



**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 niños con y sin diarrea del Hospital Manuel Ygnacio Monteros durante el período abril a junio del 2016.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**AUTOR:** Cabrera Guzmán, Cristian Miguel

**DIRECTORA:** Toledo Barrigas, Zorayda Patricia, 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.

Zorayda Patricia Toledo Barrigas.

### DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

Que el presente trabajo de titulación: **“Especies de *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas aisladas en niños con y sin diarrea del Hospital Manuel Ygnacio Monteros durante el período abril a junio del 2016”** realizado por Cabrera Guzmán Cristian Miguel, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, noviembre del 2016

f .....

**Mgr. Zorayda Patricia Toledo Barrigas**

**Director**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Cabrera Guzmán Cristian Miguel declaro ser autor del presente trabajo de titulación: **Especies de *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas aisladas en niños con y sin diarrea del Hospital Manuel Ygnacio Monteros durante el período abril a junio del 2016**, de la Titulación de Bioquímica Farmacia, siendo Zorayda Patricia Toledo Barrigas 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 .....

Cabrera Guzmán Cristian Miguel

C.I. 1104693385

## **DEDICATORIA**

Con el afecto más grande dedico el fruto de este trabajo de investigación a mis queridos padres y hermanos quienes con su trabajo y sus grandes sacrificios me supieron brindar todo el apoyo necesario para poder culminar con éxitos esta etapa estudiantil, por el inmenso amor, cariño, respeto y por su permanente apoyo incondicional.

A mi mamá Gladis, por ser el motor que me impulsó a esta superación, a ella que es la razón de mi existencia y por quien debo seguir adelante.

Cristian

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente gracias a Dios, por haberme dado fuerza y valor para culminar exitosamente esta tesis.

Agradezco también la confianza y el apoyo de mis padres, que con su esfuerzo y sacrificios han contribuido positivamente para llevar a cabo esta difícil jornada.

A mi querida familia que fueron el pilar inicial de toda esta etapa, gracias por darme esos consejos y el cariño que me encamino a salir adelante, para poder cumplir con este logro.

A mis compañeros que de forma directa contribuyeron al desarrollo del presente trabajo.

De la misma manera agradezco a la Mgtr. Zorayda Toledo, Directora de Tesis, quien con sus sabias y adecuadas orientaciones académicas, hizo posible llevar adelante el presente trabajo de investigación y culminar con el éxito.

Cristian

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA.....	i
APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN .....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.....	6
MARCO TEÓRICO .....	6
1.1    Campilobacteriosis .....	7
1.2 <i>Campylobacter</i> .....	7
1.2.1    Antecedentes.....	8
1.2.2    Taxonomía.....	8
1.2.2.1 <i>Campylobacter jejuni</i> .....	9
1.2.2.2 <i>Campylobacter coli</i> .....	9
1.3    Cultivo .....	9
1.3.1    Características de crecimiento.....	10
1.4    Epidemiología.....	10
1.5    Reservorios .....	11
1.6    Mecanismos de transmisión .....	11
1.7    Patogenia .....	12
1.7.1    Factores de patogenicidad.....	12

1.7.2 Factores Clínicos .....	13
1.8 Secuelas post infección .....	14
1.8.1 Síndrome Guillain Barré (SGB).....	14
1.8.2 Síndrome urémico hemolítico (SUH).....	14
1.9 Tratamiento .....	15
1.10 Resistencia Bacteriana .....	15
1.11 Diagnóstico.....	17
CAPITULO II.....	19
METODOLOGÍA .....	19
2.1 Muestreo .....	20
2.1.1 Identificación fenotípica de especies de <i>Campylobacter</i> spp. ....	20
2.1.1.1 Siembra e incubación de <i>Campylobacter</i> spp. ....	20
2.1.1.2 Aislamiento e identificación de <i>Campylobacter</i> spp.....	20
2.1.2 Identificación Bioquímica .....	21
2.1.3 Identificación molecular. ....	21
2.1.4 Sensibilidad Bacteriana. ....	22
CAPITULO III.....	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	23
CONCLUSIONES .....	30
BIBLIOGRAFÍA.....	31
ANEXOS.....	38
ANEXO 1. PREPARACIÓN DE MEDIO SELECTIVO PARA <i>CAMPYLOBACTER</i> .....	39
ANEXO 2. TINCIÓN DE HUCKER. ....	40
ANEXO 3. FILTRACIÓN DE COLONIAS .....	40
ANEXO 4. HIDROLISIS DE HIPURATO .....	41
ANEXO 5. CRIOCONSERVACIÓN .....	42
ANEXO 6. EXTRACCIÓN DE ADN BACTERIANO .....	42
ANEXO 7. PCR MULTIPLEX PARA IDENTIFICACIÓN DE <i>CAMPYLOBACTER</i> .....	44
ANEXO 8. ELECTROFORESIS .....	45



ANEXO 9. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO. ....	45
ANEXO 10. PREPARACIÓN MEDIO MULLER HILLTON (1000ml) .....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Colonias típicas de <i>Campylobacter</i> spp.....	20
<b>Figura 2.</b> Prueba de hidrólisis del hipurato. ....	21
<b>Figura 3.</b> <i>Campylobacter</i> spp determinadas por PCR-MULTIPLEX.....	26
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de resistencia/sensibilidad a 6 antimicrobianos en <i>Campylobacter</i> spp aislados del HMYM. ....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>Figura 5.</b> Medio Selectivo Butzler.....	39
<b>Figura 6.</b> Tinción de Hucker. ....	40
<b>Figura 7.</b> Filtración en papel milipore. ....	40
<b>Figura 8.</b> Hidrólisis del hipurato.....	41
<b>Figura 9.</b> Crioconservación para <i>Campylobacter</i> .....	42
<b>Figura 10.</b> Kit de extracción de ADN. ....	43
<b>Figura 11.</b> PCR Multiplex. ....	45
<b>Figura 12.</b> Antibiograma.....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Secuencia de primers usados para PCR Multiplex.....	29
<b>Tabla 2.</b> Puntos de sensibilidad de discos frente a <i>Campylobacter</i> spp.....	29
<b>Tabla 3.</b> Frecuencia de aislamiento de <i>Campylobacter</i> spp y especies durante el período abril-junio 2016 en HMYM.....	31
<b>Tabla 4.</b> Mix para PCR múltiple.....	47
<b>Tabla 5.</b> Condiciones de PCR.....	48

## ABREVIATURAS

CA-SFM:	Comité de Antibiograma de la Sociedad Francesa de Infectología
EUCAST:	Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana
HMYM:	Hospital Manuel Ygnacio Montero
ISP:	Instituto de Salud Pública
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RNVE:	Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SGB:	Síndrome Guillain Barré
SUH:	Síndrome Urémico Hemolítico

## RESUMEN

*Campylobacter*, es una bacteria causante de la gastroenteritis en los seres humanos principalmente en los niños y personas inmunodeprimidas, es adquirida al ingerir alimentos contaminados y presenta en la actualidad gran importancia en la salud pública. Con el propósito de obtener información de relevancia clínica se determinó la resistencia antibiótica de las especies de *Campylobacter* termotolerantes en niños menores de 12 años aisladas del Hospital Manuel Ygnacio Monteros durante el período abril a junio del 2016. Se analizó 174 muestras fecales presentándose 5,2% (9) de cepas positivas para *Campylobacter spp.* Al identificar las especies aisladas, *C. jejuni* presentó el 89%(8) mientras que *C. coli* 11% (1). Al analizar la susceptibilidad bacteriana mediante la técnica de difusión en agar se encontró 67% de resistencia para ciprofloxacina y 100% de sensibilidad en eritromicina y gentamicina.

**PALABRAS CLAVE:** *Campylobacter*, gastroenteritis, *C. jejuni*, *C. coli*.

## ABSTRACT

*Campylobacter* is a bacterium that causes gastroenteritis in humans mainly in children and immunosuppressed people, is acquired for ingest contaminated food and currently presents great importance in public health. With the purpose to obtain information clinically relevant antibiotic resistance of thermotolerant *Campylobacter* species in children under 12 years isolated from Manuel Ygnacio Monteros Hospital during the period April to June 2016 was determined 174 fecal samples were analyzed presenting 5.2 % (9) positive strains of *Campylobacter* spp. To identifying the isolated species, *C. jejuni* showed 89% (8) while *C. coli* 11% (1). When analyzing the bacterial susceptibility by agar diffusion technique 67% resistance to ciprofloxacin and nalidixic acid, and 100% sensitivity to erythromycin and gentamicin it was found.

**KEYWORDS:** *Campylobacter*, Stomach flu, *C. jejuni*, *C. coli*

## INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana afecta a todas partes del mundo, y los nuevos mecanismos de resistencia se extienden a escala internacional. La aparición de cepas resistentes es un fenómeno natural que ocurre cuando los microorganismos se reproducen de forma errónea o se intercambian características de resistencia, pero la utilización y el uso indebido de antimicrobianos también acelera su aparición. Las prácticas inapropiadas de control de las infecciones, las malas condiciones sanitarias y la manipulación inadecuada de alimentos propician la propagación de las resistencias (WHO, 2015).

La campilobacteriosis es una de las principales causas de las enfermedades diarreicas de transmisión alimentaria de los seres humanos en todo el mundo y una carga importante en el servicio de salud en muchos países. Entre los diferentes agentes de diarrea bacteriana se encuentran las especies termotolerantes clásicas de *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* y más recientemente *C. upsaliensis*), las cuales son bacterias zoonóticas de amplia distribución en la naturaleza, son bacilos gramnegativos curvos con forma característica de alas de gaviota y motilidad en “sacacorchos” dada por un flagelo polar presente en uno o ambos extremos (Fernández, 2011).

La infección por *Campylobacter* spp, es adquirida al ingerir alimentos mal cocidos, leche, mariscos, agua contaminada; y al ser esta bacteria zoonótica se va a encontrar distribuida en animales domésticos y silvestres, en su tracto gastrointestinal, los mismos que pueden ser portadores sanos o con diarrea (Spicer, 2009).

Las especies que producen manifestaciones clínicas en el hombre son *Campylobacter jejuni*, *C. coli* y *C. lari*, causando cuadros de diarrea inflamatoria que pueden caracterizarse por deposiciones disgregadas o acuosas, con presencia de sangre y mucus, las que se ven favorecidas por los factores de predisposición del huésped y mecanismos de patogenicidad de la bacteria (Fernández & Farase, 2003).

Las especies de *Campylobacter* son las causas más frecuentes de diarrea bacteriana aguda en todos los grupos de edad, con una mayor incidencia en niños menores de 5 años. Este enteropatógeno está asociado frecuentemente a cuadros clínicos de diarrea complicada o diarrea persistente en menores de un año que requieren hospitalización. Sin embargo, la presentación clínica es variable desde diarrea acuosa hasta disentería, y siendo muchas veces la bacteria excretada sin producir síntomas (Rivera *et al.*, 2011).

Fernández (2011) menciona varios aspectos epidemiológicos, clínicos y bacteriológicos de campilobacteriosis en América del Sur en donde estudios detallan que en Ecuador la

frecuencia de aislamiento de *C. jejuni* es de 23% en niños con diarrea, mientras que para *C. coli* en niños con diarrea no existe una frecuencia establecida debido a que el agente causal no ha sido aislado o identificado.

La diarrea por *Campylobacter* es autolimitada, puesto que no requiere del uso de antibioticoterapia pero en casos que las condiciones clínicas del paciente requiera una terapia generalmente las drogas de elección son la eritromicina, especialmente en niños y las fluoroquinolonas en adultos (Reina *et al.*, 1992). Las fluoroquinolonas son agentes antimicrobianos sintéticos con un amplio espectro de actividad antibiótica contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas que actúan por la inhibición de ADN girasa o topoisomerasa IV (Leyva & Leyva, 2008). Sin embargo, en los años recientes, la emergencia de resistencia a estos grupos de antimicrobianos ha complicado el tratamiento empírico de la campilobacteriosis y se ha demostrado que en los últimos años se produjo un incremento en la resistencia de *Campylobacter* a fluoroquinolonas aislados de humanos (González *et al.*, 2013).

