



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**Aislamiento y Detección de Arcobacter en leche cruda por medio
de la técnica de multiplex PCR**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Sauca Poma, Willam Rodrigo.

DIRECTORA: Hualpa Salinas, Diana Inés, Mgtr.

LOJA-ECUADOR

2018



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NC-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>

Loja, mayo del 2018

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Mgr.

Diana Inés Hualpa Salinas

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación **Aislamiento y Detección de *Arcobacter* en leche cruda por medio de la técnica de multiplex PCR**, realizado por **Willam Rodrigo Sauca Poma**, ha sido orientada y revisada durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Abril de 2018

f)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo **Willam Rodrigo Sauca Poma** declaro ser autor (a) del presente trabajo de titulación: Aislamiento y Detección de Arcobacter en leche cruda por medio de la técnica de multiplex PCR, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo la Mgtr. Diana Ines Hualpa Salina director (a) del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

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

f).....

Autor: Willam Rodrigo Sauca Poma

Cédula: 1104083454

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a mis padres, quienes con su infinito amor me supieron apoyar y motivar y jamás dejaron de creer en que lo podía lograr y podría salir adelante y continuar con mis estudios y llegar a culminar esta gran meta.

A mi hija que fue mi inspiración y me dio las fuerzas para vencer cada obstáculo que se me presento en mi vida.

A mis hermanos por estar siempre ahí conmigo con su inmenso amor apoyándome y jamás dejándome solo.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por todos los esfuerzos y sacrificios que han hecho por darme lo mejor, por haberme apoyado en todo momento. A mi madre por haberse preocupado por mí, animarme y tranquilizarme en mis días más difíciles. A mi padre por tener confianza ciega en mí y en mis capacidades siempre y hacerme sentir el mejor hijo a cada momento. A mi hija Emily por ser mi motor y mi luz para cada día luchar y vencer cada obstáculo que se me presente en mi vida a mis hermanos gracias por su infinito amor y siempre ayudarme cuando más lo he necesitado, a mi novia por estar a mi lado siempre, por su ayuda, ánimo, cariño, por escucharme y por su apoyo incondicional, ¡Muchas gracias!

A la Dra. Dianita Hualpa por brindarme la oportunidad para realizar este trabajo, haberme recibido siempre con una sonrisa, por guiarme y ayudarme. A Jimmy y Nicole por el gran apoyo y ayuda que me brindaron para realizar este trabajo gracias por su paciencia y su infinita ayuda.

¡Muchas Gracias!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

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 TABLAS	VIII
INDICE DE FIGURAS.....	IX
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I MARCO TEORICO	5
1.1 Enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA).....	6
1.1 .1Infección alimentaria.....	6
1.2 Clasificación taxonómica.....	7
1.3 Familia Campylobactereace.....	7
1.4 Grupo Arcobacter.....	8
1.4.1. <i>Arcobacter butzleri</i>	9
1.4.2 <i>Arcobacter cryaerophilus</i>	10
1.4.3 <i>Arcobacter skirrowii</i>	10
1.4.4 <i>Arcobacter thereius</i>	10
1.5 Vías de transmisión.	10
1.5.1 Transmisión por agua.....	11
1.5.2 Transmisión por contacto con animales.....	11
1.5.3 Transmisión persona a persona	12
1.6 Reservorio.	12
1.7 Patogenicidad y factores de virulencia del Genero <i>Arcobacter</i>	13
1.8 Aislamiento y detección de <i>Arcobacter</i> spp.....	14
1.8.1 Identificación.	14
1.9 Resistencia a Antibióticos.	15
1.9.1 Mecanismo de Resistencia.....	15
1.9.2 Técnica Molecular de Identificación de Especies de <i>Arcobacter</i>	16

1.9.2.1 Reacción en la cadena de la polimerasa (PCR).....	16
1.9.2.3 Multiplex-PCR.....	16
CAPÍTULO II METODOLOGIA	18
2.1 Muestras.....	19
2.2 Preparación de la unidad de muestra.....	19
2.3 Identificación fenotípica de <i>Arcobacter</i>	19
2.3.1 Aislamiento y detección.....	19
2.3.2 Identificación Morfológica.....	20
2.3.3 Identificación Bioquímica.....	21
2.4 Identificación Molecular o genotípica.....	21
2.4.1. Multiplex-PCR.....	21
2.5 Susceptibilidad antimicrobiana.....	22
2.5.1 Método de difusión en disco.....	23
CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSION	24
CONCLUSIONES.....	30
RECOMENDACIONES.....	31
BIBLIOGRAFÍA:.....	32
ANEXOS.....	40

