en humanos (Cervantes & Cravioto, 2007).

El conocimiento que tenemos hoy en día sobre la estrategia de colonización de *C. jejuni* en el intestino de los animales es limitado. Aunque la mayoría de las infecciones son de carácter autolimitante y no requieren tratamiento antibiótico (WHO, 2011), en ocasiones pueden producirse complicaciones postinfecciosas como el síndrome de Guillain-Barré, el síndrome de Miller-Fisher y la artritis reactiva. Durante años se ha creído que los lipo oligosacáridos de membrana de *Campylobacter* eran fundamentales para provocar el síndrome de Guillain-Barré y Miller-Fisher. De esta forma, a través del mimetismo molecular entre la estructura de los lipooligosacáridos y los gangliósidos de los nervios periféricos se producen trastornos desmielinizantes que pueden llevar a una parálisis neuromuscular aguda. No obstante, en los últimos años se ha indicado que en algunos casos estas neuropatías inmunomediadas pueden producirse también a través de otros mecanismos diferentes al mimetismo molecular (Cervantes & Cravioto, 2007).

1.3.3 Tratamiento.

El tratamiento de la *Campylobacteriosis* se encamina principalmente a tratar los síntomas, dado que la infección por *Campylobacter* suele curarse por sí misma. La gran mayoría de las personas infectadas con *Campylobacter* se recupera sin ningún tratamiento específico excepto la reposición de electrolitos y la rehidratación. Si la infección por *Campylobacter* evoluciona de forma grave, puede ser necesario un tratamiento con antibióticos. Este es el caso, por ejemplo, de una fiebre elevada o la presencia de las molestias propias de la *Campylobacteriosis* durante más de una semana (Food and Drug Administration, 2007).

1.3.4 En humanos.

El tratamiento a menudo se limita a terapia para reponer fluidos y electrolitos. Ocasionalmente se dan antibióticos, particularmente si los síntomas son graves o prolongados. Los individuos con el síndrome Guillain-Barré requieren normalmente de cuidado intensivo. Los antibióticos pueden reducir la eliminación de organismos infecciosos (Food and Drug Administration, 2007).

1.3.5 En animales.

Los antibióticos pueden ser útiles en algunos casos de enteritis, aunque la información sobre su eficacia es limitada. También pueden prevenir el aborto en ovejas durante un brote. A veces

los toros se tratan con *Campylobacteriosis* genital bovina (las vacas normalmente no, debido a consideraciones prácticas) (Otto, 2004).

1.4. *Campylobacteriosis* en ganado bovino.

Campylobacter fetus, var. *venerealis*, es el agente causal de la campilobacteriosis (antes denominada vibriosis) en el ganado bovino. Aunque la enfermedad rara vez se presenta en rebaños lecheros que usan únicamente inseminación artificial con semen procedente de producción comercial, frecuentemente puede presentarse en ganado bovino de carne. También se podría introducir en vacas lecheras a través de la compra de toros o terneros infectados (Hoffer, 1981).

1.4.1 Síntomas.

En terneros causa una enteritis clínicamente similar a la del hombre. Las terneras presentan fiebre moderada, y diarrea que puede durar hasta 14 días. También es posible que este agente pueda causar mastitis en las vacas, como lo demostraría en forma indirecta el hecho de que el hombre puede contraer la enfermedad por el consumo de leche no pasteurizada. Además, la inoculación experimental de un muy pequeño número de bacterias en la ubre provoca una mastitis aguda (Gomez, 2008).

1.4.2 Diagnóstico.

Las heces o (raramente) los cultivos de sangre se utilizan para el diagnóstico. Un diagnóstico presuntivo puede hacerse mediante la detección de la motilidad característica del organismo con campo oscuro o microscopía de contraste de fase. Bacilos Gram negativos, curva o espirales se ven en los preparativos de Gram manchadas. El diagnóstico definitivo es por el aislamiento del microorganismo causal; sin embargo, *Campylobacter* es frágil y no siempre se puede encontrar. Los medios selectivos o técnicas de filtración mejoran las posibilidades de aislamiento. Las pruebas bioquímicas, pruebas de antígenos y análisis de ADN endonucleasa de restricción se utilizan para las especies y la identificación de cepas (Romero, 2007).

Una técnica que también está disponible para la detección rápida o la confirmación de la especie es la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La serología se utiliza actualmente para buscar anticuerpos contra esta bacteria. (Alicia Torralbo Montoro, 2013).

1.5. Campylobacteriosis en ganado porcino.

1.5.1 Síntomas.

El cerdo es un reservorio de *C. jejuni*, pero es difícil incriminar a este agente como causa de enfermedad diarreica en esta especie doméstica, ya que según estudios realizados en Europa se encuentra una tasa alta de infección en animales clínicamente sanos, es decir, animales sin ningún síntoma aparente; estos estudios se han realizado a través de muestras de heces a nivel rectal transportándose éstas en un medio de transporte adecuado, aislándose la bacteria en el laboratorio (Kashoma *et al.*, 2015).

1.5.2 Diagnóstico.

Los cerdos son colonizados predominantemente por *C.coli*. En mamíferos jóvenes, la proporción es más alta que en animales más viejos. En estos últimos, los organismos se pueden detectar intermitentemente en las heces, probablemente debido al bajo número o a emisiones intermitentes del agente. Han de tomarse muestras recientes (muestras rectales si es posible) y se debe impedir que se sequen. Cuando se utilizan frotis, se debe utilizar un medio de transporte como los de Amies, Cary Blair o Stuart (Alicia Torralbo Montoro, 2013).

1.6. Actividad antimicrobiana.

El estudio del comportamiento de *Campylobacter* a diferentes antimicrobianos ha sido motivo de interés de investigadores de varios países sudamericanos, quienes han puesto en evidencia la aparición de cepas de origen humano y animal, resistentes a eritromicina, tetraciclina, ampicilina y a quinolonas, encontrándose que la resistencia a estas últimas ha sido explosiva, alcanzando tasas superiores al 60% (Food and Drug Administration, 2007).

1.6.1 Resistencia a fluoroquinolonas.

La resistencia está relacionada con la diana principal de acción, la *topoisomerasa II* o *girasa* y fundamentalmente en la subunidad A del ribosoma. No obstante cada vez se da más importancia a la presencia de mecanismos de expulsión que impiden alcanzar concentraciones intracelulares de antibiótico suficientes o dificultan el paso a través de la pared (Chatur *et al.*, 2014)

1.6.2 Resistencia a macrólidos y cetólidos.

Estos grupos de antibióticos por ser hidrofóbicos atraviesan mal la membrana externa por lo que los bacilos gram negativos presentan resistencia natural, aunque modificaciones en las nuevas moléculas como azitromicina parecen disminuir este hecho. Existen además mecanismos de exclusión activa (Daza, 1998). La resistencia por metilaciones que impiden la unión de los fármacos al ribosoma 50S está codificada por plásmidos en transposones, es cruzada y puede ser inducible o constitutiva (también para los de 16 y lincosamidas) y aparece en cocos gram positivos y bacilos anaerobios gram positivos y negativos; también la producción de enzimas transferasas puede determinar resistencia de estafilococos para lincomicina y clindamicina (Luangtongkum *et al.*, 2010).

1.7. Identificación de especies de *Campylobacter*.

Entre las especies de *Campylobacter* que crecen a 42°C, las que con mayor frecuencia se encuentran en muestras de origen animal son *C. jejuni* y *C.coli*. No obstante, se han descrito otras especies menos frecuentes. Por lo general, *C. jejuni* se puede diferenciar de otras especies de *Campylobacter* sobre la base de la hidrólisis del hipurato, ya que esta es la única especie positiva a hipurato que se ha aislado de muestras veterinarias o de alimentos. Se ha descrito la presencia de cepas de *C. jejuni* negativas al hipurato (Oie, 2008).

La sensibilidad al ácido nalidíxico solía ser una de las características más frecuentemente ensayadas, pero hoy en día pueden existir problemas de interpretación, debidos a un aumento de cepas de *C. jejuni* y *C.coli* resistentes al ácido nalidíxico y debido también al aislamiento de genogrupos de *C. lari* sensibles al ácido nalidíxico. Se han descrito en la literatura esquemas más amplios de clasificación en especies. Los resultados de ese tipo de clasificación se deben confirmar mediante la utilización de controles positivos y negativos (Noormohamed & Fakhr, 2014).