La resistencia a los macrólidos y fluoroquinolonas, está mediada principalmente por mutaciones diana cromosómica y activación de flujo de salida. Los objetivos involucrados son las proteínas 23S rRNA ribosomal, L4 y L22 para macrólidos y girasa DNA A (*GyrA*) para fluoroquinolonas (Ge *et al.*, 2013). En la infección por este género se han detectado enterotoxinas y toxinas citopáticas así como actividad citotóxica, en el proceso de infección e invasión intestinal. Teniendo en cuenta que la dosis infectante es baja, se entiende que los alimentos de origen animal son un riesgo apreciable de infección humana, por lo que se consideran actualmente zoonosis emergentes, de frecuencia creciente en todos los países (Rivera *et al.*, 2011).

Considerando inicialmente la poca información existente sobre la aparición de cepas de *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas en el Ecuador y que en los laboratorios de microbiología de la localidad no se efectúa la búsqueda rutinaria de *Campylobacter* con enfoque hacia la importancia epidemiológica, por lo que ha contribuido a que se desconozca la distribución de sus especies.

En los últimos datos publicados se ha reportado un incremento significativo en el número de casos de Campilobacteriosis presentados a nivel mundial como en Perú 18,6% (Ochoa *et al.*, 2010), Argentina 15,29% (Tamborini *et al.*, 2012), Venezuela 13% (Urrestarazu *et al.*, 1999) y en dos comunidades ecuatorianas de Quito 5,5% y Esmeraldas 1,3% (Vasco *et al.*, 2014), principalmente en la región de Loja pese a la escases de estudios en casas de salud la incidencia de 6,8% (Narvaez, 2015) y 8% (Cuenca, 2015) viene considerándose un problema emergente que afecta tanto a seres humanos como animales.



El presente trabajo "Especies de *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas aisladas en niños con y sin diarrea del Hospital Manuel Ygnacio Monteros durante el período abril a junio del 2016" pretende establecer las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos orientando de esa manera la terapia y la vigilancia epidemiológica, para así lograr obtener información de relevancia clínica de la resistencia antibiótica a partir de muestras fecales humanas.

**CAPÍTULO I**  
**MARCO TEÓRICO**

## 1.1 Campilobacteriosis

Desde el año 2005, la campilobacteriosis representa la zoonosis más importante a nivel mundial, la infección se produce por la ingestión de carnes principalmente la de pollo, por subproductos de origen animal y agua contaminada con heces infectadas. Las infecciones por *Campylobacter* son generalmente leves, pero pueden ser fatales entre los niños muy pequeños, ancianos y personas inmunodeprimidas (WHO, 2011).

La campilobacteriosis es una enfermedad infecciosa producida por las bacterias del género *Campylobacter* que en los humanos causan gastroenteritis. La campilobacteriosis humana es causada principalmente por *C. jejuni* más del 80% de los casos y en torno al 10%, por *C. coli* y se asocia con la enteritis aguda y un dolor intestinal que dura 7 o más días (OIE, 2008).

## 1.2 *Campylobacter*

*Campylobacter* spp es uno de los patógenos intestinales más frecuentes, tanto en países desarrollados como en los que están en vías de desarrollo (Fernández & Farase, 2003).

El género *Campylobacter* comprende bacilos Gram negativos de morfología curva, en espiral o con forma de "S" itálica o de "V" de alas de gaviota (Fernández, 2008). El tamaño puede oscilar entre los 0,2 a 0,9 µm de ancho y 0,5 a 5 µm de largo (Jore *et al.*, 2010). Son móviles por flagelación monótrica o anfítrica, que le proporciona moviendo con giros rápidos sobre su propio eje en forma de sacacorchos, por la cual su presencia puede ser distinguida de otras bacterias (Fernández *et al.*, 2000).

*Campylobacter* spp. no sobrevive por debajo de un pH de 4.9 y por encima de pH 9.0 y crece de manera óptima a un pH de 6.5 a 7.5. Estos no formadoras de esporas y bacterias exigentes son esencialmente microaerófilico, crece mejor en un ambiente con baja tensión de oxígeno 5% O<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> y 85% N<sub>2</sub> (Garénaux *et al.*, 2008; Brooks *et al.*, 2014). No fermentan ni oxidan carbohidratos, sino que obtienen su energía a partir de aminoácidos, o intermediarios del ciclo de ácidos tricarboxílicos; siendo la mayoría de las cepas resistentes a la cefalotina (Silva, *et al.*, 2011).

En cultivos antiguos con más de 48h pueden cambiar su morfología y aparecer en forma cocoide que pierden su motilidad (Jore *et al.*, 2010).

### 1.2.1 Antecedentes.

Los primeros hallazgos que describen las bacterias del género *Campylobacter* se remontan a 1886, cuando Escherich observó unos microorganismos con forma de espiral en muestras de heces y en el aparato digestivo de niños que murieron como consecuencia de un proceso de gastroenteritis (Butzler, 2004).

En humanos, el primer brote de campilobacteriosis documentado data de 1938 cuando se constató la presencia de *V. jejuni* en 355 personas con gastroenteritis que habían consumido la misma leche (Butzler, 2004). El género *Campylobacter* no se estableció hasta 1963; al encontrarse que en realidad estos microorganismos no tenían las mismas características bioquímicas que los del género *Vibrio* (Sebald & Verón, 1963). Diez años más tarde, *Vibrio jejuni* y *Vibrio coli* pasaron a ser *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, respectivamente (Verón & Chatelain, 1973).

No fue hasta los años 80 cuando *Campylobacter* fue reconocido como la causa más frecuente de gastroenteritis bacteriana en el hombre (Butzler, 2004), señalando como fuente de infección más importante para los humanos el consumo de carne de pollo (Barot *et al.*, 1983).

### 1.2.2 Taxonomía.

En 1991 se propuso una revisión de la taxonomía y la nomenclatura del género *Campylobacter*. Según el Manual de Bergey, el género *Campylobacter* comprende dieciséis especies y seis subespecies. Más recientemente, se propusieron dos especies más (Vandamme, 2000).

Las especies del género *Campylobacter* spp., se ubican en la clase Épsilon de las proteobacterias, en el orden Campilobacterales, que incluye las familias Wolinella, Helicobacteraceae y Campylobacteraceae. Esta última comprende los géneros *Campylobacter* spp y *Arcobacter* spp (Butzler, 2004).

Entre los diferentes agentes de diarrea bacteriana se encuentran las especies termotolerantes clásicas de *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* y *C. upsaliensis*) que han adquirido gran importancia en Salud Pública, como patógenos intestinales infecciosos para el ser humano (Fernandez, 2011). De hecho, diversos estudios consideran que aproximadamente el seis por ciento de los casos de campilobacteriosis humana se deben al contacto con animales domésticos (Tenkate & Stafford, 2001).

### **1.2.2.1 *Campylobacter jejuni*.**

La especie *C. jejuni* comprende dos subespecies (*C. jejuni* subespecie *jejuni* y *C. jejuni* subespecie *doylei*) que pueden diferenciarse sobre la base de varias pruebas fenotípicas como: la reducción del nitrato, la reducción de selenio, el fluoruro sódico, safranina, y el crecimiento a 42°C, la subespecie *doylei* no crece a 42°C (Garrity, 2005).

La especie más frecuente que causa infección en el hombre es *Campylobacter jejuni* subespecie *jejuni*, considerada como el primer agente de diarrea en el ser humano en los países desarrollados y el segundo o tercero en las naciones en vías de desarrollo (Murray *et al.*, 2007). Tiene una distribución mundial y en los países industrializados se aísla en muestras de deposiciones diarreicas entre dos a siete veces más que *Salmonella* o *Shigella* (Winn *et al.*, 2008).

*C. jejuni* se encuentra en el intestino de animales domésticos como aves, bovinos, ovinos y porcinos y se describe que 90% de las aves de corral son portadoras de *Campylobacter* spp, sin afectar su crecimiento (Farnell *et al.*, 2005).

Aunque las complicaciones son poco frecuentes, *C. jejuni* es un hecho desencadenante importante para el síndrome de Guillain-Barré (Nobuhiro & Hartung, 2012).

### **1.2.2.2 *Campylobacter coli*.**

El *C. coli* es la segunda causa más común de la campilobacteriosis humana (Tam *et al.*, 2003).

Es un agente importante de gastroenteritis y enterocolitis aguda en los seres humanos (Murray *et al.*, 2007). Los síntomas típicos incluyen diarrea acuosa que puede contener células rojas o blancas de la sangre, la enterocolitis inflamatoria, dolor abdominal, fiebre, malestar general, náuseas y vómitos estos suelen durar alrededor de una semana, con las recaídas se producen en el 5-10% de los casos si no se trata, y la persistencia de los síntomas se pueden observar en pacientes inmunocomprometidos (Allos, 2001).

La mayoría de los casos son brotes esporádicos, la infección se asocia principalmente con el manejo de los alimentos y el consumo de carne cruda. El cerdo es el principal huésped (Humphrey *et al.*, 2007).

## **1.3 Cultivo**

Las características de cultivo son de gran importancia para el aislamiento y la identificación de *Campylobacter*. Se necesitan medios selectivos y la incubación debe ser en una atmósfera con O<sub>2</sub> al 5% y CO<sub>2</sub> al 10%. Una forma de producir la atmósfera de incubación

es colocando las placas en un frasco para incubación de anaerobios sin el catalizador y producir el gas con un estuche generador de gas disponible en el comercio o mediante intercambio de gas (Brooks *et al.*, 2014). La incubación de las placas primarias para el aislamiento de *C. jejuni* y *C. coli* debe ser a una temperatura de 42°C. Aunque *C. jejuni* se multiplica bien a una temperatura de 36 a 37°C, la incubación a una temperatura de 42°C impide la proliferación de la mayor parte de otras bacterias entéricas presentes en las heces y por tanto simplifica la identificación de *Campylobacter* (Romero, 2007). Se pueden utilizar varios medios selectivos. El medio contiene antimicrobianos para inhibir el crecimiento de otras bacterias. Los medios selectivos son adecuados para el aislamiento de *C. jejuni* a una temperatura de 42°C; cuando los medios sin antibióticos se incuban a una temperatura de 36 a 37°C, se pueden aislar otros *Campylobacter*. Las colonias tienden a ser incoloras o grises. Pueden ser acuosas y difusas o redondas y convexas y a veces los dos tipos de colonia aparecen en una placa con agar (Brooks *et al.*, 2014).

### **1.3.1 Características de crecimiento**

Los medios selectivos y las condiciones de incubación para su multiplicación, generalmente necesitan una serie breve de pruebas para la identificación. *C. jejuni* y otras especies de *Campylobacter* patógenos para el ser humano son oxidasa y catalasa positivo (Romero, 2007). Los *Campylobacter* no oxidan ni fermentan carbohidratos. Los frotis teñidos con tinción Gram muestran características morfológicas típicas. La reducción con nitrato, la producción de sulfuro de hidrógeno, las pruebas de hipurato y las susceptibilidades a antimicrobianos se pueden utilizar para la identificación adicional de las especies (Brooks *et al.*, 2014).

## **1.4 Epidemiología**

El dramático aumento en América del Norte, Europa y Australia es alarmante, y los datos de partes de África, Asia y el Medio Oriente indican que la campilobacteriosis es endémica en estas áreas, especialmente en los niños. Los factores de riesgo incluyen la avicultura como un importante reservorio y fuente de transmisión a los seres humanos, el consumo de productos de origen animal y el agua, el contacto con los animales, y los viajes internacionales (Kaakoush *et al.*, 2015).

Los síntomas clínicos de las infecciones por *Campylobacter* son diarrea, dolor abdominal, fiebre, dolor de cabeza, náuseas y vómitos, y suelen aparecer entre dos y cinco días después de la infección, pero el período puede oscilar entre uno y diez días (WHO, 2011).

En general, la campilobacteriosis es todavía una de las más importantes enfermedades infecciosas que es probable desafíe a la salud mundial en los años por venir resultando esencial conocer los agentes que causan la enfermedad ya que pueden proporcionar información epidemiológica útil para el diseño de estrategias de intervención.

## 1.5 Reservorios

La bacteria *Campylobacter* está ampliamente presente en la naturaleza, siendo su principal reservorio el tracto digestivo de mamíferos, aves domésticas y salvajes. Los principales reservorios los constituyen las aves de corral, el ganado bovino, ovino, cerdos, roedores, perros y gatos (WHO, 2012).

Las aves de corral comprenden el reservorio más importante a nivel de todo el mundo, *Campylobacter* spp puede ser aislado a partir del 30-100% de las aves doméstica y de especies silvestres (Sack *et al.*, 2001).