Anexo 1: Preparación de medio enriquecido con extracto de levadura

Anexo 2: Tinción de Hucker

Anexo 3: Pruebas Bioquímicas para la Identificación de especies de *Arcobacter*

Anexo 4: Protocolo de Criopreservación

Anexo 5: Protocolo de Extracción de ADN de bacterias gram negativas

Anexo 6: Protocolo de Multiplex-PCR para identificación de especies de *Arcobacter*

Anexo 8: Protocolo de Electroforesis en Gel de Agarosa

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de *Arcobacter spp.*

Tabla 2. Prevalencia de *Arcobacter spp.* en Aves, Mamíferos, Peces y Mariscos

Tabla 3. Genero y especie *Arcobacter.*

Tabla 4. Identificación de especies de *Arcobacter* mediante multiplex-PCR

Tabla 5. Identificación presuntiva de *Arcobacter*

Tabla 6. Identificación de especies de *Arcobacter.*

Tabla 7. Condiciones de la multiplex-PCR touchdown.

Tabla 8. Criterios de interpretación de susceptibilidad antimicrobiana.

Tabla 9. Prevalencia de especies de *Arcobacter* en leche cruda.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de virulencia descritos para las especies patógenas del género *Arcobacter*.

Figura 2. Técnica de aislamiento de *Arcobacter*

Figura 3. Identificación molecular de especies de *Arcobacter* mediante multiplex PCR.

Figura 4. Evaluación de la actividad antimicrobiana.

RESUMEN

En la actualidad se ha identificado un gran número de enfermedades emergentes que afectan al consumidor, la mayoría son de etiología infecciosa y en gran parte son de origen zoonótico, la especie *Arcobacter* requiere de especial interés y está considerada como patógeno emergente, su principal fuente de contagio son alimentos de origen animal que no hayan sido adecuadamente tratados. El objetivo de este estudio fue identificar la prevalencia de *Arcobacter spp* en leche cruda. Se recolectaron 50 muestras de leche de vaca durante dos meses, de proveedores de la ciudad de Loja y Zamora Chinchipe. De las cepas aisladas y los controles positivos se realizó la extracción del ADN mediante Multiplex-PCR se identificó únicamente a *Arcobacter butzleri* 18%. Los resultados de susceptibilidad antimicrobiana mostraron resistencia a: ácido nalidixico 100%, tetraciclina 77.78%, ampicilina 44,45%, ciprofloxacina 44,45%, eritromicina 33,33% mientras que para gentamicina presentó 100% de susceptibilidad. Los resultados obtenidos en la presente investigación proporcionaron información sobre los riesgos para la salud asociados con el consumo de materias primas crudas y expresan elevadas tasas de resistencia a antibióticos de uso común a nivel veterinario.

Palabras claves: *Arcobacter spp*, prevalencia, susceptibilidad. *A. butzleri*

ABSTRACT

Currently a large number of emerging diseases affecting the consumer have been identified, most are of infectious etiology and are largely of zoonotic origin, the species *Arcobacter* requires special interest and is considered as an emerging pathogen, its main source of contagion are foods of animal origin that have not been adequately treated. The objective of this study was to identify the prevalence of *Arcobacter* spp in raw milk. Fifty samples of cow's milk were collected during two months from suppliers in the city of Loja and Zamora Chinchipe. The DNA extraction was performed by means of Multiplex-PCR, only *Arcobacter butzleri* 18% was identified. The results of antimicrobial susceptibility showed resistance to: nalidixico acid 100%, tetracycline 77.78%, ampicillin 44.45%, ciprofloxacina 44.45%, erythromycin 33.33% while for gentamicin present 100% susceptibility. The results obtained in the present investigation provided information on the health risks associated with the consumption of raw raw materials and expressed high rates of resistance to antibiotics commonly used at the veterinary level.