1.7.1 Identificación presuntiva.

1.7.1.1 Tinción de Gram.

Las bacterias Gram+ tienen una gruesa capa de peptidoglicano en su pared, mientras que las bacterias Gram- tienen una capa de peptidoglicano más fina y una capa lipopolisacáridica externa. Tras la tinción con el primer colorante (Cristal violeta) se efectúa un lavado con etanol que arrastrará al colorante sólo en las Gram (-), mientras que en las Gram (+) el colorante

queda retenido y las células permanecerán azules. Las células Gram (-) se teñirán después con un colorante de contraste (safranina) para que puedan observarse (Ahumada *et al.*, n.d.).

1.7.1.2 Prueba de catalasa.

El peróxido de hidrógeno es el producto final del metabolismo oxidativo de carbohidratos, a esta vía metabólica recibe el nombre de metabolismo aerobio-oxidativo.

La acumulación del peróxido es muy tóxico por lo que la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas exceptuando a *Streptococcus sp.* producen una enzima llamada catalasa que degrada el peróxido de hidrógeno obteniendo agua y oxígeno gas (Oie, 2008).

1.7.1.3 Prueba de oxidasa.

Todas las bacterias aerobias obtienen su energía en forma de ATP a partir del proceso de respiración también llamado cadena respiratoria, este se lleva a cabo en la membrana celular bacteriana, en las siguientes líneas se dará una breve explicación de la cadena respiratoria solo con la finalidad de entender de donde proviene y que realiza la enzima citocromo C oxidasa, entiéndase que todo este proceso tiene la finalidad de producir ATP.

En la respiración hay una secuencia de enzimas y transportadores que pasan los electrones desde sus sustratos hasta llegar al citocromo C, la enzima llamada citocromo C oxidasa le quita electrones al citocromo C, estos electrones son transferidos por la enzima al oxígeno siendo este el último aceptor de electrones en la cadena respiratoria, finalmente debido a que el oxígeno tiene un exceso de electrones puede atraer átomos de Hidrógeno formando dos posibles productos: agua o peróxido de hidrógeno (Oie, 2008).

1.7.1.4 Prueba de motilidad.

Se realiza por microscopía de contraste de fase o campo oscuro; se observa microorganismos espirilados o con forma de S con movimientos en espiral o en tirabuzón (Oie, 2008).

1.7.2 Identificación final.

1.7.2.1 Sensibilidad al ácido nalidíxico.

En el laboratorio se evalúa la respuesta del *Campylobacter* a uno o a varios antimicrobianos, y traducir, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica (Rivera *et al.*, 2011).

1.7.2.2 Hidrolisis del hipurato.

Demuestra la capacidad de algunas bacterias para hidrolizar el hipurato de sodio ácido benzoico y glicina por la acción de la enzima hipuricasa. Como indicador de la reacción se utiliza ninhidrina. Esta prueba se utiliza en la identificación de *C. jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Gardnerella vaginalis* y *Streptococcus agalactiae*. Esta prueba demuestra la presencia de la enzima β - galactosidasa. (Prieto Gomez, 2012).

1.8. Identificación molecular de *Campylobacter*.

Esta técnica molecular se basa en la utilización de cebadores universales diseñados en diferentes zonas conservadas en bacterias, que permiten amplificar regiones variables características de género y de especie (Stoyanchev, 2004).

Se han presentado previamente en la literatura métodos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de *Campylobacter* en muestras de heces de los animales y en muestras de carne enriquecida. Los ensayos multiplex han sido diseñados para detectar la presencia de dos o más especies en la misma muestra (Linton, Lawson, & Owen, 1997).

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

2.1. Recolección de muestras.

El estudio para la determinación de *Campylobacter* en ganado bovino se lo realizó en pastizales y campos en la ciudad de Loja en el periodo de marzo – julio 2016 donde se recolectaron 100 muestras fecales de vacas, en el mismo periodo se recolectó 30 muestras fecales de ganado porcino en la planta faenadora Cafrilosa de la ciudad. Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica Particular de Loja.

2.2. Aislamiento e identificación fenotípica de *Campylobacter* spp.

Las muestras fueron transportadas al laboratorio en medio TEC (transporte y enriquecimiento para *Campylobacter*) (**Anexo 2**). Los tubos con el medio de transporte fueron incubados en microaerofilia por 24 horas a 42 °C y luego fueron sembradas en medio de cultivo selectivo a base de agar sangre más suplemento selectivo Butzler (OXOID).

La incubación de las cajas petri se realizó en jarras de anaerobiosis con sobres CampyGen TM 2.5L (Thermo SCIENTIFIC), con las siguientes condiciones: Temperatura 42 °C, durante 48 horas.

2.2.1 Crecimiento bacteriano

Después de las 48 horas de incubación se identificaron aquellas colonias con crecimiento y apariencia típica de *Campylobacter* que se caracterizan por ser grisáceas, de aspecto acuoso y diseminarse por la estría de la siembra. Para confirmar el crecimiento se hizo un frotis de las colonias sospechosas con tinción Hucker donde identificamos su morfología característica.

2.2.2 Cultivo por filtración pasiva

En cultivos de *Campylobacter ssp.* donde se observó contaminación microbiana se procedió a realizar filtrado en membrana de nitrocelulosa de 0.45 micras (**Anexo 5**) y también se realizaron resiembras por aislamiento en cuadrantes en el medio selectivo Butzler con el fin de obtener cultivos bacterianos puros.

2.2.3 Identificación bioquímica de *Campylobacter* spp.

Para identificar la especie termo tolerantes de *Campylobacter* spp. se procedió a utilizar técnicas bioquímicas como: oxidasa, catalasas e hidrólisis del hipurato (**Anexo 6**), esta última es de gran importancia ya que permite diferenciar las especies *C. jejuni* y *C.coli.* donde la

aparición de una coloración azul púrpura nos indica la presencia de glicina la cual es el producto final de la hidrólisis del hipurato.

2.3. Actividad antimicrobiana

La determinación de la actividad antimicrobiana de las cepas aisladas de *Campylobacter* se realizó mediante el método de difusión en agar Muller Hinton (**Anexo 7**) con 5% de sangre según lo establecido en la técnica del Comité de Antibiograma de la Sociedad Francesa de Infectología (CA-SFM) y del Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) con una turbidez equivalente a 0,5 de la escala de McFarland a una temperatura de 42 °C durante 24 horas siguiendo las recomendaciones del Centro Nacional de Referencia de *Campylobacter* (CNRC, 2012).

Se utilizó seis tipos de antibióticos: ciprofloxacina (CIP-5 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (AMC-20/10 µg), ampicilina (AMP-10 µg), gentamicina (GM-10 µg), eritromicina (ER-15 µg) y ácido nalidíxico (NA-30 µg).

2.4. Crioconservación

Luego de obtener los cultivos con cepas puras, se tomó varias asadas con la cual se inoculó en crio tubos CRIOBANK TM MIXED (COPAN Diagnostics, Inc.) (**Anexo 8**), se mantuvo en reposo alrededor de 20 minutos, se eliminó la glicerina y se almacenó a -80°C de temperatura, esto con la finalidad de conservar las cepas aisladas.

2.5. Identificación molecular de *Campylobacter* spp.

Para la identificación molecular se realizó primeramente la extracción de DNA de cada una de las cepas estudiadas a través del kit de extracción comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit – Promega (**Anexo 9**).

Se realizó PCR – Multiplex en la cual se utilizó cepas control que fueron proporcionadas por el Instituto de Microbiología Clínica de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile. Los primers usados se encuentran en la **Tabla 1**; el volumen final de la reacción fue de 25 µl por cada muestra.

La PCR – Multiplex (**Anexo 10**), se realizó en un termociclador SimpliAmp Thermal Cycler, y posteriormente para visualizar las moléculas de DNA obtenidas de la PCR el producto se corrió

en un gel de agarosa al 1,5% a 300 nm de luz ultravioleta en el equipo Transluminador UV Labnet, utilizando el marcador de 100 bp (Trackit TM 100 pb DNA Ladder INVITROGEN).

La identificación molecular de *Campylobacter* fue analizada de acuerdo al peso molecular de las especies correspondientes según Yamazaki-Matsune *et al*, 2007.

Tabla 1. Secuencias de primers utilizados para la PCR-MMULTIPLEX para identificación de especies de *Campylobacter* spp.