La mayoría de los animales de sangre caliente pueden ser colonizados por *Campylobacter*, las aves silvestres y de corral son los principales hospedadores con mayor índice reportado de *C. jejuni* (Wagenaar *et al.*, 2014) a diferencia de *C. coli* que tiene como su reservorio natural a los cerdos (Murray *et al.*, 2014).

## 1.6 Mecanismos de transmisión

Por lo general, se cree que la vía principal de transmisión son los alimentos, a través de la carne y los productos cárnicos poco cocidos principalmente la procedente de aves de corral, la leche cruda o contaminada. El agua o el hielo contaminados son también una fuente de infección (WHO, 2011).

La transmisión desde los animales a los humanos se debe principalmente al consumo y manipulación de alimentos de origen animal, pero también el contacto directo con los animales colonizados puede contribuir a la campilobacteriosis humana (OIE, 2008).

El hombre se puede infectar además de productos alimenticios contaminados por agua poco clorada y tras el contacto con mascotas y ganado. *C. jejuni* y *C. coli* se transmiten vía fecal-oral, pudiendo diseminarse: por contacto directo, fomites incluyendo agua y comida, y moscas que actúan como vectores mecánicos (CReSA, 2013).

La amplia distribución de *Campylobacter* dificulta la elaboración de estrategias de control a lo largo de la cadena alimentaria. Sin embargo, en países que han adoptado estrategias específicas para disminuir la prevalencia de *Campylobacter* en aves de corral vivas, se ha observado una reducción similar al de los casos humanos (WHO, 2011).

## 1.7 Patogenia

*Campylobacter* no actúa como patógeno en el tracto intestinal de los animales (OIE, 2008). En humanos, no obstante, *Campylobacter* es la causa de gastroenteritis bacteriana más importante a nivel mundial (WHO, 2011) siendo *C. jejuni* y *C. coli* las especies más importantes, seguidas de *C. lari* y *C. upsaliensis* (OIE, 2008).

Se ha documentado que personas deficientes en inmunoglobulinas (Igs), las infecciones por campylobacterias pueden ser prolongadas, severas y recurrentes, con frecuencia desarrollando bacteriemia y otras manifestaciones extraintestinales, tales como lesiones cutáneas erisipeloides, osteomielitis (Cervantes & Cravioto, 2007).

*Campylobacter* forma parte de la normalidad intestinal de la flora silvestre, animales domesticados y aves. De particular importancia para los seres humanos es su colonización de los animales utilizados en la producción de alimentos (Sack *et al.*, 2001).

La infección gastrointestinal por lo general es autolimitada y se caracteriza por diarrea acuosa, fiebre, dolor abdominal, calambres y retortijones. Es la infección más común que se presenta en seres humanos (Cervantes & Cravioto, 2007).

*C. jejuni* se adhiere a las células del intestino delgado (yeyuno, ileo) y colon. Se multiplica e invade las células blancas del epitelio. Elabora una toxina que destruye el epitelio mucoso, desempeñando un daño inflamatorio. Esta bacteria vive en el interior de los fagocitos mononucleares por lo que la respuesta inflamatoria no logra controlar la infección. El resultado de la invasión generalmente es una enterocolitis glandular, pérdida de la producción de mucus, abscesos de las criptas y ulceración de la mucosa epitelial (Biberstein & Chung, 1990).

La salud y la edad del huésped y la inmunidad humoral *C. jejuni* influirá en el resultado clínico después de la infección (Altekruse *et al* 1999).

### 1.7.1 Factores de patogenicidad

Los factores determinantes de patogenicidad incluyen la motilidad por la presencia de flagelos, la producción de citotoxinas y la capacidad de invasión y adherencia que se requieren para la unión y la colonización el epitelio intestinal (Janssen *et al.*, 2008).

*Campylobacter* posee dos flagelos bipolares que le permiten motilidad a la bacteria, característica esencial para colonizar células epiteliales en el intestino delgado. El flagelo está compuesto por una flagelina mayor FlaA y una menor FlaB; Posee un rol complejo en la patogenicidad que incluye la secreción de proteínas, esto fundamentalmente se cree ya que las especies de *Campylobacter* no poseen sistemas de secreción tipo 3 o tipo 4 (SST3 y



SST4), que son primordiales en otras especies patógenas entéricas (Cróining *et al.*, 2012; Guerry, 2007).

*Campylobacter* spp tiene la capacidad de producir citotoxinas de distensión (CDT). La toxina CDT, está compuesta por tres subunidades codificadas por los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*, que provoca en las células eucariotas la detención en fase G2/M del ciclo celular, evitando que estas entren en mitosis, y en consecuencia provoca la muerte celular (Ge *et al.*, 2008).

Un factor de importancia en la adhesión de *Campylobacter* a células epiteliales es la proteína CadF que es expresado en todas las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* y se sabe que participa en la adhesión celular uniéndose a fibronectina (Lapierre, 2013).

El gen *cadF* de *C. jejuni* y *C. coli* codifica una proteína de membrana externa de 37 kDa que promueve la unión de estos patógenos a las células epiteliales intestinales (Konkel *et al.*, 1999). CadF juega un rol doble, por un lado su papel en la adhesión a la célula hospedera por unión a la fibronectina, que está localizada en la superficie celular y por otro lado esta unión produce procesos de señalización para la adhesión los cuales conducen a la activación de pequeñas GTPasas Rac1 y Cdc42 y que inducen la internalización de la bacteria en la célula hospedera (Dasti *et al.*, 2010).

En experimentos realizados en cultivos in vitro se ha demostrado que *C. jejuni* se une e invade células epiteliales INT-407 mucho más eficientemente que cepas de la especie *C. coli*. La invasión por su parte, provoca inflamación celular y cuando es acompañada de la producción de citotoxinas, produce una disminución importante en la capacidad de absorción del intestino, provocando el principal síntoma: la diarrea (Silva *et al.*, 2011).

### **1.7.2 Factores Clínicos**

El período de incubación después de la ingesta de *Campylobacter* tiene un promedio de 24-72h, considerándose un inóculo infectante desde 800 organismos que ha demostrado que causa la enfermedad. Los síntomas suelen alcanzar su máxima por 24-48 horas y desaparecen en una semana. Su forma celular y los flagelos dan a *Campylobacter* la motilidad en el entorno viscoso del intestino. Los loci flagelo se asigna a los genes adyacentes, *flaA* y *flaB*; Las mutaciones en estos genes afectan a la capacidad de *C. jejuni* para colonizar el intestino, lo que indica que la motilidad juega un papel importante en la patogénesis del organismo (Sack *et al.*, 2001). También el lipopolisacárido (LPS), tiene actividad endotóxica típica; La estructura del antígeno "O" del LPS contiene ácido siálico, semejante al de los gangliósidos humanos, su presencia en las cepas aisladas de pacientes con síndrome de Guillain Barré sugieren un papel en la patogenia de estas bacterias. Se ha demostrado que las campilobacterias producen proteínas citotóxicas que pueden intervenir

en el desarrollo clínico de la enfermedad, además poseen toxinas extracelulares con actividad citopática y enterotoxinas (Cervantes & Cravioto, 2007).

## **1.8 Secuelas post infección**

El síndrome de Guillain Barré y el síndrome urémico hemolítico son conocidos como las secuelas, posterior a un proceso de campilobacteriosis (Fernández, 2008).

### **1.8.1 Síndrome Guillain Barré (SGB).**

La infección por *Campylobacter* se conoce ahora como la infección antecedente más identificable única asociada con el desarrollo de SGB. *Campylobacter* se cree que causa esta enfermedad autoinmune a través de un mecanismo llamado mimetismo molecular, mediante el cual *Campylobacter* contiene epítomos de gangliósidos como en el resto de lipopolisacárido que provocan autoanticuerpos que reaccionan con los objetivos de los nervios periféricos (Nachamkin *et al.*, 1998).

El síndrome de Guillain Barré es la principal causa de parálisis flácida aguda, con una incidencia mundial del 0.6 a 2.4 casos por 100,000 habitantes, con una relación de 1.5:1 hombre/mujer. Se considera un proceso inflamatorio de los nervios periféricos con afección principal de la mielina. La hipótesis principal respecto a su etiología considera la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra antígenos del sistema nervioso periférico posterior a la presencia de un proceso infeccioso bacteriano o viral como consecuencia de un mimetismo molecular y reactividad cruzada entre los antígenos bacterianos y los epítomos neuronales con la estimulación de células T y la producción de anticuerpo. El tratamiento con gammaglobulina o plasmaféresis han demostrado una eficacia similar, sin embargo se prefiere la administración de gammaglobulina intravenosa en pacientes pediátricos por su seguridad. Se estima una mortalidad cercana al 15% (Mendoza & Galicia, 2010).

La identificación de *Campylobacter* spp en el SGB se ha asociado a peor pronóstico, recuperación lenta, mayor discapacidad neurológica y mayor riesgo de recaída (McCarthy & Giesecke, 2001).

### **1.8.2 Síndrome urémico hemolítico (SUH).**

El síndrome urémico hemolítico es una entidad clínica y anatomopatológica caracterizada por presentación aguda de daño renal, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia, que puede afectar otros parénquimas como intestino, páncreas, corazón y sistema nervioso central. *Campylobacter* spp también ha sido asociado a casos de SUH (Monteverde, 2014).

Esta enfermedad sindrómica puede presentar dos formas, una típica de etiología infecciosa y de características endemoepidémicas, que está precedida por un período prodrómico con diarrea, generalmente sanguinolenta, y que puede presentar además fiebre, vómitos y dolor abdominal. La forma atípica puede ser desencadenada por distintos cuadros como neoplasias, hipertensión arterial, rechazo de trasplante renal, uso de anticonceptivos orales, drogas, post parto (Rivas *et al.*,2006).

## **1.9 Tratamiento**

En su mayoría la enteritis causada por *Campylobacter* no requiere tratamiento ya que suelen ser de corta duración y autolimitados. Solamente si los síntomas son prolongados o muy severos es necesaria la terapia. La enteritis sintomática ha sido tratada con eritromicina como antibiótico de elección con una dosis de 500 a 250mg en adultos y de 30 a 50mg en niños cada seis horas (Romero & Herrera, 2002).

Otros antimicrobianos a utilizarse son las tetraciclinas, cloranfenicol, aminoglucósidos, los macrólidos como eritromicina, azitromicina, claritromicina, roxitromicina, además las quinolonas como ciprofloxacina o ofloxacina. Las fluoroquinolonas son utilizadas frecuentemente para tratar la diarrea del viajero (Romero, 2007).

La mayoría de las personas con campilobacteriosis se recuperan simplemente tras la administración de un tratamiento sintomático, reponiendo los fluidos y electrolitos perdidos, sin necesidad de ningún tratamiento específico (Silva *et al.*, 2011).

## **1.10 Resistencia Bacteriana**

Es la capacidad de una bacteria para resistir los efectos de medicamento antimicrobiano al que era vulnerable. Según la OMS la resistencia bacteriana constituye una amenaza creciente para la Salud Pública Mundial que requiere la adopción de medidas por parte de todos los sectores gubernamentales y de la sociedad en general (OMS, 2015).

La aparición de resistencia en una bacteria se produce a través de mutaciones y por la trasmisión de material genético extracromosómico procedente de otras bacterias (Riverón *et al.*, 2003).

La resistencia bacteriana puede ser de tipo natural que se trasmite de generación en generación con cambios en la secuencia de bases de cromosoma. En el segundo tipo de resistencia adquirido, la transferencia de genes se realiza a través de plásmidos u otro material genético movable como integrones y transposones, esto no solo permite la trasmisión a otras generaciones, sino también a otras especies bacterianas. De esta forma

una bacteria puede adquirir la resistencia a uno o varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con estos (Riverón *et al.*, 2003).

Las infecciones causadas por bacterias multirresistentes causan una amplia morbilidad y mortalidad. Asimismo causan un mayor costo por mayor estancia hospitalaria y complicaciones por lo que sin una acción urgente y coordinada, el mundo se dirige hacia una era postantibióticos en la que infecciones corrientes y lesiones menores que hemos tratado satisfactoriamente durante décadas pueden volver a resultar mortales (WHO, 2015).

La resistencia de *Campylobacter* frente a los antimicrobianos ha aumentado a lo largo de los últimos años, especialmente en el caso de las fluoroquinolonas, tratamiento de elección en humanos, lo que supone importantes consecuencias para la salud pública (Luber *et al.*, 2003).