Key words: *Arcobacter* spp, prevalence, susceptibility, *A. butzleri*

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se han identificado gran número de enfermedades emergentes que afectan al ser humano, la mayoría de las cuales son de origen infeccioso e incluyen enfermedades bacterianas, virales, parasitarias, entre otras. Muchas de éstas son de origen zoonótico, tal es el caso de algunas especies de *Arcobacter*, actualmente consideradas bacterias emergentes y también asociadas y de creciente importancia en salud pública (Calvo et al. 2013).

El incremento en los datos de prevalencia e incidencia de casos asociados a esta sugiere que la infección en humanos y animales ha sido subestimada, debido a la carencia de conocimientos al respecto y de un protocolo estándar, universalmente aceptada, para el aislamiento primario de este organismo y al uso correcto de métodos y técnicas de identificación (Calvo et al. (2013).

El incremento en el hallazgo de *Arcobacter* en alimentos derivados de animales, hace que aumente la preocupación en materia de salud pública, ya que aún se conoce muy poco del potencial patogénico de las especies *Arcobacter* y los pocos estudios que se han llevado a cabo, muestran una gran cantidad de especies hospedadoras y rutas de transmisión (Calvo et al. 2013).

(Zerpa et al. 2013) manifiesta que los reservorios naturales del género *Arcobacter* descritos son el tracto intestinal de humanos y animales, órganos reproductores de animales, depósitos de agua, alcantarillado y plantas de ambiente salino. En la literatura médica se ha informado su aislamiento de heces de humanos y de diversos mamíferos y aves. *A. cryaerophilus* ha sido aislado de pacientes con bacteriemia. Así mismo, *A. butzleri* ha sido encontrado en carne de ganado por varios métodos de aislamiento y en casos de adultos con diarrea crónica.

Los *Arcobacter* pueden transmitirse a seres humanos por medio del consumo de alimentos crudos o mal cocinados de origen animal (Yesilmen et al. 2014).

(Yesilmen et al. 2014) indica que las tres que han sido aisladas por el hombre, *A. butzleri* y *A. cryaerophilus*, producen bacteriemia, peritonitis, apendicitis, enteritis y diarrea; *A. skirrowii* fue asociada a un caso de diarrea crónica en adulto. *A. nitrofigilis* es fijadora de nitrógeno y ha sido aislada en asociación con las raíces de plantas originarias de pantanos salinos, de las especies que han sido aisladas del hombre (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii*), también han sido aisladas de fetos abortados de porcinos, bovinos, ovinos y equinos, del lavado prepucial de bovinos, de leche de vacas con mastitis, de útero y oviducto de puercas con problemas reproductivos.

(Yesilmen et al. 2014) manifiesta que también han sido aisladas a partir de materia fecal de bovinos, porcinos, ovinos y equinos, por lo que se reconoce su carácter zoonótico.

(Rivera. 2015) indica que los síntomas causados en humanos son diarreas persistentes y acuosas, dolor abdominal, náuseas y vómitos o fiebre, una diarrea acuosa y persistente es asociada con *A. butzleri*, mientras que *A. skirrowii* se relaciona más con gastroenteritis.

La enteritis causada por *Arcobacter* en la mayoría de casos no tienen consecuencias, no obstante, esto variará según la severidad, la prolongación de los síntomas y el estado del sistema inmunológico del paciente. Es por eso que *A. butzleri* ha sido considerado como un peligro grave para la salud humana por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos (Collado et al. 2011a).

El trabajo se presenta en 3 capítulos en el primero se realiza una revisión bibliográfica de las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA), la bacteria *Arcobacter* sus fuentes de transmisión, grupos y detección. En el segundo capítulo se describe la metodología desde la recolección, preparación de las muestras, incluye el enriquecimiento, aislamiento, identificación bioquímica, resistencia a antibióticos y técnica multiplex PCR para identificación de especies de *Arcobacter*. Finalmente, en el tercer capítulo se expone resultados y discusión, conclusiones y recomendaciones.