Espece	Tamaño (bp)	Gen	Primer	Secuencia (5'-3')
Género <i>Campylobacter</i>	816	16S <i>Rrna</i>	C412F C1228R	(DNA)- GGA TGA CAT TTT TGG GAG C (DNA)- CAT TGT AGC ACG TGT GTC
<i>C. hyointestinalis</i> Subsp. <i>hyointestinalis</i>	611	23S <i>Rrna</i>	HYO1F HYOFET235R	(DNA)- ATA ATC TAG GTG AGA ATC CTA G (DNA)- GTC TCG CAT AGC TAA CAT
<i>C. coli</i>	502	<i>askt</i>	CC18F CC519R	(DNA)- GGT ATG ATT TCT ACA AAG GGA G (DNA)- ATA AAA GAC TAT CGT CGC GTG
<i>C. fetus</i>	359	<i>cstA</i>	MG3F CF359R	(DNA)- GGT AGC CGC AGC TGC TAA GAT (DNA)- AGC CAG TAA CGC ATA TTA TAG TAG
<i>C. lari</i>	251	<i>glyA</i>	CLF CLR	(DNA)- TAG AGA GAT AGC AAA AGA GA (DNA)- TAC ACA TAA TAA TCC CAC CC
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>Jejuni</i>	161	<i>Cj0414s</i>	C-1 C-3	(DNA)- CAA ATA AAG TTA GAG GTA GAA TGT (DNA)- CCA TAA GCA CTA GCT AGC TGA T
<i>C. upsaliensis</i>	86	<i>lpxA</i>	CU61F CU146R	(DNA)- CGA TGA TGT GCA AAT TGA AGC (DNA)- TTC TAG CCC CTT GCT TGA TG

Fuente: (Yamazaki-Matsune *et al*. 2007).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Prevalencia de *Campylobacter* spp. en ganado bovino.

Durante el periodo de estudio se analizaron un total de 100 muestras recogidas de las heces de ganado bovino donde se obtuvo una prevalencia de 15% (15/100) positivas para *Campylobacter* (Tabla 2).

Tabla 2. Identificación de *Campylobacter* spp, en muestras fecales de ganado bovino.

Muestras	N° de muestras	Porcentaje (%)
Positivas	15	15
Negativas	85	85
TOTAL	100	100

Fuente: El autor

En Latinoamérica existen pocos estudios sobre la prevalencia de *Campylobacter* en bovinos, en Luxemburgo se registran datos similares a los de nuestra investigación donde se reporta una prevalencia del 12.3% (Schneider *et al*, 2008), sin embargo se registran cifras mayores donde Canadá señala una prevalencia del 87% (Hannon *et al*, 2009), de igual manera en países de Europa como Suiza se registra que la prevalencia de *Campylobacter* es del 75% (Jonas, Kittl, Overesch, & Kuhnert, 2015), en Estados Unidos 51.2% (Englen, Hill, Dargatz, Ladely, & Fedorka-Cray, 2007) y en Chile se reporta una prevalencia del 32%. Resultados menores en comparación al de nuestro estudio se registraron en Portugal 19.5% (Cabrita *et al*, 1992), por su parte en países latinoamericanos como Argentina se registra un 1.7% (Piazza *et al*, 1986) y Brasil 0.30% (Scarcelli *et al*, 2005).

Los resultados obtenidos indican que la prevalencia de *Campylobacter* spp, en ganado bovino coincide dentro de la amplia gama de la prevalencia de la especie bovina reportados en los estudios anteriormente descritos, sin embargo en nuestro estudio obtuvimos una tasa de aislamiento baja para *Campylobacter* spp, lo que indica que los resultados de los estudios de prevalencia en la especie bovina son difíciles de comparar debido a los diferentes métodos de aislamiento, diferencias en la toma de muestras, el tipo de espécimen, sistemas agrícolas y ganaderas, las estaciones, las edades de los animales y los tipos de muestras, además la supervivencia prolongada de *Campylobacter* spp. en heces fecales en el suelo puede estar limitada debido a la exposición al aire, secado, y las temperaturas extremas.

3.2. Identificación de especies de *Campylobacter* en ganado bovino.

A determinar las especies de *Campylobacter* en ganado bovino; la especie que sobresalió en nuestro estudio fue *C. jejuni* alcanzando un porcentaje de 73% (11/15) mientras que *C.coli* obtuvo un menor porcentaje de 27% (4/15) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Identificación de especies de *Campylobacter* en ganado bovino.

Especie	N° de muestras	Porcentaje (%)
<i>C. jejuni</i>	11	73
<i>C.coli</i>	4	27
TOTAL	15	100

Fuente: El autor

Este porcentaje es similar a datos reportados en Suiza donde se registra un 73% de prevalencia de *C. jejuni* y un 27% de *C.coli* (Jonas *et al*, 2015), no se encontraron datos superiores a los obtenidos en nuestro estudio, sin embargo otros reportes con menor porcentaje de asilamiento se encuentran en un estudio realizado en Nigeria donde se comprobó que el 65.1% correspondía a *C. jejuni* y el 23% a *C.coli* (Salihu *et al* 2009). En Chile otro estudio reportó la prevalencia de *C.jejuni* con un 58.6% y un 33.3% (Fernández, 2009). Otro estudio realizado en Brasil en el cual se registra 53.3% de *C.jejuni* y 8.4% de *C coli* (Modolo *et al*, 1999). Así mismo en una investigación en Estados Unidos en muestras de ganado bovino de engorde se determinó la prevalencia de *C.jejuni* en un 34,1% y de *C.coli* un 7.7% (Bae *et al*, 2005).

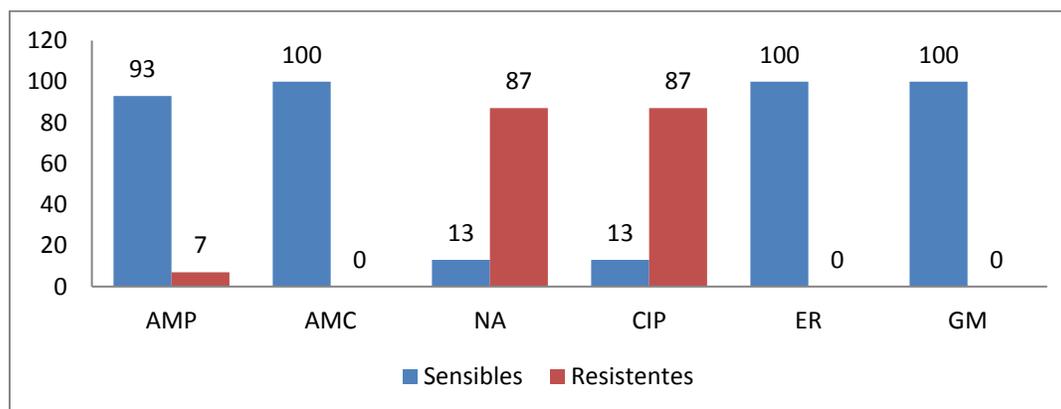
El predominio de *C. jejuni* que existe en el ganado bovino en nuestra investigación concuerda con el amplio número de estudios realizados en la especie bovina reportados en la literatura, la alta prevalencia de esta especie puede estar asociada con el medio ambiente, donde convive este ganado y a la duración de la estancia en el corral ya que el ganado bovino son criados en pastizales y están en contacto con un entorno diverso, sin embargo también depende de una serie de factores, incluyendo el tipo y el tamaño de muestreo, el tipo de rebaño, la estación y la geografía.

En cuanto a *C.coli*, nuestros resultados muestran claramente que es la especie menos aisladas en ganado bovino, como podemos ver en los estudios efectuados en varios países revelan niveles inferiores de incidencia debido a que el reservorio natural de *C.coli* son los cerdos, sin embargo la identificación de esta especie en el ganado bovino puede tener implicaciones para la salud pública como señala Hernández *et al* (2013), *C.coli* es reconocido como la segunda especie más aislada correspondiendo al 10% o 15% dentro de los casos de *Campylobacteriosis*.

Nuestros resultados evidencian la importancia epidemiológica que existe con la presencia de cepas de *Campylobacter* en ganado bovino ya que es potencial fuente de infección capaz de causar enfermedad en los seres humanos, además existe la necesidad de más estudios para poder evaluar las fuentes de contaminación ambiental de ganado bovino.

3.3. Actividad antimicrobiana frente a *Campylobacter* spp. en ganado bovino

En el presente estudio se evaluó la actividad antimicrobiana de 6 antibióticos frente a *Campylobacter* spp. los resultados se detallan en la **figura 1**.