La resistencia a los antibióticos de *Campylobacter* han sido reportados y esto es reconocido como emergente por la salud pública, el incremento más alarmante en la resistencia es el grupo de fluoroquinolona de los antimicrobianos. Esto se debe a que los pacientes adultos que sufren de enfermedad gastrointestinal grave son propensos a ser tratados con una fluoroquinolona sin confirmación previa del diagnóstico, y si la cepa de *Campylobacter* es resistente a este antibiótico la duración de la enfermedad puede ser prolongada. Una de las principales razones para el aumento de las cepas resistentes a fluoroquinolona en los seres humanos es el uso de estos antibióticos en aves de corral (WHO, 2000).

La resistencia a los macrólidos y fluoroquinolonas, está mediada principalmente por mutaciones diana cromosómica y activación de flujo de salida. Los objetivos involucrados son las proteínas 23S rRNA ribosomal, L4 y L22 para macrólidos y girasa DNA A (GyrA) para fluoroquinolonas. Específicamente, mutaciones puntuales en las posiciones 2074 y 2075 en el dominio V de la 23S rRNA han sido reconocidos como el mecanismo más común para la resistencia a macrólidos en *Campylobacter*, mientras que un único punto de mutación más comúnmente que lleva a Thr-86-Ile en la quinolona resistente a indicar región de GyrA es suficiente para conferir resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas (Ge *et al.*, 2013).

A pesar de que el tratamiento antimicrobiano no es indicación de rutina, en los últimos años se ha hecho importante conocer su susceptibilidad dada la alta tasa de resistencia reportada en la literatura médica (García *et al.*, 2009).

Las fluoroquinolonas, ofrecen una terapia eficaz contra la mayoría de patógenos entéricos, para tratar diarrea bacteriana aguda, ciprofloxacino se utiliza ampliamente como profilaxis

para los viajeros por lo que la aparición de resistencia a estos agentes, ha hecho que su eficiencia sea menos segura.

### **1.11 Diagnóstico**

En humanos el diagnóstico resulta complicado pues la sintomatología de la campilobacteriosis es inespecífica y general de una gastroenteritis (WHO, 2011).

El uso de métodos directos para el diagnóstico de *Campylobacter* implicados en el análisis esta el Gram directo, la microscopia de contraste de fase, las tinciones de Hooker y de Vagó los cuales demostraron ser útiles para el diagnóstico de este patógeno según estudios realizados en América del Sur. Además se incluyen el uso de medios de cultivo selectivos y, adicionalmente se ha utilizado el método de filtración pasiva sobre agar sangre, lo que ha permitido el aislamiento (Fernández, 2011).

Para la recolección de muestras se deben obtener muestras de heces directas del recto, ya sea con hisopo rectal o por evacuación espontánea (Biberstein & Chung, 1990). La toma de muestra mediante hisopado rectal tiene la misma eficiencia en el aislamiento de *Campylobacter* que la muestra obtenida por emisión fecal espontánea (Fernández, 2011). El transporte de las muestras de heces hasta el laboratorio puede realizarse en recipientes convencionales si se prevé que lleguen en el mismo día al laboratorio, en cambio, si tardan más de un día, las heces deben introducirse en un medio de transporte como el medio Cary Blair y mantenerse en refrigeración (Bolton, 2001).

Las muestras de materia fecal pueden ser examinadas a través de la realización de frotis de heces teñidos con Gram utilizando fucsina fenicada (carbolfucsina) como colorante de contraste, debido a que este no se tiñe bien con Safranina (Biberstein & Chung, 1990). La observación en microscopio óptico de bacilos Gram negativos finos y curvos característicos de *Campylobacter* que presentan gran motilidad en forma circular o de sacacorchos nos permite un diagnóstico presuntivo rápido.

Para obtener un aislamiento exitoso de *Campylobacter* a partir de las heces, va a depender del uso de medios selectivos, la incubación a temperatura ambiente (42°) y la atmosfera apropiada de incubación (oxígeno al 5%, CO<sub>2</sub> al 10%, y nitrógeno al 85%). La técnica de filtración de membrana que se utiliza con placas de agar sangre no selectiva es tan eficaz como el uso de medios selectivos para el aislamiento de especies de *Campylobacter* termófilas (Winn *et al.*,2008).

Se realiza mediante la siembra directa en un medio selectivo, que contiene nutrientes y antibióticos capaces de inhibir el crecimiento de la flora del intestino. Entre los medios más

utilizados se encuentran el agar Preston, el carbón cefoperazona desoxicolato (CCDA) y el agar Butzler (Silva *et al.*, 2011).

La identificación de *Campylobacter* se lleva a cabo mediante la descripción de la morfología de la colonia, la tinción de Gram, la motilidad y pruebas bioquímicas como la de la oxidasa, catalasa o hidrólisis del hipurato (Butzler, 2004). La hidrólisis del hipurato permite determinar la capacidad enzimática de un microorganismo para hidrolizar el hipurato de sodio a ácido benzoico y glicina por la acción de la enzima hipurato hidrolasa también conocida como hipuricasa (MacFaddin, 2003).

La PCR es otro método eficaz para la confirmación de los resultados pues las reacciones fenotípicas pueden ser variables y difíciles de leer (Silvia *et al.*, 2011). La eficiencia de la identificación bioquímica es solo del 34% en comparación al 100% que se obtiene por PCR (Denis *et al.*, 1999). Actualmente se han descrito diversos cebadores capaces de unirse de forma específica a diferentes genes permitiendo la identificación de distintas especies de *Campylobacter* en un solo día (Butzler, 2004).

**CAPITULO II**  
**METODOLOGÍA**

## 2.1 Muestreo

Se evaluó 174 muestras de heces provenientes de pacientes menores a 12 años del Hospital Manuel Ygnacio Montero de la ciudad de Loja, durante el período abril – junio del 2016. Las muestras fueron trasladadas a temperatura ambiente, y analizadas en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica Particular de Loja.

### 2.1.1 Identificación fenotípica de especies de *Campylobacter* spp.

El método de detección de *Campylobacter* termotolerante consistió en un proceso estandarizado y específico para este microorganismo.

#### 2.1.1.1 Siembra e incubación de *Campylobacter* spp.

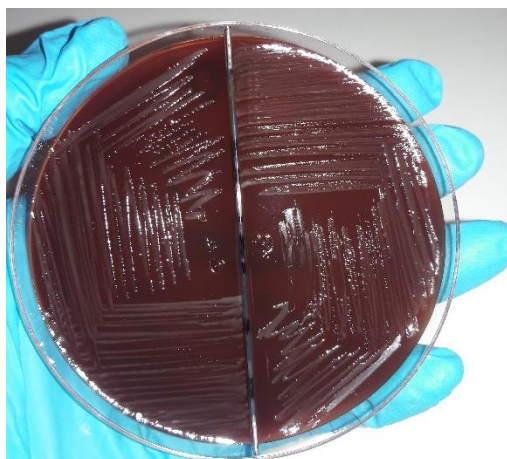
Para la siembra se utilizó el medio de cultivo selectivo para *Campylobacter* compuesto por base de agar sangre suplementado con 5% de sangre y 5% de antibiótico Butzler (**Anexo 1**).

La incubación se la realizó en condiciones de microaerofilia con 5% de O<sub>2</sub> y 10% de CO<sub>2</sub> proporcionado por *CampyGen*<sup>TM</sup> durante 48h a 42°C.

#### 2.1.1.2 Aislamiento e identificación de *Campylobacter* spp.

El aislamiento de *Campylobacter* se lo realizó a partir del crecimiento de las colonias grisáceas no hemolíticas que van en continuidad con el estriado del cultivo primario, e identificándolas por su morfología característica con la tinción de Hucker (**Anexo 2**).

Mediante la resiembra de las colonias por estriado de cuadrantes se trató de obtener las colonias puras sin contaminación bacteriana (**Figura 1**).



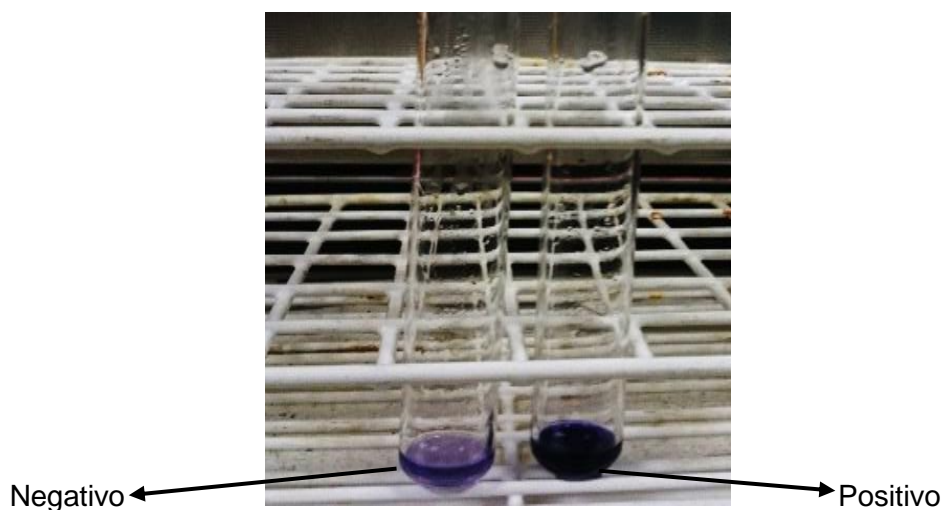
**Figura 1.** Colonias típicas de *Campylobacter* spp.  
**Fuente:** El autor



También se realizó el método de filtración (**Anexo 3**), usando papel filtro Milipore 0.45um para evitar la presencia de flora acompañante en las cepas del crecimiento bacteriano.

### 2.1.2 Identificación Bioquímica.

Se procedió a usar la prueba de hidrólisis del hipurato (**Anexo 4**), para identificar y diferenciar las cepas de *C. jejuni* y *C. coli*, tomando como referencia la aparición de un color púrpura intenso que pondrá de manifiesto la presencia de glicina, como resultado positivo para *C. jejuni*. Si el hipurato no se hidroliza a glicina, tras la adición del reactivo ninhidrina no habrá cambio de color, dando un resultado de la prueba negativa perteneciendo a la especie de *C. coli* (**Figura 2**).



**Figura 2.** Prueba de hidrólisis del hipurato.

Fuente: El autor

Luego de obtener los cultivos puros en el medio se crioconservó las cepas positivas (**Anexo 5**), a -80°C en los tubos CRIOBANK™ para que permanezcan genéticamente estables.

### 2.1.3 Identificación molecular.

Para la identificación molecular se realizó PCR-Multiplex previa extracción de ADN de las cepas bacterianas usando el Kit comercial The Wizard® Genomic DNA (**Anexo 6**).

La PCR múltiple permitió confirmar las especies de *Campylobacter* spp. caracterizadas fenotípicamente y resultó útil para la identificación de aislamientos con resultados de difícil interpretación en la prueba de hidrólisis del hipurato.

Se realizó PCR Multiplex (**Anexo 7**) siguiendo los protocolos estandarizados por Yamazaki *et al.*, 2007. Los productos de PCR fueron distinguidos por una diferencia en el tamaño mediante electroforesis (**Anexo 8**) en gel de agarosa al 1.5% (Yamazaki *et al.*,2007).

**Tabla 1.** Secuencia de primers usados para PCR Multiplex.

<b>Especie</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Gen</b>	<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>
Género <i>Campylobacter</i>	816pb	16S Rrna	C412F C1228R	5-GGA TGA CAT TTT TGG GAG C-3 5-CAT TGT AGC ACG TGT GTC-3
<i>C. coli</i>	502pb	<i>Askt</i>	CC18F CC519R	5-GGT ATG ATT TCT ACA AAG GGA G-3 5-ATA AAA GAC TAT CGT CGC GTG-3
<i>C. jejuni</i>	162pb	cj0414§	C-1 C-3	5-CAA ATA AAG TTA GAG GTA GAA TGT-3 5-CCA TAA GCA CTA GCT AGC TGA T-3

Fuente: Yamazaki *et al.*,2007

#### 2.1.4 Sensibilidad Bacteriana.

Se usó el método de difusión en disco (**Anexo 7**), en agar Muller Hillton suplementado con sangre humana al 5% (**Anexo 8**) para determinar la sensibilidad bacteriana de *Campylobacter* siguiendo las recomendaciones del EUCAST 2016.