El trabajo se desarrolló con la obtención de las muestras de leche cruda recolectadas de la ciudad de Loja y Zamora Chinchipe, se procesaron las muestras con métodos de aislamiento y detección. Para la obtención de cepas de *Arcobacter* se utilizó el método de filtración utilizando un filtro de triacetato de celulosa de 47 mm de diámetro en agar sangre enriquecida con extracto de levadura. En los resultados de la investigación se aisló la especie *Arcobacter butzleri* representando el 18% de muestras positivas. La susceptibilidad microbiana dió como resultado mayor resistencia a ácido nalidixico con un 100%, tetraciclina 77.78%, ampicilina y ciprofloxacina 44.45% respectivamente.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA).

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son definidas como “Síndromes originados por la ingestión de alimentos y/o agua, que contengan agentes etiológicos en cantidades tales, que afecten la salud del consumidor a nivel individual o grupos de población” (Delgado et al. 2003).

Hasta la fecha se han descrito más de 250 ETA, la mayoría son infecciones ocasionadas por distintas bacterias, virus y parásitos. Entre las bacterias comúnmente reconocidas como causantes de ETA se encuentran especies de los géneros *Campylobacter* y *Salmonella*, así como la cepa O157:H7 de la enterobacteria *Escherichia coli*. A largo plazo, algunas de estas enfermedades pueden conducir a otros padecimientos; por ejemplo, es posible que una infección con la cepa O157:H7 de *E. coli* provoque el síndrome hemolítico urémico (SHU) con secuelas de insuficiencia renal crónica (Gonzalez et al. 2005).

Las ETA constituyen un importante problema de salud pública debido al incremento en su ocurrencia, el surgimiento de nuevas formas de transmisión, la aparición de grupos poblacionales vulnerables, el aumento de la resistencia de los patógenos a los compuestos antimicrobianos y el impacto socioeconómico que ocasionan. La incidencia de estas enfermedades es un indicador directo de la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos, y se ha demostrado que la contaminación de éstos puede ocurrir durante su procesamiento o por el empleo de materia prima contaminada, pues algunas bacterias patógenas para el hombre forman parte de la flora normal de aves, cerdos y ganado (Gonzalez et al. 2005).

1.1.1 Infección alimentaria.

(Kopper et al. 2009) comenta que en los países en vías de desarrollo es frecuente la incidencia de diversas enfermedades causadas por la ingesta de alimentos que no reúnen la calidad e inocuidad apropiadas. Esta situación prevalece desde la cosecha del alimento hasta el consumo del producto ya que está sujeto a una serie de exposiciones y operaciones que, sin control adecuado, pueden convertir al alimento en un elemento altamente nocivo y de riesgo para la salud. Esto puede ocurrir en los alimentos de consumo popular, como en la venta de alimentos en las calles o negocios públicos, así como también a nivel de la preparación de los alimentos en el hogar. Es evidente que hay una gran incidencia de enfermedades parasitarias, infecciones

e intoxicaciones gastrointestinales que afectan la salud pública y consecuentemente inciden adversamente en la economía nacional. A veces estas enfermedades originadas por los alimentos se vuelven endémicas ocasionando incluso la muerte entre los grupos más vulnerables de la sociedad.

1.2 Clasificación taxonómica.

Hasta la actualidad como observamos en la Tabla 1, según la última clasificación descrita en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2012) el género *Arcobacter* forma parte de la familia *Campylobacteraceae* que junto con las familias *Helicobacteraceae*, *Hydrogenimonaceae* conforman el orden *Campylobacterales* de las *Epsilonproteobacterias* (Bayas, 2016)

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de *Arcobacter spp.*

Dominio	Bacteria
Phylum BXII	Proteobacteria
Clase V	<i>Epsilonproteobacteria</i>
Orden I	Campylobacterales
Familia I	<i>Campylobacteraceae</i>
Género I	<i>Arcobacter</i>
Género II	<i>Campylobacter</i>
Género III	<i>Sulfurospirillum</i>

Fuente: (Bayas, 2016)
Elaboración: Autor

1.3 Familia Campylobactereace

La Familia Campylobactereace comprende los géneros *Campylobacter* y *Arcobacter*, los cuales agrupan bacilos Gram negativos curvos, de carácter zoonótico, con amplia distribución en la naturaleza, reconociendo como reservorio natural a una gran variedad de aves y mamíferos (Fernández et al. 2007). La transmisión de estas bacterias al ser humano se realiza por vía fecal oral a través del consumo de agua o alimentos de origen animal contaminados, o bien, por contacto con animales reservorios (Fernández et al. 2007).