S: sensible; **R:** resistente; **AMP:** ampicilina; **AMC:** amoxicilina-ácido clavulánico; **NA:** ácido nalidixico; **CIP:** ciprofloxacina; **ER:** eritromicina; **GM:** gentamicina

Figura 1. Actividad antimicrobiana de especies de *Campylobacter* en ganado bovino
Fuente: El autor

En el análisis de la actividad antimicrobiana frente a *Campylobacter* en ganado bovino se encontró que las cepas aisladas en el presente estudio fueron resistentes a las quinolonas (ácido nalidixico) y fluoroquinolonas (ciprofloxacina) registrando una resistencia de 87%. En un estudio semejante en Perú la prevalencia de ciprofloxacina resistentes fue de 89,8% (Pollett *et al*, 2012). Existen otros estudios con datos menores como en Polonia la ciprofloxacina y el

ácido nalidixico se determinó una resistencia del 57.1% (Wieczorek & Osek, 2013). De igual forma una investigación en España revela un 52.8% (Oporto, Juste, & Hurtado, 2009) a diferencia de otro trabajo investigativo en Estado Unidos donde se determinó una menor resistencia con un 10.2% al ácido nalidixico y 1.8% a la ciprofloxacina (Englen, Fedorka-Cray, Ladely, & Dargatz, 2005). El aumento de la resistencia de cepas de *Campylobacter* spp a fluoroquinolonas está ligado a una mutación puntual en la región blanco de la topoisomerasa II y tomando en cuenta que este tipo de antibióticos se les da un uso indiscriminado de este antibiótico en la producción animal.

Además una pequeña proporción de los aislamientos de *Campylobacter* fue resistente a ampicilina el cual fue 7%, cifra similar a la descrita en un estudio en Chile donde se obtuvo 6.5% de resistencia (Fernández *et al*, 2000)

Los antibióticos amoxicilina-ácido clavulánico, eritromicina y gentamicina presentan una sensibilidad del 100% y ampicilina del 93%. No se detectó resistencia a la eritromicina, a pesar de los macrólidos se utilizan en el tratamiento de infecciones de la especie bovina. Con respecto a la gentamicina y el fármaco combinado amoxicilina-ácido clavulánico fueron los antibióticos que presentaron una mayor susceptibilidad por lo cual son considerados como antibióticos de elección en la mayoría de los estudios (Tajada, Gomez-Graces, Alós, Balas, & Cogollos, 1996).

Los resultados de las resistencias obtenidos de la investigación indican que el aumento significativo de cepas de *Campylobacter* resistentes a las fluoroquinolonas es similar a los resultados de los estudios ya mencionados mientras que la resistencia a los macrólidos está prácticamente ausente. Teniendo en cuenta que no existen estudios en nuestro país sobre resistencia a los antimicrobianos en *Campylobacter* en ganado bovino, se puede considerar que los resultados obtenidos en este estudio podrían utilizarse como punto de inicio en futuros trabajos investigativos.

3.4. Prevalencia de *Campylobacter* spp. en ganado porcino

De las 30 muestras recolectadas provenientes de materia fecal de cerdos se obtuvo una prevalencia de 27% (8/30) de *Campylobacter* spp (**Tabla 4**).

Tabla 4. Identificación de *Campylobacter* spp, en muestras fecales de ganado porcino.

Muestras	N° de muestras	Porcentaje (%)
Positivas	8	27
Negativas	22	73
TOTAL	30	100

Fuente: El autor

Datos similares se presentan en un estudio desarrollado en Chile en el cual se registró una prevalencia del 32% (Smith S, Pinochet V, Alegria R, Lazo Q, & Freixes C, 1986), también se registraron cifras mayores a las de nuestro estudio como en Francia en una investigación en dos granjas de cerdos donde se obtuvo una prevalencia del 90% (Leblanc-Maridor *et al.*, 2013), otro estudio realizado en Holanda determinaron una incidencia del 85% para *Campylobacter* spp. en cerdos de engorde (M. Weijtens *et al.*, 1993). Bulgaria reporta que la prevalencia fue del 50% (Maramski, 2012). No se registraron datos inferiores los de nuestro estudio.

La prevalencia de *Campylobacter* spp. observada en nuestro estudio es baja en comparación a la encontrada en la literatura, sin embargo, este resultado tiene que ser tomado con precaución teniendo en cuenta el bajo número de cerdos muestreados. Por otro lado la alta prevalencia que existe de *Campylobacter* spp. en ganado porcino se debe a que los cerdos excretan grandes cantidades de *Campylobacter* en sus heces que podrían promover la contaminación en las granjas y corrales donde se encuentran, estas observaciones sugieren una excreción intermitente de *Campylobacter* por parte de cerdos infectados seguida de una nueva contaminación de los cerdos sanos por *Campylobacter* (Weijtens *et al.*, 1999).

3.5. Identificación de especies de *Campylobacter* en ganado porcino

En cuanto a la determinación de la prevalencia según su especie fue 100% (8/8) para *Campylobacter coli* (Tabla 5).

Tabla 5. Identificación de especies de *Campylobacter* en ganado porcino.

Especie	N° de muestras	Porcentaje (%)
<i>C. jejuni</i>	0	0
<i>C.coli</i>	8	100
TOTAL	8	100

Fuente: El autor

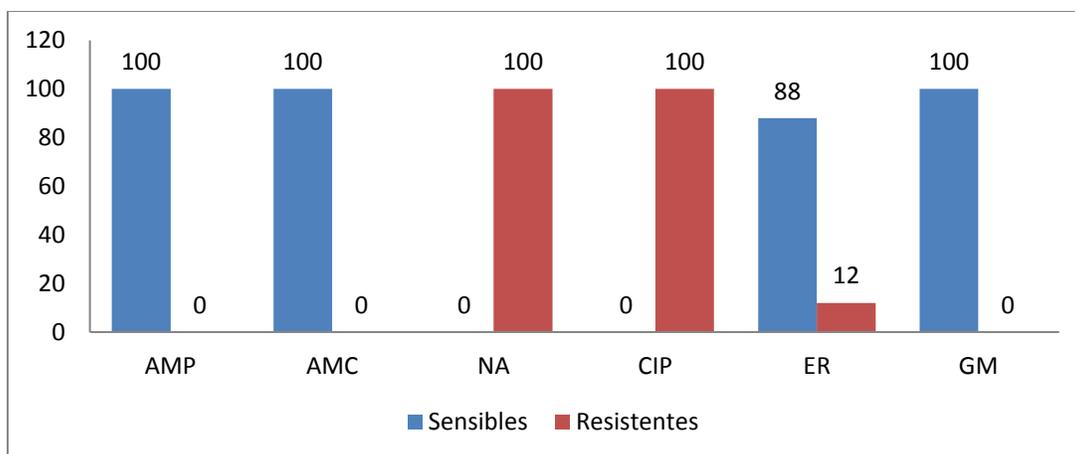
Datos similares a los de nuestro estudio se encontraron en una investigación en Chile donde el 96.8% correspondían a *C.coli* y 3,2% a *C. jejuni* (Smith S, Pinochet V, Alegria R, Lazo Q, & Freixes C, 1986). En Europa varias investigaciones también registran valores similares a los obtenidos en nuestro estudio, así, en Dinamarca la prevalencia en cerdos fue de 0.8% para *C. jejuni* y 92,0% para *C.coli* (Boes & Baggesen, 2005). Datos inferiores a los de nuestros estudios fueron encontrados en Brasil donde la prevalencia de *Campylobacter spp.* en cerdos se evaluó en 120 muestras de heces de cerdo donde de 30 (25%) fueron positivos para *C.coli* y 2 (1,6%) de *C. jejuni* (Mendonça *et al.*, 2015). Sin embargo en Vietnam *C. jejuni* fue predominante con un 38.6% y *C.coli* 14.1% (Carrique-Mas *et al.*, 2014) la prevalencia es notablemente más alta en *C. jejuni* en comparación con nuestro estudio.

De acuerdo a nuestra investigación se encontró una alta prevalencia de *Campylobacter* en cerdos de una faenadora local. De la mayoría de cerdos examinados, solamente se aisló *C.coli*, estos resultados sugieren que en Loja la prevalencia de *C. jejuni* en cerdos es baja ya que en los estudios ya mencionados la prevalencia es similar. Las posibles explicaciones para el hecho de que en algunos estudios han encontrado muy alta prevalencia de *C. jejuni* en cerdos (Finlay *et al.*, 1986; Harvey *et al.*, 1999) debido a las diferencias del medio de cultivo usado en los diferentes estudios los cuales favorecen más a algunas especies (Boes & Baggesen, 2005).

Los resultados obtenidos en la presente investigación evidencian que la alta prevalencia de *C.coli* en cerdos puede dar lugar a la transmisión de *C.coli* para el ganado o aves si estas se encuentran presentes en el mismo rebaño ya que (Gebreyes, Thakur, & Morrow, 2005) señala que la alta prevalencia en los cerdos criados en áreas abiertas podría atribuirse a la transmisión horizontal a través del entorno abierto donde los cerdos tienen libre acceso al suelo y el agua.