Los discos de antibióticos utilizados fueron ciprofloxacina (CIP-5µg), amoxicilina - ácido clavulánico (AMC 20/10µg), ampicilina (AMP-10µg), gentamicina (GM-10µg) y eritromicina (ER-15µg).

**Tabla 2.** Puntos de sensibilidad de discos frente a *Campylobacter* spp.

<b>Antibiótico</b>	<b>Sensible S ≥</b>	<b>Resistente R ≤</b>
Ciprofloxacina	26	26
Amoxicilina / Acido clavulánico	19	14
Gentamicina	17	17
Eritromicina	20	20
Ampicilina	19	14

Fuente: EUCAST/SFM/CA-SFM, 2016.

**CAPITULO III**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En el estudio realizado se recolectó 174 muestras en niños con y sin diarrea del Hospital Manuel Ygnacio Monteros en la ciudad de Loja, con edades entre un mes a 12 años; Dichas muestras fueron objeto de un proceso microbiológico mediante el cual se pudo establecer la prevalencia de *Campylobacter*.

**Tabla 3.** Frecuencia de aislamiento de *Campylobacter* spp y especies durante el período abril-junio 2016 en el Hospital Manuel Ygnacio Monteros.

Número de Muestras	Cepas Positivas	Porcentaje	Especies	
			<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
174	9	5.2%	8(89%)	1(11%)

Fuente: El autor.

De las 174 muestras analizadas, se encontró una frecuencia de aislamiento del 5.2% (9/174) (**Tabla 3**) del género *Campylobacter* spp. perteneciendo el 89% a la especie *C. jejuni* y 11% a *C. coli*.

La campilobacteriosis es la enfermedad entérica bacteriana más común en países en vías de desarrollo como el nuestro donde se desconoce, puesto que el sector de salud no lleva un control diagnóstico de las enfermedades diarreicas.

En frecuencia porcentajes similares se encontró en un estudio realizado en Uruguay 5.9% (Notejane *et al.*, 2015), Bolivia 4.1% (Denno *et al.*, 2005) en pacientes ambulatorios. En Argentina se reportó una frecuencia del 3.2% presente en niños menores de 5 años con enfermedad diarreica aguda los cuales estaban asociados a condiciones como: hospitalización, deshidratación, desnutrición y fiebre en la mayoría de pacientes. Se obtuvo una tasa de aislamiento sin diferencias con respecto a: sexo, nivel socioeconómico y estado nutricional de los niños, evidentemente no existe ningún tipo de relación (Notario *et al.*, 1993). Valores menores se encontró en Chile con prevalencia de 2.1% (Rivera *et al.*, 2011) es importante mencionar que se han tomado diversas medidas de prevención y control.

En dos comunidades ecuatorianas se reportó datos de 5.5% en Guamaní (Quito) y 1.3% en Borbón (Esmeraldas) (Vasco *et al.*, 2014), en una investigación realizada en Loja muestra porcentaje de 6.8% (Narvaez, 2015) de frecuencia de aislamiento para *Campylobacter*.

Cifras mayores se presentaron en otros países, como es el caso de Perú en el año 2002 con prevalencia del 13.3% (Perales *et al.*, 2002) la cual aumentó en el 2010 a 18,6% (Ochoa *et al.*, 2010) cifra alarmante en pacientes pediátricos menores a dos años en zonas

periurbanas que presentaban cuadros diarreicos. En Venezuela los informes reportados, notifican que la prevalencia de *Campylobacter* es de 13% (Urrestarazu *et al.*, 1999). En la Pampa (Argentina) se aisló 15.29% de *Campylobacter* spp. en pacientes que convivían con animales (perros, gatos y pollos) en los que se detectó este patógeno sugiriendo la posible exposición a una misma fuente de infección a través de la alimentación, o bien, la transmisión de *Campylobacter* entre los pacientes y sus mascotas (Tamborini *et al.*, 2012).

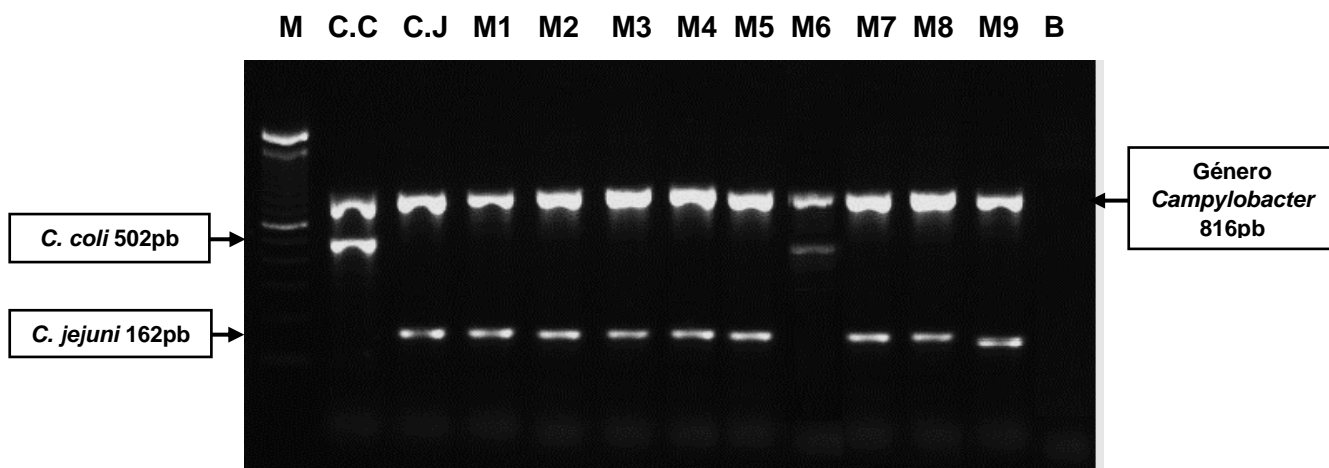
Cabe mencionar que en este estudio las muestras positivas en el 67% fueron no diarreicas confirmando el hallazgo frecuente de portadores sanos en países sudamericanos, relacionados con bajas condiciones de saneamiento básico, estos promueven mayormente las oportunidades de transmisión de las especies diarrogénicas de *Campylobacter*, primordialmente a niños de temprana edad (Fernández, 2011).

Los 9 pacientes cuyos aislamientos fueron positivos para *Campylobacter* spp, el 78% eran menores de 4 años, demostrando que existe mayor probabilidad de que la bacteria se presente en este grupo etario. Los países en desarrollo han realizado numerosos estudios los cuales ayudaron a definir que las infecciones por *Campylobacter*, y en particular *C. jejuni*, son más frecuentes en niños menores de 5 años (ISP, 2014). De igual manera un estudio realizado en Argentina con 50 pacientes cuyos aislamientos fueron positivos para *Campylobacter* spp., el 78 % eran menores de 4 años (Tamborini *et al.*, 2012).

La identificación de especies de *Campylobacter* fue realizada mediante pruebas bioquímicas y confirmada por PCR (**Figura 3**). *C. jejuni* es la especie más comúnmente involucrada en enfermedades diarreicas, responsable del 80 - 85% de las infecciones entéricas (Hernández *et al.*, 2011) tanto en los países industrializados como en países en vías de desarrollo sin diferir por estratos los signos y síntomas clínicos (Fernández, 2011), *C. coli* es un patógeno humano importante responsable de 5% a 15% de los casos de enterocolitis causadas por *Campylobacter* spp (Gaudreau *et al.*, 2008).

Se encontró un porcentaje de 89%(8) para *C. jejuni* datos similares a los encontrados en un estudio en la región de Loja 91,7% (Narvaez, 2015), Canadá 90,9% (Levesque *et al.*, 2013), Perú 82,9% en un período de diez años (Pollett *et al.*, 2012) y España 80,2% (RNVE, 2012). Además concuerda con datos otorgados por el ISP de Chile al presentarse con 79,2% (ISP, 2014), Brasil 78,6% (Rivera *et al.*, 2011), en dos comunidades ecuatorianas 66,7% (Vasco *et al.*, 2014) y Bolivia 63% (Orrieta, 2009). Se presentan cifras mayores en Argentina 96% (Tamborini *et al.*, 2012) y Chile 100% (Rivera *et al.*, 2011) datos que hacen constancia que es la especie más predominante involucrada en las enfermedades diarreicas producidas en pacientes pediátricos además confirma que *C. jejuni* ha sido la causa más frecuente de

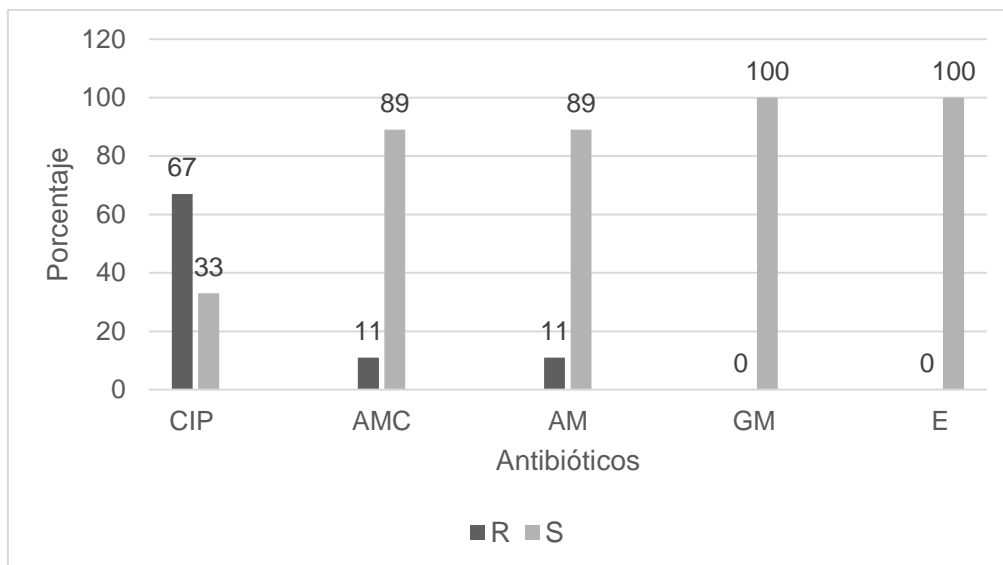
diarreas infecciosas agudas, superando las infecciones causadas por *Salmonella* spp y *Shigella* spp (Hernández *et al.*, 2011).



**Figura 3.** *Campylobacter* spp determinadas por PCR-MULTIPLEX.  
**M:** Marcador de peso molecular de 100 pb, **C.J:** *C. jejuni*, **C.C:** *C. coli*, **M1-9:** muestras, **B:** blanco.  
**Fuente:** El autor.

En la especie de *C. coli* se reportó 11%(1), en estudios realizados describen resultados similares a los obtenidos, es el caso de Perú con 11,9% (Pollett *et al.*, 2012) de muestras positivas para *C. coli* datos que concuerdan con Chile 15,2% (ISP, 2014) cifra considerablemente mayor debido a que el análisis menciona que se lo efectuó en diversos sectores rurales y urbanos. Cifras menores se halló en un estudio previo en Loja 8.3% (Narvaez, 2015), Canadá 5% (Levesque *et al.*, 2013), España 4,1% (RNVE, 2012), Argentina 4% (Tamborini *et al.*, 2012) tomando en consideración que los pacientes eran menores de 4 años tales divergencias pueden deberse al número limitado de casos en este grupo de edad. En Concepción (Chile) no se reportó *C. coli* en las muestras humanas en niños de 0 a 14 años (Rivera *et al.*,2011) destacando el hecho de no encontrar cepas de *C. coli* y una baja prevalencia de *Campylobacter* como género.

Porcentaje mayor presentó Bolivia con 30% (Orrieta, 2009) y en otros estudios de nuestro país con 33.3% (Vasco *et al.*, 2014) es posible que exista una vinculación del medio ambiente y el consumo de alimentos con la mayor frecuencia de aislamiento para *C. coli* como agente de diarrea en esta región.



**Figura 4.** Porcentaje de resistencia/sensibilidad a 6 antimicrobianos en *Campylobacter* spp aislados del HMYM durante el período abril-junio 2016.