Dentro de sus características y por las cuales se diferencia del género *Campylobacter* se encuentra el que puede crecer en un rango de temperaturas que oscila entre los 15 - 42°C, en condiciones aerobias o anaerobias. Sin embargo, el crecimiento óptimo en el aislamiento ocurre bajo condiciones de microaerofilia (3-10 % O₂) y no requiere hidrógeno para su crecimiento. Su temperatura a la cual un 50% del ADN-ARNr híbrido es desnaturalizado es, en promedio, de 66°C y poseen un contenido G + C entre un 27% y un 30% mol. (Calvo et al. 2013), en la Tabla 2, se muestra los diferentes géneros y especies de *Arcobacter* de importancia clínica, responsables de causar diversas patologías en el ser humano.

Tabla 2. Especies y géneros de *Arcobacter*.

Género	Origen
<i>A. anaerophilus</i>	<i>Sedimentos estuarios</i>
<i>A. arquimarinus</i>	<i>Agua de río</i>
<i>A. bivalviorum</i>	<i>Mejillones</i>
<i>A. butzleri</i>	<i>Heces de humano</i>
<i>A. cibarius</i>	<i>Carne de pollo</i>
<i>A. cloacae</i>	<i>Residuos urbanos</i>
<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Fetos bovinos</i>
<i>A. defivuit</i>	<i>Aguas residuales</i>
<i>A. ebronensis</i>	<i>Mejillones</i>
<i>A. halophilus</i>	<i>Laguna hipersalina</i>
<i>A. lanthieri</i>	<i>Cerdo y estiércol de ganado lechero</i>
<i>A. nitrofigitis</i>	<i>Raíces de spartina alterniflora</i>
<i>A. skirrowi</i>	<i>Heces de bovino</i>
<i>A. suis</i>	<i>Heces de cerdo</i>
<i>A. thereius</i>	<i>Abortos de porcinos y cloacas de pato</i>
<i>A. trophiarum</i>	<i>Heces de cerdo de engorde y abortados</i>

Fuente: (Ramees et al., 2017)

Elaborado: Autor

1.4 Grupo *Arcobacter*

(Ramees et al. 2017) ha manifestado que en los últimos años, *Arcobacter* spp. ha sido identificado como un patógeno emergente zoonótico en todo el mundo y la Internacional Comisión de Especificaciones Microbiológicas para Foods (ICMSF) lo ha clasificado como un serio peligro para la salud humana. Fue aislado por primera vez y descrito a partir de tejidos fetales bovinos abortados (Ellis et al. 1977) y más tarde de fetos porcinos (Ellis et al. 1977);

(Neill et al. 1978); (Aydin et al. 2007); (Rasmussen et al. 2013). *Estas especies* están implicadas como agentes causantes de diarrea, mastitis y aborto en animales, mientras que en humanos causan bacteriemia, endocarditis, peritonitis, gastroenteritis y diarrea (Jiang et al. 2010); (Figueras et al. 2014);(Ferreira et al. 2016).

(Fernández et al. 2007) nos comenta que el género *Arcobacter* ha sido aislado a partir de ganado vacuno, porcino, ovino, caprino, en pollo y otras aves de corral, como también en fetos de abortos porcinos y bovinos, productos cárnicos, moluscos y leche y otros han sido aisladas en superficies de plantas procesadoras de carne, de agua potable, de alcantarillas, agua de río y de mar.

El género *Arcobacter* comprende 22 especies, de ellas cuatro: *Arcobacter butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* y *A. thereius* han sido aisladas de cuadros infecciosos del ser humano, particularmente de cuadros entéricos, siendo *A. butzleri* la especie más frecuentemente aislada, tanto de procesos infecciosos, como de reservorios, de muestras ambientales y de alimentos de origen animal (Fernández et al. 2016).

1.4.1. *Arcobacter butzleri*.

Inicialmente fue aislada de muestras humanas y de animales con diarrea. Las infecciones causadas por esta bacteria se caracterizan por una diarrea acuosa con dolor abdominal, náusea, vómito y en algunas ocasiones también se presentan casos con fiebre, lo cual contrasta con la diarrea sanguinolenta asociada a *C. jejuni* (Calvo et al. 2013).