3.6. Actividad antimicrobiana frente a *Campylobacter spp.* en ganado porcino

Se evaluó la susceptibilidad antimicrobiana de 6 antibióticos frente a *Campylobacter spp.* los resultados se detallan en la **figura 2**.



S: sensible; **R:** resistente; **AMP:** ampicilina; **AMC:** amoxicilina-ácido clavulánico; **NA:** ácido nalidixico; **CIP:** ciprofloxacina; **ER:** eritromicina; **GM:** gentamicina

Figura 2. Actividad antimicrobiana de especies de *Campylobacter* en ganado porcino.
Fuente: El autor

En general, las cepas aisladas de *Campylobacter* registraron que existe una resistencia del 100% frente al ácido nalidixico y a la ciprofloxacina, datos similares a un estudio realizado en España donde la tasa de resistencia fue de 100% al ácido nalidixico (Sáenz *et al.*, 2000), mientras que en una investigación en Estados Unidos se observa una tasa de resistencia menor con un 3.7 y 3.3% al ácido nalidixico y ciprofloxacina respectivamente (Services, 2008). De igual forma un trabajo investigativo en República Checa la resistencia a ciprofloxacina fue del 53%, ácido nalidixico 35% (Mikuliáková, Steinhäuserová, Borilová, & Nebola, 2005).

Un gran número de cepas fluoroquinolona resistentes se han encontrado en otros países europeos. En Alemania, por ejemplo más de 55% de las cepas aisladas son resistentes al ácido nalidixico; alta incidencia también se encuentra en Italia (45%) y en los EE.UU. (41%) (Pezzoti *et al* 2002; Ge *et al.*, 2003)

La resistencia a la eritromicina en los estudios mencionados fue significativamente mayor a la de nuestra investigación ya que en los diversos estudios las cepas aisladas de *C.coli* de cerdos por lo general son resistentes a la eritromicina. También este resultados nos indica que la prevalencia de la resistencia a la eritromicina es generalmente más alta en cepas *C.coli* aisladas de cerdos que en *C. jejuni* (Engberg *et al.* 2001).

La eritromicina por su parte tiene una resistencia del 12%, no se encontraron datos similares a los de nuestro estudio, sin embargo en España se encontraron datos pero en mayor porcentaje

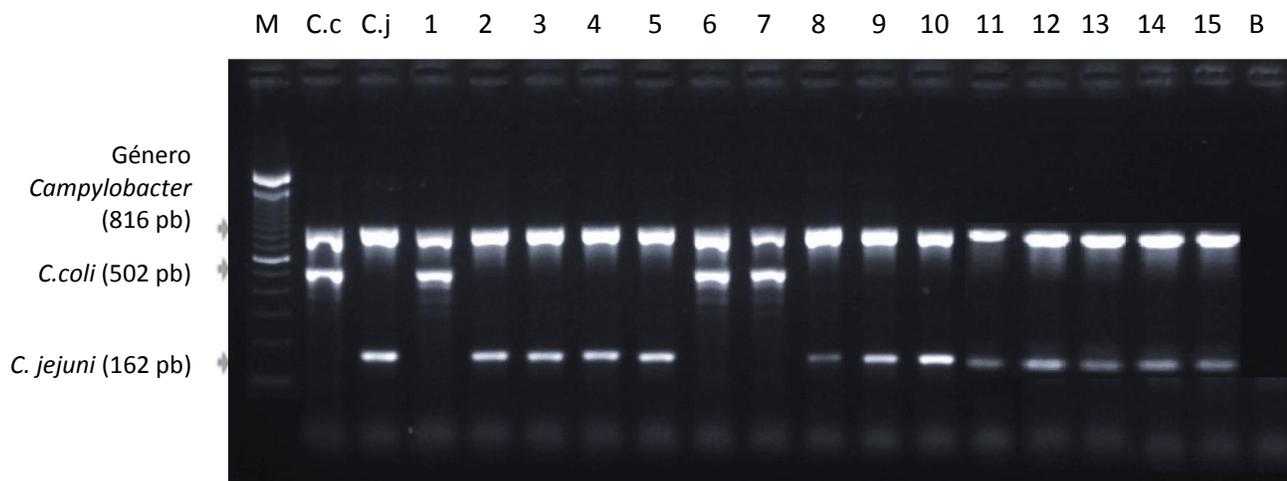
de resistencia a la eritromicina con un 81.1%, en Estados Unidos se registró la resistencia de la eritromicina de un 59.4% y en Republica Checa la resistencia de eritromicina fue del 56,84%

En cuanto a los antibióticos como ampicilina, amoxicilina/clavulanico y gentamicina se presentó un 100% de sensibilidad por lo tanto la resistencia no parece estar muy extendida en cepas de *Campylobacter spp.* Por lo tanto podemos decir que la resistencia a aminoglucósidos y betalactámicos sigue siendo baja en general.

3.7. Análisis molecular de *Campylobacter spp* en ganado bovino y porcino.

Para la identificación de especies de *Campylobacter* por PCR multiplex, la extracción de ADN se llevó a cabo para un total de 15 muestras positivas de heces de ganado bovino y 8 muestras positivas de heces de ganado porcino. En el análisis molecular se identificaron las bandas que distinguen las especies de *Campylobacter*, el género se marca con intensidad a 816 pb, *C.coli* a 502 pb y *C. jejuni* a 162 pb.

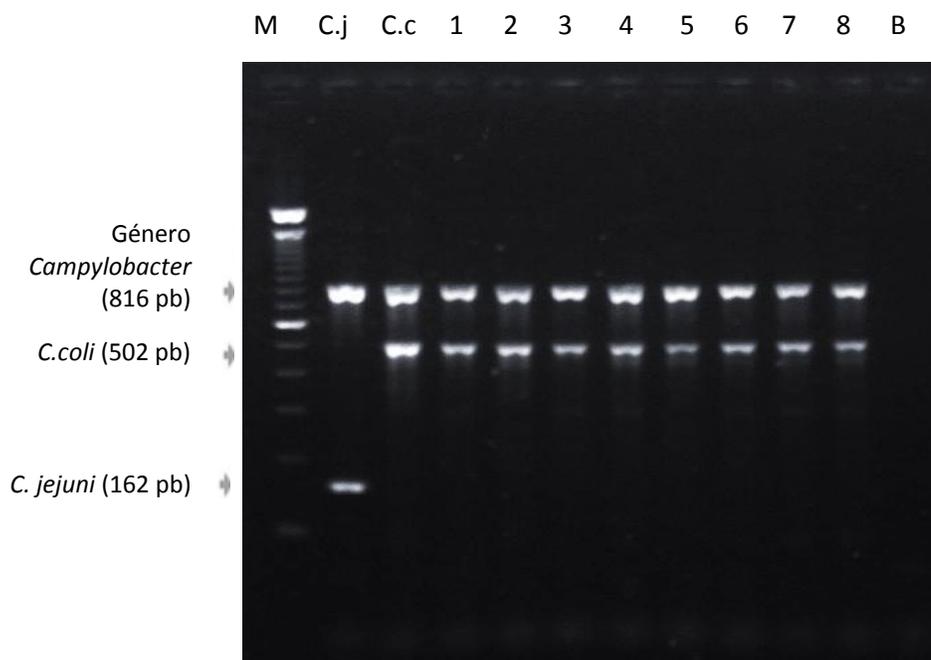
En la **Figura 3 y 4** se muestra un gel de electroforesis representando la aplicación directa del protocolo de PCR multiplex utilizando muestras de heces de vacas y de cerdos.



bp: Pares de bases; **M:** marcador de peso molecular; **C.j:** control positivo *C. jejuni*; **C.c,** control positivo *C.coli*; **1-15:** muestras; **B:** blanco.

Figura 3. Especies de *Campylobacter* aisladas de muestras de ganado bovino.

Fuente: El autor



bp: Pares de bases; **M:** marcador de peso molecular; **C.j:** control positivo *C. jejuni*; **C.c,** control positivo *C.coli*; **1-8:** muestras; **B:** blanco.

Figura 4. **Especies de *Campylobacter* aisladas de muestras de ganado porcino.**

Fuente: El autor

En el presente estudio la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue más eficaz para la detección de *Campylobacter* por lo cual se demostró que las pruebas bioquímicas no son fiables ya que un total de 3 aislamientos (de bovino) mostró que la actividad enzimática hipurato era falsos positivos, por lo que podemos decir que los métodos basados en la PCR son más rápidos y fiables, sobre todo durante el procesamiento de un gran número de muestras.