**CIP:** ciprofloxacina; **AMC:** amoxicilina/ácido clavulánico; **GM:** gentamicina; **E:** eritromicina; **AMP:** ampicilina; **R:** resistente; **S:** sensible

**Fuente:** El autor.

El análisis de susceptibilidad antibiótica reveló que las cepas de *Campylobacter* presentan resistencia para ciprofloxacina 67%, ampicilina y amoxicilina-ácido clavulánico 11% mientras que demostraron sensibilidad de 100% para gentamicina y eritromicina (**Figura 4**) siendo estos los fármacos de primera elección para el tratamiento de la campilobacteriosis.

La resistencia presentada por ciprofloxacina concuerda con Argentina 65% (Tamborini *et al.*, 2012), Perú 72.6% (Pollett *et al.*, 2012), además con dos localidades en Chile 32,24% (García *et al.*, 2009) y 33,3% (Rivera *et al.*, 2011). Es importante mencionar que los niveles de resistencia a ciprofloxacina está presente en cepas aisladas principalmente de pacientes pediátricos en los cuales no se utilizan quinolonas como tratamiento empírico de diarrea. El aumento de la resistencia de *Campylobacter* a las quinolonas va en aumento con la introducción de estos fármacos en la industria avícola, principalmente enrofloxacin, cuyo metabolito activo es ciprofloxacina (García *et al.*, 2009) una situación fehaciente, ya que el consumidor es considerado el eslabón final en la cadena de producción de carne de pollo, tiene gran parte de la responsabilidad en cuanto a la protección de contaminación cruzada en los alimentos en general y específicamente de la carne de pollo la cual ha mostrado un mayor índice de prevalencia.

Dato alarmante es el de España con 89% donde los niños en su mayoría presentaban una situación de inmunodeficiencia como enfermedad de base (Gonzalez & Sanz, 2013) por lo que CIP no sería una opción terapéutica apropiada para utilizarse en el tratamiento empírico de *Campylobacter* spp.

En los resultados obtenidos de la sensibilidad en eritromicina y gentamicina fueron del 100% siendo similares con los publicados en Chile (García *et al.*, 2009; Gatica, 2013) con el mismo porcentaje de sensibilidad reportado en ambos fármacos. Con lo que respecta a eritromicina otros autores corroboran nuestros resultados como en Perú (Pollett *et al.*, 2012) donde ninguna de las cepas evaluadas presentó resistencia. Este fármaco sigue siendo utilizado en nuestra población como primera elección para el tratamiento de aquellas diarreas graves causadas por *Campylobacter* spp en concordancia con otros informes registrados en otras partes del mundo (Tamborini *et al.*, 2012). Una cifra mayor a la sucitada de la resistencia de *Campylobacter* frente a eritromicina fue en dos estudios en España del 5% (Gonzalez & Sanz, 2013) y 3.7% (Garcia *et al.*, 2003) afectando preferentemente a pacientes pediátricos los cuales presentaban cuadros con inmunodeficiencia como factor predisponente. La literatura médica describe como baja la resistencia a macrólidos (eritromicina) (Rivera *et al.*, 2011).

En cuanto a la tasa de resistencia a gentamicina durante el período estudiado es igual a la referida en distintos trabajos, que hacen referencia a dos analisis en Argentina a diferentes casas de salud (Lucero *et al.*, 2006; Tamborini *et al.*, 2012) sin encontrar ningún caso de resistencia.

La creciente prevalencia de *Campylobacter* spp resistentes a fluoroquinolonas y macrólidos es preocupante, ya que estas son las dos clases de antibióticos normalmente utilizados para tratar la campilobacteriosis, con pocas opciones terapéuticas orales alternativos disponibles (Pollett *et al.*, 2012).

En los resultados obtenidos en la presente investigación ampicilina presentó una resistencia del 11% indicador bastante alto en comparación a publicaciones hechas en España 4.9% (Garcia *et al.*, 2003), Argentina 3,6% (Lucero *et al.*, 2003), y en Chile 1,4% (García *et al.*, 2009) debiendo considerar que estos estudios no se centraban en pacientes pediátricos. En Canadá se comunicó una resistencia del 20% (Lachance *et al.*, 1991) siendo superior al porcentaje obtenido en nuestro estudio.

El antibiótico combinado amoxicilina/ácido clavulánico evidenció una resistencia del 11%, en Argentina no hubo resistencia en ningún caso de campilobateriosis (Lucero *et al.*, 2006) al igual que España (Garcia *et al.*, 2003; Amselem *et al.*, 2004; Bascuñana *et al.*, 2011) frente a este beta-lactamico que hace necesario un llamado de atención en el uso de antibioticoterapia.

A partir de la década de los 90, la resistencia de *Campylobacter* spp a fluoroquinolonas se ha incrementado rápidamente en diferentes países reconociéndose como un problema



emergente de salud pública siendo coincidente con la aprobación del uso de quinolonas fluoradas en aplicaciones veterinarias, especialmente con su empleo en tratamiento de infecciones respiratorias aviarias. Este uso puede facilitar el desarrollo de resistencia antimicrobiana entre aislados en el reservorio animal y la acumulación de antimicrobianos a través de la cadena alimentaria con serias implicaciones en el tratamiento de la campilobacteriosis en humanos (Gonzalez & Sanz, 2013).

Debido a la importancia del tratamiento terapéutico antibiótico para la gastroenteritis bacteriana son primordiales los resultados obtenidos en este estudio porque mantienen actualizadas las distintas resistencias bacterianas.

## CONCLUSIONES

- De las 174 muestras analizadas el 5,2% (9) resultaron positivos al género de *Campylobacter* termotolerantes.
- Las edades que se evaluaron están entre los 0 y 12 años presentándose en un 78% en edades menores a 4 años.
- Las especies de *Campylobacter* encontradas fueron *C. jejuni* 89% (8) mientras que *C. coli* 11% (1).
- La actividad antimicrobiana determinó la resistencia a ciprofloxacina del 67%, ampicilina y amoxicilina-ácido clavulánico 11%, mientras que eritromicina y gentamicina presentaron 100% de sensibilidad.

## BIBLIOGRAFÍA

- Allos, B. (2001). Campylobacter jejuni infections: Update on emerging issues and trends. *Clinical Infectious Disease*, 32, 1201-1206.
- Altekruse, S., Stern, N., Fields, P., & Swerdlow, D. (1999). Campylobacter jejuni—An Emerging. *Emerging Infectious Diseases*, 5, 28-34.
- Amselem, L., Galiano, J., Gomila, B., Echeita, A., López, J., & Celades, M. (2004). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Castellon de la Plana: Elsevier.
- Barot, M., Mosemthal, A., & Bokkenheuser, V. (1983). Location of Campylobacter jejuni in infected chicken livers. *Journal of Clinical Microbiology*, 17, 921-922.
- Bascuñana, P., Pena, I., Picazo, J., & Velasco, A. (2011). Sensibilidad antimicrobiana de cepas hipurato negativas de Campylobacter spp. y de Helicobacter pullorum aisladas de enfermos con diarrea. *Revista Española de Quimioterapia*, 213-216.
- Biberstein, E., & Chung, Y. (1990). *Tratado de microbiología veterinaria*. Zaragoza: Acribia SA.
- Bolton, F. (2001). Methods for isolation of Campylobacter from humans, animals, food and water. The increasing incidence of campylobacteriosis in humans. *WHO*, 87-94.
- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., & Mietzner, T. (2014). *Microbiología Médica*. México D.F: McGraw-Hill.
- Butzler, J. (2004). Campylobacter, from obscurity to celebrity. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 868-876.
- CA-SFM/SFM/EUCAST. (2016). *Determinación de la sensibilidad de antibióticos*. Paris.
- Cervantes, E., & Cravioto, A. (2007). Campylobacter y enfermedades asociadas. *Revista de la facultad de medicina UNAM*, 32-33.
- CReSA. (2013). *Campilobacteriosis*. Barcelona: Servet.
- Cróining, T., & Backert, S. (2012). Host epithelial cell invasion by Campylobacter jejuni: trigger or zipper mechanism. *Frontiers in cellular and infection microbiology Journal*, 1-13.
- Cuenca, J. (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 Regional Isidro Ayora, durante el periodo Septiembre - Diciembre 2014*. Loja: UTPL.
- Dasti, J., Tareen, A., Lugert, R., Zautner, A., & Gross, U. (2010). Campylobacter jejuni: a brief overview on pathogenicity associated factors and disease mediating mechanism. *International Journal Medic of Microbiology*, 300, 205-211.
- Denis, M., C, S., Rivoal, K., G, E., Blivet, D., Salvat, G., & Colin, P. (1999). Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of Campylobacter jejuni and C. coli. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 406-410.

- Denno, D., Stapp, J., Boster, D., Qin, X., Clausen, C., & Deñ, B. (2005). Etiología de la diarrea en pacientes ambulatorios. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*, 39-40.
- Farnell, M., Donoghue, A., Cole, K., Reyes, I., Blore, P., & Donoghue, D. (2005). Campylobacter susceptibility to ciprofloxacin and corresponding fluoroquinolone concentrations within the gastrointestinal tracts of chickens. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1043–1050.
- Fernández, H. (2008). Género Campylobacter: un grupo de bacterias de importancia en salud pública. *Temas de Zoonosis*, 4, 205-214.
- Fernández, H. (Marzo de 2011). Campylobacter y campylobacteriosis: una mirada desde América del Sur. *Revista Peruana de medicina experimental y salud pública*, 28, 121-127.
- Fernández, H., & Farase, M. (2003). *Manual de Procedimientos Diagnóstico de Campylobacter en muestras Clínicas y de alimentos*. Buenos Aires: INEI.
- Fernandez, H., Martin, R., & Thibaut, J. (1996). Campylobacter jejuni y Campylobacter coli resistentes a fluoroquinilonas en animales domesticos. *Archivos de medicina veterinaria*, XXVIII, 151-153.
- Fernandez, H., Zaror, I., Wilson, M., Otth, C. G., & Tejero, A. (2000). Familia Campylobacteraceae en Manual de laboratorio. *Microbiología Sistemática y Clínica*, 67-72.
- Figuroa, Y., Villalobos, L., Martínez, R., Maldonado, A., & Bastardo, J. (2010). Enfermedad diarreica aguda asociada a camilobacterias. *Open Journal System*.
- Garcia, J., Alarcon, T., Domingo, D., Menendez, M., & Lopez, M. (2003). Sensibilidad de Campylobacter jejuni a ocho antibióticos en cepas aisladas de muestras clínicas de niños. *Revista Española de Quimioterapia*, 218-219.
- García, P., Valenzuela, N., Rodríguez, M., León, E., & H, F. (2009). Susceptibilidad antimicrobiana de Campylobacter jejuni aislado de coprocultivos en Santiago de Chile. *Revista chilena de infectología*, 511-514.
- Garrity, G. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Segunda ed., Vol. 1). New York, USA: Springer-Verlag.
- Gatica, M. (2013). *Determinación de la sensibilidad antimicrobiana de cepas de Campylobacter jejuni y Campylobacter coli aisladas de deyecciones de aves, carnes de pollos broiler y pacientes humanos*. Obtenido de favet: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/131568/Determinacion-de-la-sensibilidad-antimicrobiana-de-cepas-de-Campylobacter-jejuni-y-Campylobacter-coli-aisladas-de-deyecciones-de-aves-carnes-de-pollos-broiler-y-pacientes-humanos.pdf?sequence=1>
- Gaudreau, C., Girouard, Y., Huguette, G., Gagnon, J., & Bekal, S. (2008). La comparación de difusión con discos de agar y Métodos de dilución para la eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina y Prueba de Susceptibilidad de Campylobacter coli y de