A. butzleri es un bacilo gramnegativo, no esporulado, de morfología ligeramente curva, helicoidal o en forma de S itálica que mide entre 0,2 y 0,4 µm de ancho y 1 a 3,0 µm de largo. Presenta una motilidad característica con giros sobre su propio eje, descrita como “en sacacorchos”. Crece bien, a temperatura óptima de 25 a 30° C, en medios con sangre, formando colonias no pigmentadas, redondas, convexas y de bordes netos, translúcidas o de un ligero tinte blanquecino o grisáceo (Fernández et al. 2016).

(Fernández et al. 2016). Nos recalca que la identificación fenotípica de *A. butzleri* es dificultosa debido a su escasa actividad metabólica y las pocas pruebas que se pueden utilizar, a su vez, no dan resultados bien definidos y pueden conducir a resultados erróneos.

1.4.2 *Arcobacter cryaerophilus*.

A. cryaerophilus es la especie de *Arcobacter* predominantemente asociada a casos de aborto en animales. Se ha aislado también de pacientes con cáncer, fallo renal y hasta en pacientes con hiperuricemia y alcoholismo. También se ha aislado en Suiza a partir de muestras de heces de trabajadores de mataderos, sin síntomas de infección (Fernández et al. 2007).

1.4.3 *Arcobacter skirrowii*.

Esta especie de *Arcobacter* fue inicialmente aislada de muestras de heces de ovejas con diarrea, productos de abortos en cerdos, fetos bovinos y ovinos, además de encontrarlo en prepucio de toros. Ha sido asociada a pacientes ancianos con diarreas crónicas y en algunas ocasiones con gastroenteritis, tanto en adultos como en niños (Calvo et al. 2013).

1.4.4 *Arcobacter thereius*.

Se ha recuperado de hígados y riñones de cerdos con abortos espontáneos y en muestras de las cloacas de patos (Calvo et al. 2013).

1.5 Vías de transmisión.

(Fernández et al. 2007) indica que la transmisión de estas bacterias al ser humano se realiza por vía fecal oral a través del consumo de agua o alimentos de origen animal contaminados, o bien, por contacto con animales reservorios (Wesley et al. 2000).

(Calvo et al. 2013) Indica que el género *Arcobacter* ha sido aislado a partir de ganado vacuno, porcino, ovino, caprino, en pollo y otras aves de corral, como también en fetos de abortos porcinos y bovinos, productos cárnicos, moluscos y leche, además señala que los miembros de género *Arcobacter* no son parte de la flora intestinal y el humano se puede infectar por la presencia de este organismo en alimentos de origen animal o en agua, entre otras vías de transmisión que aún no están bien definidas.

Según (De Smet et al. 2011) las rutas de infección aún no están claras, pero se supone provienen de alimentos y agua, contacto con mascotas infectadas y la transmisión de persona a

persona también se ha identificado como rutas potenciales de infección humana (Fera et al. 2009); (Houf et al. 2008); (Petersen et al. 2007) ; (Vandamme et al. 1992).

(Yesilmen et al. 2014) señala que el género *Arcobacter* podrían transmitirse a los humanos con consumo y manipulación de alimentos crudos o poco cocinados de origen animal (Giacometti et al. 2014); (Shah et al. 2012); (Van Driessche et al. 2005).

1.5.1 Transmisión por agua.

(Bayas 2016) argumenta que las aguas de mar son consideradas el hábitat natural para muchas especies del género *Arcobacter*, y el hecho de que en los últimos años un gran número de nuevas especies hayan sido aisladas inicialmente de moluscos, probablemente se deba a que éstos son grandes filtradores de agua (Levican et al. 2012); (Levican et al. 2013); (Levican et al. 2015).

El agua residual también ha sido propuesta como otro reservorio importante de este género. De hecho, las aguas residuales han dado origen al descubrimiento de nuevas especies, como *A. defluvii* en 2011 y *A. faecis* en 2015 ; (Collado et al. 2011); (Whiteduck et al. 2016).