CONCLUSIONES

- ✓ La prevalencia de *Campylobacter spp* en ganado bovino fue del 15% (15/100).
- ✓ La prevalencia de *Campylobacter spp* en ganado porcino fue del 27% (8/30).
- ✓ Las especies de *Campylobacter* identificadas en ganado bovino correspondieron a: *C.coli* 23% (4/15) y *C. jejuni* 73% (11/15).
- ✓ Las especies de *Campylobacter* identificadas en ganado porcino correspondieron a: *C.coli* 100% (8/8) y *C. jejuni* no registró aislamiento.
- ✓ La actividad antimicrobiana de *Campylobacter spp* en ganado bovino determinó el 87% de resistencia a ácido nalidixico y a la ciprofloxacina.
- ✓ La actividad antimicrobiana de *Campylobacter spp* en ganado porcino mostró el 100% de resistencia a la ciprofloxacina y al ácido nalidixco.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahumada, B., Alexander, B., Torres, C., Angel, M., Hassay, M. D., Corredor, V., & Alexandra, Y. (n.d.). Tinción de gram y observación microscópica.
- Alicia Torralbo Montoro. (2013). *Campylobacter* spp. en granjas y matadero de broilers y en perros domésticos en Andalucía: estudio microbiológico, epidemiológico y de sensibilidad antimicrobiana, 122. Retrieved from <http://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/11089/2013000000830.pdf?sequence=1>
- Bae, W., Kaya, K. N., Hancock, D. D., Douglas, R., Park, Y. H., Besser, T. E., & Call, D. R. (2005). Prevalence and Antimicrobial Resistance of Thermophilic *Campylobacter* spp. from Cattle Farms in Washington State Prevalence and Antimicrobial Resistance of Thermophilic *Campylobacter* spp. from Cattle Farms in Washington State. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(1), 169–174. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.1.169>
- Besser, T. E., Lejeune, J. T., Rice, D. H., Berg, J., Stilborn, R. P., Kaya, K., ... Hancock, D. D. (2005). Increasing Prevalence of *Campylobacter jejuni* in Feedlot Cattle through the Feeding Period Increasing Prevalence of *Campylobacter jejuni* in Feedlot Cattle through the Feeding Period, 71(10), 5752–5758. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.10.5752>
- Boes, J., & Baggesen, D. L. (2005). PREVALENCE AND DIVERSITY OF *CAMPYLOBACTER* IN, 180–182.
- Carrique-Mas, J. J., Bryant, J. E., Cuong, N. V., Hoang, N. V. M., Campbell, J., Hoang, N. V., ... Baker, S. (2014). An epidemiological investigation of *Campylobacter* in pig and poultry farms in the Mekong delta of Vietnam. *Epidemiology and Infection*, 142(7), 1425–36. <http://doi.org/10.1017/S0950268813002410>
- Centro de seguridad alimentaria y Pública. (2013). Zoonotic *Campylobacteriosis* *Campylobacteriosis*. Retrieved from <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/Campylobacteriosis.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>
- Chatur, Y. A., Brahmbhatt, M. N., Modi, S., & Nayak, J. B. (2014). Original Research Article

Fluoroquinolone resistance and detection of topoisomerase gene mutation in *Campylobacter jejuni* isolated from animal and human sources, 3(6), 773–783.

Daza, R. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf Ter Sist Nac Salud*, 22, 57–67. Retrieved from <http://www.msc.es/fr/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>

Delsol, A. a., Sunderland, J., Woodward, M. J., Pumbwe, L., Piddock, L. J. V, & Roe, J. M. (2004). Emergence of fluoroquinolone resistance in the native *Campylobacter coli* population of pigs exposed to enrofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(5), 872–874. <http://doi.org/10.1093/jac/dkh150>

Englen, M. D., Fedorka-Cray, P. J., Ladely, S. R., & Dargatz, D. A. (2005). Antimicrobial resistance patterns of *Campylobacter* from feedlot cattle*. *J Appl Microbiol*, 99(2), 285–291. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02609.x>

Englen, M. D., Hill, A. E., Dargatz, D. A., Ladely, S. R., & Fedorka-Cray, P. J. (2007). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* in US dairy cattle. *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), 1570–1577. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03189.x>

Fao. (2009). Evaluación de riesgos de *Campylobacter* spp . en pollos para asar, 56.

Fernández, H. (2011). *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>

Food and Drug Administration, F. (2007). Resistencia a los antibióticos Resistencia a los antibióticos.

García C, Valenzuela S, Rodríguez L, León C, & Fernández J (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>

Gebreyes, W. A., Thakur, S., & Morrow, W. E. M. (2005). *Campylobacter coli*: Prevalence and antimicrobial resistance in antimicrobial-free (ABF) swine production systems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(4), 765–768. <http://doi.org/10.1093/jac/dki305>

Giacoboni, G., Puchuri, M. C., & Cerdá, R. (1999). *Campylobacter* termotolerantes en menudos

- y carcasas de pollos provenientes de diferentes comercios de la ciudad de La Plata (Argentina). *Analecta Veterinaria*, 19(1/2), 51–54.
- Gomez, R. G. (2008). *Enciclopedia Bovina*. *Enciclopedia bovina*. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Enciclopedia+Bovina#0>
- Hannon, S. J., Allan, B., Waldner, C., Russell, M. L., Potter, A., Babiuk, L. A., & Townsend, H. G. G. (2009). Prevalence and risk factor investigation of *Campylobacter* species in beef cattle feces from seven large commercial feedlots in Alberta, Canada. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 73(4), 275–282. <http://doi.org/10.1128/JCM.01432-08>
- Hoffer, M. A. (1981). Bovine *Campylobacteriosis*: a review. *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Vétérinaire Canadienne*, 22(11), 327–30. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1789996&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Iranzo, E., Sanz, M., Ramón, N., Canet, J., Lorenzo, F., Fernandez, A., & Cucart, A. (2015). *Campylobacter* la bacteria discreta.
- Jonas, R., Kittl, S., Overesch, G., & Kuhnert, P. (2015). Genotypes and antibiotic resistance of bovine *Campylobacter* and their contribution to human *Campylobacteriosis*. *Epidemiology and Infection*, 143(11), 2373–2380. <http://doi.org/10.1017/S0950268814003410>
- Kashoma, I. P., Kassem, I. I., Kumar, A., Kessy, B. M., Gebreyes, W., Kazwala, R. R., & Rajashekara, G. (2015). Antimicrobial Resistance and Genotypic Diversity of *Campylobacter* Isolated from Pigs, Dairy, and Beef Cattle in Tanzania. *Frontiers in Microbiology*, 6(November), 1240. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01240>
- Kassenborg, H. D., Smith, K. E., Vugia, D. J., Rabatsky-Ehr, T., Bates, M. R., Carter, M. a, ... Angulo, F. J. (2004). Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* infections: eating poultry outside of the home and foreign travel are risk factors. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 38 Suppl 3(Suppl 3), S279–S284. <http://doi.org/10.1086/381597>
- Kwan, P. S. L., Birtles, A., Bolton, F. J., French, N. P., Robinson, S. E., Newbold, L. S., ... Fox, A. J. (2008). Longitudinal study of the molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* in cattle on dairy farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3626–3633. <http://doi.org/10.1128/AEM.01669-07>