- tetraciclina pruebas de sensibilidad *Campylobacter jejuni* subsp. *Jejuni*. *Agentes Antimicrobianos y Quimioterapia*, 4475-4477.
- Ge, B., Wang, F., Sjölund, M., & McDermott, P. (2013). Antimicrobial resistance in *Campylobacter*: Susceptibility testing methods and resistance trends. *Journal of Microbiological Methods*, 51-67. Obtenido de <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.06.02>
- Ge, Z., Schauer, D., & Fox, J. (2008). In vivo virulence properties of bacterial cytolethal distending toxin. *Cellular Microbiology Journal*, 10, 1599-1607.
- González, G., Cordero, N., García, P., & Figueroa, G. (2013). Análisis molecular de la resistencia a fluoroquinolonas y macrólidos en aislados de *Campylobacter jejuni* de humanos, bovinos y carne de ave. *Revista chilena de infectología*, 135-139.
- Gonzalez, M., & Sanz, M. (2013). Incidencia y sensibilidad de *Campylobacter jejuni* en pacientes pediátricos: implicación en bacteriemia. *Revista Española de Quimioterapia*, 92-96.
- Guerry, P. (2007). *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiology*, 45-61.
- Hernández, C., Aguilera, M., & Castro, G. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 31(4), 137-149.
- Humphrey, T., O'Breien, S., & Madsen, M. (2007). *Campylobacter* como patógenos zoonóticos: Una perspectiva de la producción de alimentos. *Revista internacional de Microbiología de Alimentos*, 117, 237-257.
- ISP. (24 de Enero de 2014). *Instituto de Salud Pública de Chile*. Obtenido de Vigilancia de laboratorio de *Campylobacter* spp. Chile, 2005 – 2013.: <http://www.ispch.cl/sites/default/files/Bolet%C3%ADn%20Campylobacter.pdf>
- Janssen, R., Krogfelt, K., Cawthraw, S., Pelt, W., Wagenaar, J., & Owen, R. (2008). Host-Pathogen Interactions in *Campylobacter* Infections: the Host perspective. *American Society of Microbiology*, 21, 505-518.
- Jore, S., Viljugrein, H., Brun, E., Heier, B., Borck, B., Ethelberg, S., . . . Hofshagen, M. (2010). Trends in *Campylobacter* incidence in broilers and humans in six European countries, 1997–2007. *Preventive Veterinary Medicine*, 93, 33-41.
- Kaakousha, N., Castaño, N., Mitchella, H., & Ming, S. (2015). Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *American Society for Microbiology*, 28, 687-720.
- Konkel, M., Gray, S., Kim, B., & Garvis, S. (1999). Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the *cadF* virulence gene and its product. *Journal of Clinical Microbiology*, 510-517.
- Lachance, N., Gaudreau, C., Lamothe, F., & Larivière, L. (1991). Role of the beta-lactamase of *Campylobacter jejuni* in resistance to beta-lactam agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 813-818.
- Lapierre, L. (2013). Factores de Virulencia asociados a especies zoonóticas de *Campylobacter* spp. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 28, 27-29.

- Levesque, S., Fournier, E., Carrier, N., Frost, E., Arbeit, R., & Michaud, S. (8 de Diciembre de 2013). *Campylobacteriosis in urban versus rural areas: A case-case study integrated with molecular typing to validate risk factors and to attribute sources of infection*. Obtenido de PLOS ONE: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0083731>
- Leyva, S., & Leyva, E. (2008). Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Bol. Soc. Quím. Méx.*, 2, 1-13.
- Luber, P., Wagner, J., Hahn, H., & Bartelt, E. (2003). Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated in 1991 and 2011-2002 from Poultry and Humans in Berlin, Germany. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 47, 3825-3830.
- Lucero, C., Vicent, A., Galan, G., Leardini, N., & Galas, M. (2003). *Campylobacter spp: Comparison of disk diffusion and agar dilution methods for susceptibility testing*. Buenos Aires: Instituto nacional de enfermedades infecciosas.
- Lucero, M., Orlandoni, B., Guerriero, L., Corso, A., & Galas, M. (2006). *Campylobacter spp.: Sensibilidad a los antimicrobinos en Argentina*. Rosario: ATB.
- MacFaddin, J. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica* (Tercera ed.). Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana.
- McCarthy, N., & Giesecke, J. (2001). Incidence of Guillain-Barre syndrome following infection with *Campylobacter jejuni*. *American Journal of Epidemiology*, 153, 610-614.
- Mendoza, D., & Galicia, L. (2010). Síndrome de Guillain-Barré. *Alergia, asma e inmunología pediátrica*, 19, 56-63.
- Monteverde, M. (2014). Síndrome urémico hemolítico. *Nefrología, Diálisis y Trasplante*, 27-28.
- Murray, P., Baro, E., Jorgensen, J., Landry, M., & Pfaller, M. (2007). *Manual of Clinical Microbiology* (Novena ed.). Washington, DC: ASM Press.
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2014). *Microbiología médica*. Barcelona: Elsevier.
- Nachamkin, T., Allos, B., & Ho, T. (1998). *Campylobacter* Species and Guillain-Barré Syndrome. *Clinical Microbiology Review*, 555-557.
- Narvaez, I. (11 de Septiembre de 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 Regional Isidro Ayora, durante el periodo Septiembre - Diciembre 2014*. Obtenido de Tesis UTPL: <http://dSPACE.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/13189/1/Narvaez%20Jumbo%20Iliana%20Maria.pdf>
- Nobuhiro, M., & Hartung, H. (2012). Guillain-Barré Syndrome. *The new England Journal of Medicine*, 366, 2294-2304.
- Notario, R., Morales, E., Carmelengo, N., Binsztein, N., A, D., Gambande, T., . . . Rivas, M. (1993). Microorganismos enteropatógenos en niños con diarrea aguda en dos Hospitales de Rosario. *Medicina*, 289-299.

- Notejane, M., Pandolfo, S., García, L., Parada, M., Coedo, V., Betancor, L., . . . Perez, W. (2015). Gastroenteritis aguda: formas de presentación clínica y etiología en niños hospitalizados en el Centro Hospitalario Pereira Rossell . *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 92-96.
- Ochoa, T., Ecker, L., Barletta, F., Mispireta, M., Gil, A., Contreras, C., . . . Lanata, C. (1 de Diciembre de 2010). NCBI. *Clinical Infectious Diseases*, 1694–1702. Obtenido de Age-related susceptibility to infection with diarrheagenic E. coli in infants from peri-urban areas of Lima, Peru: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2779581/pdf/nihms144585.pdf>
- OIE. (2008). *Campylobacter Jejuni y Campylobacter Coli. Manual de la Organización mundial de sanidad animal sobre animales terrestre.*, Cap 2.9.3.
- Orrieta, L. (2009). *Monitoreo de la resistencia Antimicrobiana de Campylobacter spp en cuatro hospitales de la ciudad de La Paz-Bolivia 2005-2006*. La Paz: Universidad Mayor de San Andres.
- 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. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 186-192.
- 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 . *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 186-189.
- Pollett, S., Rocha, C., Zerpa, R., Patiño, L., Valencia, A., Camiña, M., . . . Chuquiray, N. (2012). Campylobacter antimicrobial resistance in Peru: a ten-year observational study. *BMC Infectious Diseases*, 2-7.
- Reina, J., Borrel, N., & Serra, A. (1992). Emergence of resistance to erythromycin and fluoroquinolones in thermotolerant Campylobacter strains isolated from feces 1987-1991. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 11, 1163-1166.
- Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Deza, N., & Leotta, G. (2006). EPIDEMIOLOGIA DEL SINDROME UREMICO HEMOLITICO EN ARGENTINA. *MEDICINA*, 66, 27-32.
- 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, 555-562.
- Riverón, F., J, H., Ponce, L., & Machado, C. (2003). Resistencia Bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar* , 44-48.
- RNVE. (2012). *Resultados de la vigilancia epidemiologica de las enfermedades transmisibles*. Madrid.
- Romero, R. (2007). *Microbiología y parasitología humana* (Tercera ed.). Mexico DF: Medica Panamericana.

- Romero, R. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana* (Tercera ed.). México D.F: Medica Panamericana.
- Romero, R., & Herrera, I. (2002). *Síndrome diarreico infeccioso*. Mexico DF: Medica Panamericana.
- Sack, D., Lyke, C., C, M., & Suwanvanichkij, V. (2001). *Antimicrobial resistance*. Baltimore: Minimun Graphics.
- Sebald, M., & Verón, M. (1963). Teneur en bases de l'ADN et classification des vibrions. *Annales de l'Institut Pasteur*, 105, 897-910.
- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, A., & Teixeira, P. (2011). Campylobacter spp. as a foodborne pathogen: a review. *Frontiers Microbiology*, 2, 1-12.
- Spicer, J. (2009). *Microbiología Clínica y enfermedades infecciosas* (Segunda ed.). Barcelona, España: Elsevier.
- Tam, C., Brien, S., Adak, G., Meakins, S., & Frost, J. (2003). Campylobacter coli—an important foodborne pathogen. *Journal of Infection*, 28-32.
- Tamborini, A., L, C., Viñas, M., Asato, V., Hoffer, A., Farace, M., . . . Pichel, M. (2012). Campylobacter spp.: prevalencia y caracterización feno-genotípica de aislamientos de pacientes con diarrea y de sus mascotas en la provincia de La Pampa, Argentina. *Revista argentina de microbiología*, 266-271.
- Tenkate, T., & Stafford, R. (2001). Risk factors for Campylobacter infection in infants and young children: a matched case–control study. *Epidemiology and Infection*, 127, 399-404.
- Terrés, A., & Casas, L. (2002). Enfermedad diarreica e intolerancia a la lactosa en México. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* , 329-331.
- Urrestarazu, M., Liprandi, F., Perez, E., Gonzalez, R., & Perez, I. (1999). Características etiológicas, clínicas y sociodemográficas de la diarrea aguda en Venezulea. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 149-154.
- Vasco, G., Trueba, G., Atherton, R., Calvopiña, M., Cevallos, W., Andrade, T., & Eisenberg, J. (2014). Identifying Etiological Agents Causing Diarrhea in Low Income Ecuadorian Communities. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 563-569.
- Verón, M., & Chatelain, R. (1973). Taxonomic study of the genus Campylobacter Sebald and Veron and designation of the neotype strain for the type species Campylobacter fetus (Smith and Taylor) Sebald and Véron. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 23, 122-123.
- Wagenaar, J., Newell, D., Kalupahana, R., & Mughini, L. (2014). Campylobacter: Animal Reservoirs, Human Infections, and Options for Control. *Springer*, 159-157.
- WHO. (2000). *The Increasing Incidence of Human*. Denmark: World Health Organization.
- WHO. (1 de Octubre de 2011). *Campylobacter*. Obtenido de World Health Organisation: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>
- WHO. (2012). *The global view campylobacter*. Netherlands: 1ed.



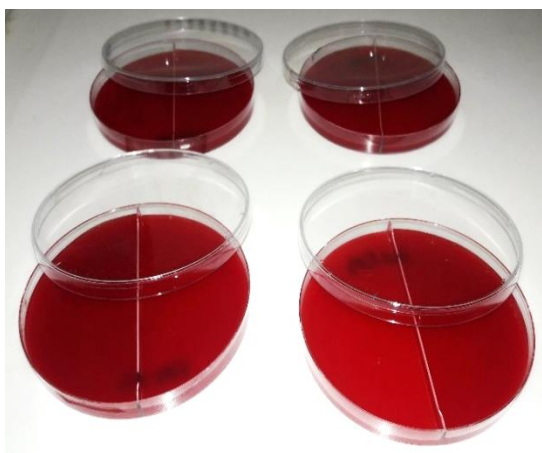
- WHO. (1 de Abril de 2013). *Enfermedades diarreicas*. Obtenido de Organizacion mundial de la salud: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>
- WHO. (01 de Abril de 2015). *Resistencia a los antimicrobianos*. Obtenido de Organizacion Mundial de la Salud: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., & Woods, G. (2008). *Koneman Diagnóstico Microbiológico* (Sexta ed.). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- Yamazaki, W., Taguchi, M., Seto, K., Kawahara, R., Kawatsu, K. Y., Kitazato, M., . . . 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*, 1467–1473.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1. PREPARACIÓN DE MEDIO SELECTIVO PARA *CAMPYLOBACTER*.

### Volumen final: 500ml de medio

- ❖ Esterilizar el área de trabajo, manteniendo la asepsia necesaria para evitar contaminación.
- ❖ Basándose en las etiquetas de cada frasco pesar 12.5g de agar nutriente 2 Oxoid Blood, 8g de agar – agar y 5g de extracto de levadura.
- ❖ Disolver en 470ml de agua destilada agitando para que exista homogenización.
- ❖ Ajustar el pH a 7 con ácido clorhídrico al 20% o Hidróxido de Sodio según convenga.
- ❖ Autoclavar el medio a 121°C y 1 atmosfera durante 20 minutos.
- ❖ Adicionar 5ml de agua estéril al vial, para reconstituir el antibiótico *Campylobacter* Selective Butzler.
- ❖ Cuando el medio alcance la temperatura de 50°C agregarle el antibiótico reconstituido y 25ml de sangre humana.
- ❖ Verter en las cajas bipetri evitando la formación de burbujas.
- ❖ Rotular con la fecha y almacenar de forma invertida en refrigeración a 4°C.
- ❖ Una caja colocar en la estufa a 37°C por 24h como control general del medio.