Estudios de prevalencia de *Arcobacter* han revelado la presencia de este microorganismo en aguas subterráneas, residuales, de ríos, lagos y mares (Rice et al. 1999); (Moreno et al. 2003); (Fera et al. 2004); (Morita et al. 2004).

1.5.2 Transmisión por contacto con animales.

(Zihomara, 2011) indica que el hecho de que especies del género *Arcobacter* se hallan aislados de muestras fecales y fluido oral de animales domésticos como perros y gatos, sugiere que estos podrían ser una importante ruta de difusión de *Arcobacter* al ambiente y al ser humano (Fera et al. 2009); (Fernández et al. 2007).

(Calvo et al. 2013) manifiesta que *Arcobacter* spp. Es frecuentemente aislado en muestras de origen animal, tales como pollo, cerdo, res y ovejas, la mayor incidencia se encuentra en pollos, seguida de cerdos y luego res. La alta prevalencia de *Arcobacter* en los tractos intestinales y muestras fecales de los animales de granja y en muchos productos de carne apoya la hipótesis

de que los alimentos son una de sus principales rutas de transmisión, planteando que el mal manejo de los alimentos crudos o el consumo de alimentos mal cocidos contaminados de origen animal como carne, leche, mariscos o comida marina son la vía más probable de transmisión de *Arcobacter*. Así cómo podemos observar en la Tabla 3.

Tabla 3. Prevalencia de *Arcobacter* spp. en Aves, Mamíferos, Peces y Mariscos

Animales	N	ESPECIES DE <i>ARCOBACTER</i>		
		TOTAL	<i>A. butzleri</i>	<i>A. skirrowi</i>
Aves				
Pollos	61	8 (13,1%)	7 (11,5%)	1 (1,6%)
Patos	92	11 (12,0%)	9 (9,8%)	2 (2,2%)
Mamíferos				
Bovinos	72	18 (25,0%)	16 (22,2%)	2 (2,8%)
Porcinos	96	28 (29,2%)	25 (26,0%)	3 (3,1%)
Peces				
Jurel	30	3 (10,0%)	3 (10,0%)	-
Lisa	30	2 (6,6%)	2 (6,6%)	-
Carajito	30	2 (6,6%)	2 (6,6%)	-
Mariscos				
Choro	50	12 (24%)	10 (20,0%)	2 (4,0%)
Langostino	50	11 (22%)	11 (22,0%)	-

Fuente: (Zerpa et al., 2013)

Elaborado: Autor

1.5.3 Transmisión persona a persona.

Se ha sugerido que se podrían dar las condiciones para la transmisión de *Arcobacter* desde una persona infectada a otra, debido al reporte de un par de casos clínicos específicos (Vandamme et al. 1993);(On, Stace et al. 1995). En el primer caso, ocurrido en Italia, todas las cepas aisladas de los 10 pacientes afectados mostraron el mismo fenotipo y genotipo (Vandamme et al. 1992); (1993) y el segundo caso hace referencia a un recién nacido presumiblemente infectado a través de la placenta (On et al. 1995), en ambos casos clínicos la especie aislada fue *A. butzleri* (Zihomara, 2011).

1.6 Reservorio.

Los reservorios naturales del género *Arcobacter* descritos son el tracto intestinal de humanos y animales, órganos reproductores de animales, depósitos de agua, alcantarillado y plantas de

ambiente salino en la literatura médica se ha informado su aislamiento de heces de humanos y de diversos mamíferos y aves (Zerpa et al. 2013).

1.7 Patogenicidad y factores de virulencia del Genero *Arcobacter*

Arcobacter, actualmente catalogadas bacterias emergentes y, también, asociadas a transmisión alimentaria y de creciente importancia en salud pública. El incremento en los datos de prevalencia e incidencia de casos asociados a esta sugiere que la infección en humanos y animales ha sido subestimada, debido a la carencia de conocimientos al respecto y de un protocolo estándar, universalmente aceptado, para el aislamiento primario de este organismo y al uso de correctos métodos y técnicas de identificación (Calvo et al. (2013).

En un reciente estudio desarrollado por (Karadas et al. 2016), en el que se comparaba la patogenicidad de cepas de humanos con las aisladas de porcino, los autores demostraron que *A. butzleri* se adhiere e invade líneas celulares humanas de diferentes orígenes, tales como las células del colon HT-29/B6 (Karadas et al. 2016).