- Linton, D., Lawson, J., & Owen, R. J. (1997). PCR detection , identification to species level , and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic PCR Detection , Identification to Species Level , and Fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* D, 35(10), 2568–2572.
- Luangtongkum, T., Jeon, B., Han, J., Plummer, P., Logue, C. M., & Zhang, Q. (2010). Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. *Future Microbiology*, 4(2000), 189–200. <http://doi.org/10.2217/17460913.4.2.189>. Antibiotic
- Mendonça, E. P., Melo, R. T. De, Prado, R. R., Monteiro, G. P., Brasão, S. C., Timoteo, M. F., & Rossi, D. A. (2015). *Campylobacteriosis*: an emerging zoonosis, underdiagnosed and underreported by public health agencies in Brazil. *Bioscience Journal*, 31(5), 1458–1474. <http://doi.org/10.14393/BJ-v31n1a2015-27524>
- Mikuliáová, M., Steinhäuserová, I., Borilová, G., & Nebola, M. (2005). Antimicrobial Susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* Strains Isolated from Poultry and Pigs in the Czech Republic *Campylobacter* spp . was originally found to occur in nutrition-related illnesses . Today illnesses caused by *Campylobacter* spp ., 639–644.
- Nelson, J. M., Chiller, T. M., Powers, J. H., & Angulo, F. J. (2007). Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* species and the withdrawal of fluoroquinolones from use in poultry: a public health success story. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 44(7), 977–980. <http://doi.org/10.1086/512369>
- Noormohamed, A., & Fakhr, M. K. (2014). Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of *Campylobacter* spp. in Oklahoma Conventional and Organic Retail Poultry. *Open Microbiol J*, 8, 130–137. <http://doi.org/10.2174/1874285801408010130>
- Oie. (2008). *Campylobacter* *Jejuni* Y. *OIE Manual Sobre Animales Terrestres*, 1–8.
- Oporto, B., Juste, R. A., & Hurtado, A. (2009). Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance profiles of *Campylobacter jejuni* isolated from cattle, sheep, and free-range poultry faeces. *International Journal of Microbiology*, 2009. <http://doi.org/10.1155/2009/456573>
- 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*, 41(2), 2012–2015.
- Otto, G. M. D. (2004). Diagnóstico de *Campylobacter jejuni* en cerdos de abasto a faenarse en el rastro CECARSA a través de cultivos de hisopados rectales. *Biblioteca.Usac.Edu.Gt*, 1–44. Retrieved from http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/10/10_0943.pdf
- 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. <http://doi.org/10.1186/1471-2334-12-193>
- Prieto Gomez, J. (2012). prevalencia, caracterización quimiotaxonómica mediante espectroscopía de infrarrojos e identificación con redes neuronales artificiales y análisis multivariante de especies termofílicas de *campylobacter* aisladas de aves y productos avícolas.
- Ragimbeau, C., Schneider, F., Losch, S., Even, J., & Mossong, J. (2008). Multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and fla short variable region typing of clonal complexes of *Campylobacter jejuni* strains of human, bovine, and poultry origins in Luxembourg. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24), 7715–7722. <http://doi.org/10.1128/AEM.00865-08>
- 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>
- Romero, J. (2007). Enfermedades Venereas de los Bovinos, 1990–1990.
- Sáenz, Y., Zarazaga, M., Lantero, M., José, M., Baquero, F., Torres, C., ... Sa, Y. (2000). Antibiotic Resistance in *Campylobacter* Strains Isolated from Animals , Foods , and Humans in Spain in 1997 – 1998 Antibiotic Resistance in *Campylobacter* Strains Isolated from Animals , Foods , and Humans in Spain in 1997 – 1998. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(2), 267–271. <http://doi.org/10.1128/AAC.44.2.267-271.2000>. Updated
- Salud, M. De. (2001). MANUAL DE PROCEDIMIENTOS *CAMPYLOBACTER* Ministerio de Salud, 1–29.
- Scarcelli, E., Piatti, R. M., Harakava, R., Miyashiro, S., De Campos Fernandes, F. M., Campos,

- F. R., ... Richtzenhain, L. J. (2005). Molecular subtyping of *Campylobacter* Jejuni subsp. Jejuni strains isolated from different animal species in the state of São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(4), 378–382. <http://doi.org/10.1590/S1517-83822005000400014>
- Services, V. (2008). *Campylobacter* on U . S . Swine Sites — Antimicrobial Susceptibility, (December), 6–7.
- Smith S, P., Pinochet V, L., Alegria R, G., Lazo Q, J., & Freixes C, C. (1986). Presencia de *Campylobacter* en cerdos lactantes con diarrea. *Avances En Ciencias Veterinarias*, 1.
- Stoyanchev, T. (2004). Detection of *Campylobacter* using standard culture and PCR of 16S rDNA gene in freshly chilled poultry and poultry products in a slaughterhouse. *Trakia Journal of Sciences*, 2(3), 59–64. Retrieved from http://tru.uni-sz.bg/tsj/Volume2_3/Stoyanchev, T..pdf
- Tajada, P., Gomez-Graces, J. L., Alós, J. I., Balas, D., & Cogollos, R. (1996). Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* to 12 beta-lactam agents and combinations with beta-lactamase inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(8), 1924–1925.
- Unicomb, L. E., Ferguson, J., Stafford, R. J., Ashbolt, R., Kirk, M. D., Becker, N. G., ... Mickan, L. (2006). Low-level fluoroquinolone resistance among *Campylobacter jejuni* isolates in Australia. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 42(10), 1368–1374. <http://doi.org/10.1086/503426>
- Wieczorek, K., & Osek, J. (2013). Characteristics and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from pig and cattle carcasses in Poland. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 16(3), 501–508. <http://doi.org/10.2478/pjvs-2013-0070>

ANEXOS

PROTOCOLOS

ANEXO 1: Tinción de Hucker

1. Fijar la muestra de material fecal sobre un portaobjetos.
2. Dejar secar el frotis en una superficie plana.
3. Colocar unas cuantas gotas de reactivo para tinción de Hucker y una gota de bicarbonato de sodio al 1% por 2 minutos.
4. Lavar y eliminar el restante con agua y dejar secar.
5. Observar con el lente de 100X en el microscopio óptico de campo claro.

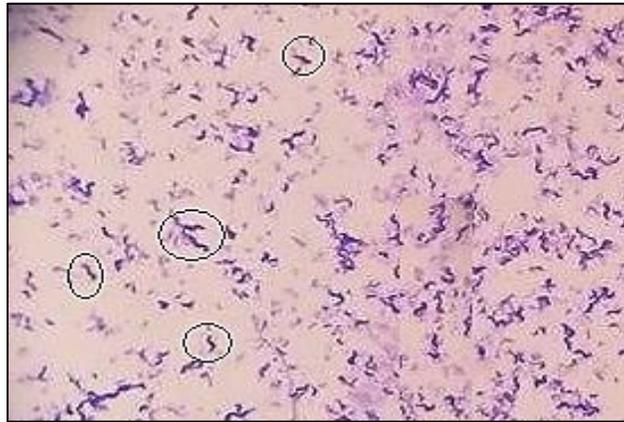


Figura 5. *Campylobacter* spp. Aislado de muestras fecales
Fuente: El autor

ANEXO 2: Preparación de medio de Transporte (TEC)

Nota: Para un volumen de 500 ml

1. Pesar 14.9g de Caldo Tioglicolato
2. Pesar 8g de Agar-Agar
3. Colocar en un Erlenmeyer de 1000 ml el Caldo Tioglicolato y el Agar- Agar.
4. Medir 470ml de agua destilada y verter en el Erlenmeyer.
5. Mezclar todo hasta disolver completamente el medio.
6. Ajustar el pH a 7.
7. Esterilizar mediante calor húmedo en una autoclave a 121°C y 1,5 atm de presión por 20 minutos.
8. Enfriar el medio a 50°C.
9. Agregar 5 ml de antibiótico Butzler previamente reconstituido.
10. Adicionar 7,5 ml de sangre y homogenizar la mezcla.
11. Dispensar 3ml del medio de transporte en tubos con tapa rosca estériles.
12. Conservar el medio a 4°C.

ANEXO 3: Preparación de medio de cultivo Butzler

Nota 1: Para un volumen de 500 ml

1. Pesar 12.5g de Caldo Nutritivo N°2
2. Pesar 5g de Extracto de levadura
3. Pesar 8g de Agar-Agar
4. Colocar en un Erlenmeyer de 1000 ml el Caldo Nutritivo N° 2, extracto de levadura y el Agar- Agar.
5. Medir 470ml de agua destilada y verter en el Erlenmeyer.
6. Mezclar todo y disolver completamente el medio
7. Ajustar el pH a 7.
8. Esterilizar mediante calor húmedo en una autoclave a 121°C y 1,5 atm de presión por 20 minutos.
9. Reconstituir el antibiótico (*Campylobacter* selective supplement Butzler)
10. Adicionar el contenido del vial seleccionado en el medio de cultivo autoclavado cuando se encuentre a 50°C.
11. Agregar 25 ml de sangre al medio de cultivo y homogenizar evitando la formación de burbujas.
12. Dispensar aproximadamente 20 ml del medio por cada caja Petri o Bipetri de 94 x 16 mm, y esperar a que se solidifique el medio.
13. Guardar las cajas de forma invertida a 4°C previamente rotulada la fecha de elaboración del medio de cultivo.

Nota 2: Contenido de antibióticos de cada vial. Reconstituir cada uno con 5 ml de agua estéril.

Butzler:

- Bacitracina 25000 U.I.
- Colistin 10000 U.I.
- Novobioncina 5 mg
- Cicloheximina 50 mg
- Cefazolina 15 mg

ANEXO 4: Aislamiento de *Campylobacter* spp

1. Inocular la muestra y estriar $\frac{1}{4}$ de la superficie total del agar Butzler.
2. Diseminar la muestra mediante estría por agotamiento.
3. Incubar las cajas petri de manera invertida por 48 horas a 42°C en jarras de anaerobiosis en condiciones de microaerofilia conseguida mediante el uso de sobre CampyGen TM 2.5L que brindan un nivel de CO² del 9 al 13%.
4. Pasadas las 48 horas se identifican las colonias sospechosas con la tinción de Hucker.