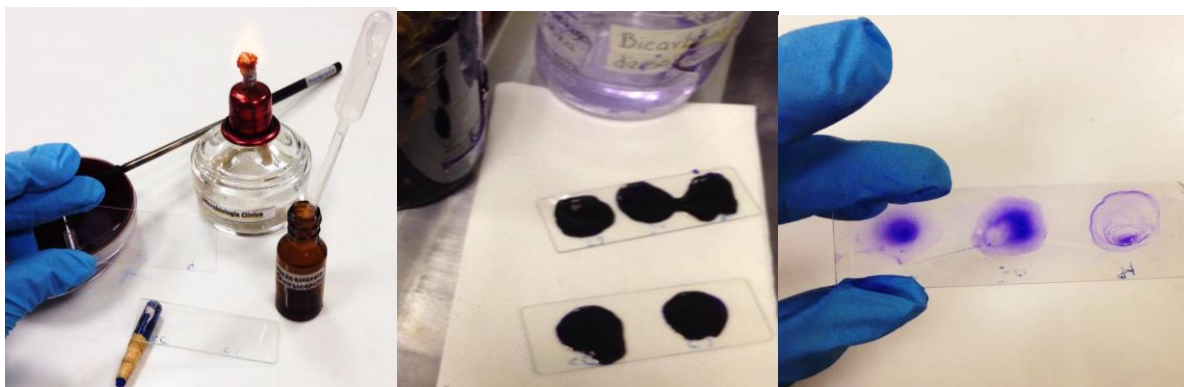


**Figura 5.** Medio Selectivo Butzler.

**Fuente:** El autor.

## ANEXO 2. TINCIÓN DE HUCKER.

- ❖ Realizar un extendido de las colonias sospechosas del cultivo en un portaobjetos.
- ❖ Fijar la muestra con calor.
- ❖ Colocar una gota de reactivo de Hucker y una de bicarbonato de sodio al 1% a la vez y dejar de 2-3 minutos.
- ❖ Lavar con agua corriente y dejar secar.
- ❖ Observar las características tintoriales en la placa con aceite de inmersión en el lente de 100x.



**Figura 6.** Tinción de Hucker.  
**Fuente:** El autor.

## ANEXO 3. FILTRACIÓN DE COLONIAS

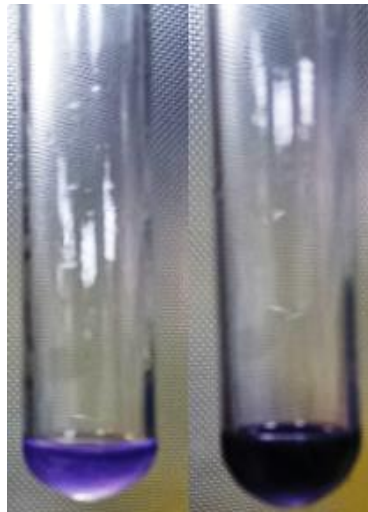
- ❖ Tomar con un asa estéril las colonias presuntamente contaminadas del cultivo.
- ❖ Colocar en 1ml de agua destilada y someter a vortex.
- ❖ Poner el papel filtro mili pore con una pinza metálica sobre el medio selectivo y colocar 150ul de la disolución
- ❖ Esperar aproximadamente 30min y retirar el papel mili pore.
- ❖ Incubar en un ambiente de anaerobiosis a 42°C.



**Figura 7.** Filtración en papel milipore.  
**Fuente:** El autor.

#### **ANEXO 4. HIDROLISIS DE HIPURATO**

- ❖ Ciertas cepas son capaces de hidrolizar el hipurato de sodio. La producción de hipuricasa resulta en la hidrólisis del hipurato de sodio con la formación de benzoato de sodio y glicina.
- ❖ Añadir 400ul de medio hipurato de sodio al 1% en un tubo esterilizado.
- ❖ Inocular el tubo con tres asadas del microorganismo puro y someter a vortex para homogenizar la muestra.
- ❖ Incubar durante 2h en baño maría a 37°C temperatura constante.
- ❖ Agregar 200ul de ninhidrina y dejar durante 10 minutos a 37°C.
- ❖ Interpretar los resultados  
Positivo: aparición de un color púrpura intenso.  
Negativo: no habrá cambio de color en la muestra.



**Figura 8.** Hidrólisis del hipurato.  
**Fuente:** El autor.

#### **PREPARACIÓN DE HIPURATO DE SODIO**

Volumen final: 100ml

- ❖ Pesar 1g de hipurato de sodio.
- ❖ Diluir en 100ml de agua destilada.
- ❖ Mantener en refrigeración a 4°C.

#### **PREPARACION DE NINHIDRINA (100ml)**

- ❖ Pesar 3.5 g de ninhidrina.
- ❖ Disolver en 50 ml de acetona y 50 ml de butanol.
- ❖ Conservar en un frasco ámbar a 4°C.

## ANEXO 5. CRIOCONSERVACIÓN

- ❖ Esterilizar la cabina de flujo con alcohol al 70% y 20min con luz UV.
- ❖ Rotular los tubos criobank a utilizarse.
- ❖ Tomar con un hisopo el cultivo puro del medio.
- ❖ Inocular dentro del tubo criobank con fluido y entre las perlas porosas.
- ❖ Cerrar y agitar manualmente invirtiendo el tubo, luego dejar reposar por 20 minutos.
- ❖ Extraer la glicerina con una micropipeta.
- ❖ Se almacena en Frezzer a una temperatura de -80°C.



**Figura 9.** Crioconservación para *Campylobacter*  
**Fuente:** El autor.

## ANEXO 6. EXTRACCIÓN DE ADN BACTERIANO

- Añadir 1 ml de un cultivo de una noche a un tubo de 1,5 ml de microcentrífuga.
- Centrifugar a 13,000-16,000 × g durante 2 minutos para sedimentar las células. Eliminar el sobrenadante.
- Añadir 600µl de Nuclei Lysis Solution. pipetear suavemente hasta que se vuelven a suspender las células.
- Incubar a 80 ° C durante 5 minutos para lisar las células; a continuación, enfriar a temperatura ambiente.
- Añadir 3µl de RNase Solution al lisado celular. Invierta el tubo 2-5 veces para mezclar.
- Incubar a 37 °C durante 15-60 minutos. Enfriar la muestra a temperatura ambiente.
- Agregar 200µl de Protein Precipitation Solution al lisado celular tratado con RNasa.
- Dar Vortex vigorosamente a alta velocidad durante 20 segundos para mezclar la Protein Precipitation Solution con el lisado celular.
- Incubar la muestra en hielo durante 5 minutos.
- Centrifugar a 13,000-16,000 × g durante 3 minutos.

- 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.
- Mezclar suavemente por inversión hasta que las hebras de hilo de ADN formen una masa visible.
- Centrifugar a 13,000-16,000 × g durante 2 minutos.
- 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.
- Centrifugar a 13,000-16,000 × g durante 2 minutos. Y aspirar cuidadosamente el etanol.
- Drene el tubo sobre papel absorbente limpio y deje que el precipitado se seque al aire durante 10-15 minutos.
- 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.
- Almacenar el ADN a 2-8 ° C.



**Figura 10.** Kit de extracción de ADN.  
**Fuente:** El autor.

## ANEXO 7. PCR MULTIPLEX PARA IDENTIFICACIÓN DE CAMPYLOBACTER

Tabla 4. Mix para PCR múltiple.

Componentes	1X (ul)	10X(ul)
Buffer	5,00	50,00
dNTPs	0,50	5,00
Cl2Mg	1,50	15,00
Primers:		
C412F	0,05	0,50
C1228R	0,05	0,50
C-1	0,05	0,50
C-3	0,05	0,50
CC18F	0,05	0,50
CC519R	0,05	0,50
CU61F	0,05	0,50
CU146R	0,05	0,50
MG3F	0,05	0,50
CF359R	0,05	0,50
CLF	0,05	0,50
CLR	0,05	0,50
HYO1F	0,05	0,50
HYOFET235R	0,05	0,50
Taq	0,125	1,25
H2O	16,17	161,7
DNA	1,00	
	<b>25,00</b>	<b>240,0</b>
<b>Volumen Final</b>		<b>250,0</b>

Elaborado por: El autor

### Etapas del termociclador

Tabla 5. Condiciones de PCR.

Condiciones:	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	N° ciclos
Desnaturalización inicial	94	15	1
Desnaturalización	94	0,5	30
Anillamiento	54	1,5	
Extensión	72	1	
Extensión final	72	7	1

Elaborado por: El autor



## ANEXO 8. ELECTROFORESIS

- ❖ Pesar 0,525 g de agarosa UltraPure™.
- ❖ La cantidad pesada la disolvemos con 11.5ml de Red y buffer 3.5ml TBE 10X en un vaso de precipitación de 100 ml.
- ❖ Calentar en microondas por tres ciclos de 20 segundos.
- ❖ Dispensar en el soporte del gel.
- ❖ Poner las peinetas para la formación de pocillos hasta que solidifique el gel.
- ❖ Extraer la peinetas una vez que solidifique el gel y colocarlo en la cubeta de electroforesis y llenarla con buffer TBE 1X.
- ❖ Añadir las muestras incluido el marcador de peso molecular, el blanco y los controles de *C. jejuni* y *C. coli*.
- ❖ Tapar la cubeta y correr las muestras a 120Volt y 300mA durante 40min.
- ❖ Se revela el gel mediante luz UV en el transiluminador UV labnet.

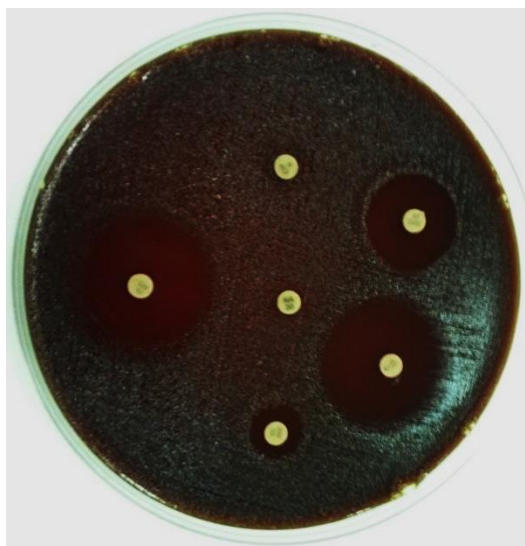


**Figura 11.** PCR Multiplex.  
**Fuente:** El autor.

## ANEXO 9. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO.

- ❖ En un tubo esterilizado colocar 1ml de suero fisiológico.
- ❖ Tomando con un asa las colonias puras inocular y colocar en el tubo hasta obtener una turbidez de 0.5 en la escala de McFarlan.
- ❖ Homogenizar la muestra dando vortex.
- ❖ Sembrar con un hisopo estéril que se empapa con el cultivo, por estriado continuo en agar Muller Hilton suplementado con 5% de sangre.

- ❖ Colocar los seis discos antibióticos: ácido nalidixico, ciprofloxacina, amoxicilina - ácido clavulánico, ampicilina, gentamicina y eritromicina.
- ❖ Incubar a 42°C durante 48h en recipiente de anaerobiosis con un parche campyGen™.
- ❖ Inspeccionamos los resultados midiendo sus halos y determinando su sensibilidad o resistencia.



**Figura 12.** Antibiograma  
Fuente: El autor

#### **ANEXO 10. PREPARACIÓN MEDIO MULLER HILLTON (1000ml)**

- ❖ Pesar el medio deshidratado Muller Hillton (OXOID) y extracto de levadura de acuerdo a las especificaciones de la etiqueta.
- ❖ Suspender en agua destilada hasta los 970ml y homogenizar el medio.
- ❖ Ajustar a un pH neutro de 7.
- ❖ Esterilizar en el autoclave a 121°C.
- ❖ Enfriar a 45-50°C y añadir 5% de sangre humana.
- ❖ Dispensar en cajas Petri de 100mm de diámetro, a una profundidad de 4mm.
- ❖ Rotular y conservar a 4°C de forma invertida.