Figura 6. Aislamiento de especies de *Campylobacter* spp.

Fuente: El autor

ANEXO 5: Filtración en membrana de nitrocelulosa

1. Con un asa estéril tomar de dos a tres asadas de las colonias de *Campylobacter spp* y colocarlas en un tubo con 1ml de agua destilada y dar vortex.
2. Colocar un filtro de nitrocelulosa en medio del agar selectivo Butzler.
3. Colocar 200 μ l de solución sobre el filtro con una micropipeta.
4. Esperar 30 minutos hasta que la solución complete la filtración.
5. Retirar y eliminar el filtro con pinzas estériles.
6. Incubar por 48 horas a 42°C en una atmósfera de microaerofilia.

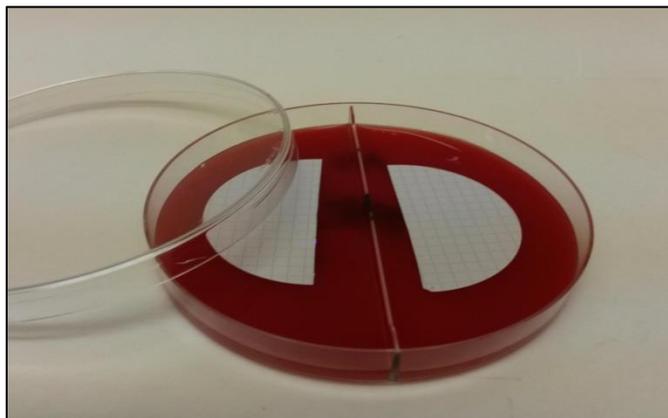


Figura 7. Filtración para aislamiento de *Campylobacter spp.*
Fuente: El autor

ANEXO 6: Pruebas bioquímicas para la identificación de *Campylobacter* spp.

A. Catalasa

1. Colocar con un palillo las colonias de un cultivo puro en un portaobjetos.
2. Agregar 1 gota de peróxido de hidrogeno al 3%
3. Interpretar:

Positivo: Formación de burbujas.
Negativo: Ausencia de burbujas.

B. Oxidasa

1. Colocar con un palillo las colonias de cultivo puro.
2. Poner las colonias en tiras reactivas Oxistrip de Hardy Diagnostics.
3. Interpretar:

Positivo: Coloración azul-violeta en la tira reactiva
Negativo: Ausencia de coloración en la tira reactiva.

C. Hidrolisis del Hipurato

1. Colocar un inculo de cultivo puro en un tubo con 400 µl de solución de hipurato de sodio al 1%.
2. Dar vortex e incubar en un baño María a 37°C por un periodo de dos horas.
3. Agregar 200 µl de solución de ninhidrina y reposar 10 minutos más en el baño María.
4. Interpretar:

Positivo: Coloración azul-violeta intenso
Negativo: Coloración azul tenue o ausencia de coloración

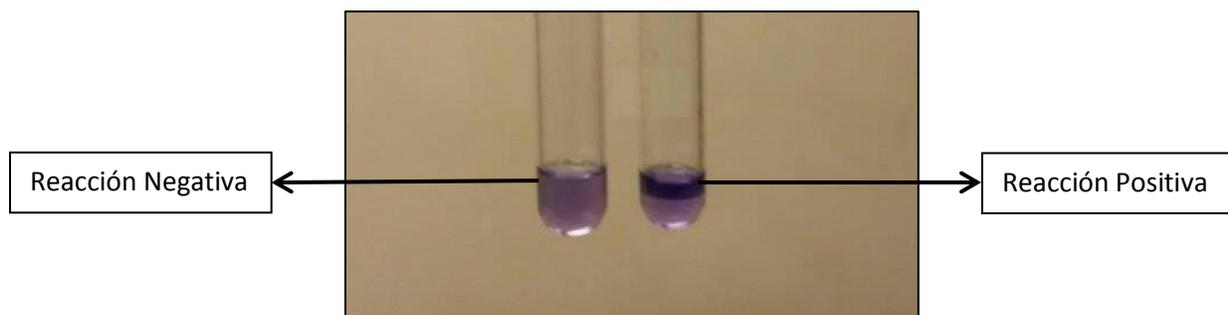


Figura 8. Hidrolisis del hipurato.
Fuente: El autor

ANEXO 7: Determinación de la Actividad Antimicrobiana

1. Colocar con un hisopo las colonias de cultivo puro en 4ml de solución fisiológica hasta alcanzar una turbidez equivalente a 0.5 en la escala de McFarlan.
2. Dar vortex para homogenizar
3. Sembrar mediante hisopado continuo en Medio de cultivo Agar Muller Hilton de la casa comercial Difco™ Laboratories, enriquecido con 5% sangre con un pH de 7.
4. Colocar los discos de antibióticos a una distancia de 30 mm e incubar a 42° C por 48 horas en una atmósfera de microaerofilia.

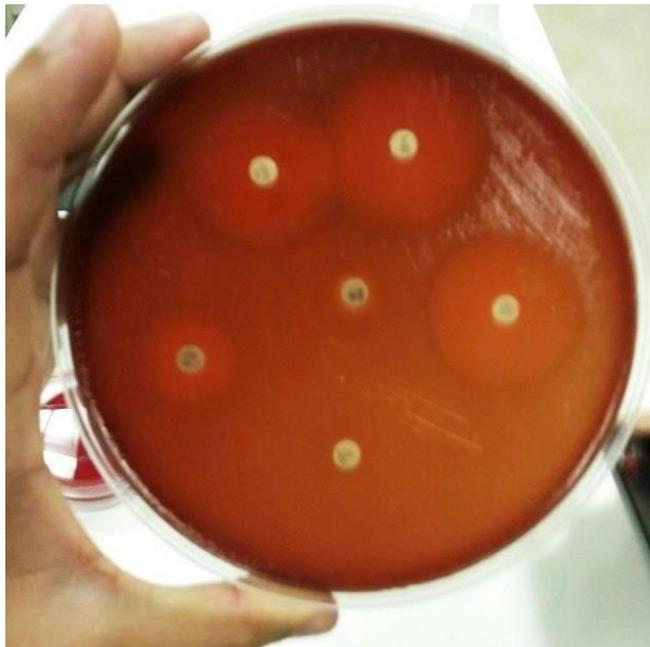


Figura 9. Determinación de la susceptibilidad bacteriana.
Fuente: El autor

ANEXO 8: Crioconservación

1. Tomar las colonias puras con un hisopo estéril.
2. Inocular asépticamente dentro del criotubo.
3. Agitar e invertir suavemente de 5 a 6 veces para homogenizar.
4. Dejar los criotubos invertidos por 20 minutos.
5. Descartar el exceso de crioconservante con ayuda de una micropipeta.
6. Almacenar los criotubos a -80.



Figura 10. Crioconservación de *Campylobacter* spp.

Fuente: El autor

ANEXO 9: Extracción de DNA bacteriano

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 x 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 x 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 sobrenadante puede 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 x 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. Y aspirar cuidadosamente el etanol.
- 16.** Drene el tubo sobre papel absorbente limpio y deje que el precipitado se seque al aire durante 10-15 minutos.
- 17.** 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 o a 4 ° C.
- 18.** Almacenar el ADN a 2-8 ° C.

ANEXO 10: PCR – Multiplex para *Campylobacter* spp.

Tabla 6. Master mix para PCR multiplex.

Especies	Componentes	1X (ul)
	Buffer	5.00
	dNTPs	0.50
	Cl2Mg	1.50
	Primers:	
<i>Campylobacter</i>	C412F	0.05
	C1228R	0.05
<i>C. jejuni</i>	C-1	0.05
	C-3	0.05
<i>C.coli</i>	CC18F	0.05
	CC519R	0.05
<i>C. upsaliensis</i>	CU61F	0.05
	CU146R	0.05
<i>C. fetus</i>	MG3F	0.05
	CF359R	0.05
<i>C. lari</i>	CLF	0.05
	CLR	0.05
<i>C.hyointestinalis</i> <i>subsp.hyointestinalis</i>	HYO1F	0.05
	HYOFET235R	0.05
	Taq	0.125
	H2O	16.17
	DNA	1.00
Volumen Final		25.00

Tabla 7. Condiciones de temperaturas para PCR Múltiplex.

Condiciones:	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	N° ciclos
Desnaturalización inicial	95	10	1
Desnaturalización	95	0.30	35
Anillamiento	59	1.30	
Extensión	72	1	
Extensión final	72	10	1