(Bayas, 2016) nos indica que, *A. butzleri* está asociado con enfermedades humanas, muy poco se conoce sobre cuál es el rol que juegan en la infección las características del hospedador, incluyendo edad, sexo y estado inmunológico, pero al igual que con otros patógenos, se estima que son factores predisponentes, que facilitan o propician la infección (Fera et al. 2010).

(Zihomara, 2011) aclara que los mecanismos por los cuales *A. butzleri* induce diarrea han sido investigados en células epiteliales de colon humano (HT-29/B6), indicando que se produce daño en la barrera epitelial por una reducción en la expresión de las proteínas Claudina-1, -5 y -8 así como la inducción de apoptosis epitelial dando lugar a la producción de diarrea (Bücker et al. 2009).

Además, se ha observado producción de respuesta pro inflamatoria inducida por la expresión de Interleuquina-8 en células epiteliales al ser enfrentadas a *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* y *A. cibarius* (Ho et al. 2007). La Figura 1 resume los mecanismos de virulencia descritos para las especies patógenas del género *Arcobacter*.

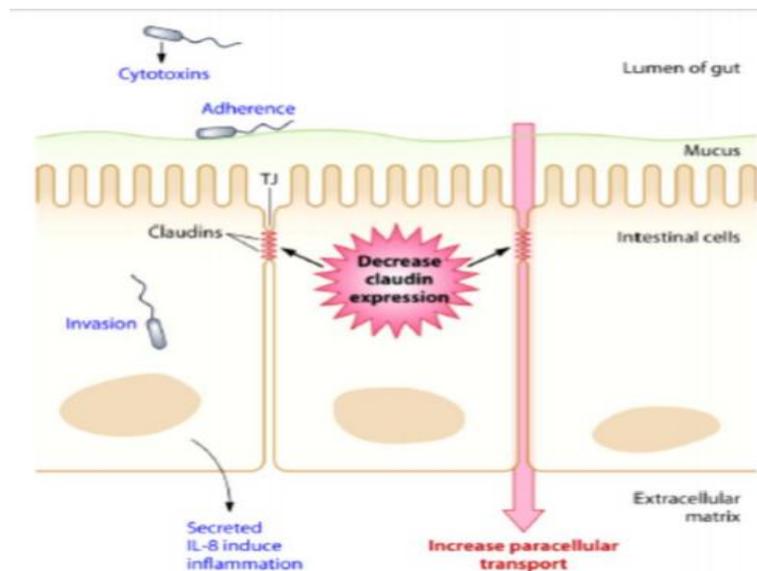


Figura 1. Mecanismos de virulencia descritos para *Arcobacter*.
Fuente: (Collado Y Figueras 2011a)
Elaboración: (Collado Y Figueras 2011a)

1.8 Aislamiento y detección de *Arcobacter* spp.

(Zihomara, 2011) nos manifiesta que a pesar de que se han utilizado varios medios de cultivo y diversos procedimientos para aislar *Arcobacter* de diferentes tipos de muestras, hasta ahora no ha sido propuesto un método óptimo para todas las especies del género (Collado et al. 2011a). Los procedimientos más comunes para el aislamiento de *Arcobacter* constan de una etapa de enriquecimiento en un medio selectivo y una posterior filtración del medio de cultivo sobre agar sangre, sin embargo se ha planteado que la etapa de enriquecimiento reduce la diversidad de especies *Arcobacter* y favorece la detección de especies con crecimiento más rápido como *A. butzleri* (Collado et al. 2011a).

1.8.1 Identificación.

(Zihomara, 2011) nos dice que la identificación fenotípica de las especies del género *Arcobacter* resulta confusa y cuestionable debido a varias razones, entre ellas, el hecho que *Arcobacter* presenta características morfológicas muy parecidas a *Campylobacter*, además éstos microorganismos no utilizan carbohidratos por lo cual se reducen los test bioquímicos de utilidad en taxonomía y también debido a que algunos aislamientos presentan reacciones atípicas en los escasos test disponibles (Atabay et al. 2006). Es por esto, que han sido desarrollados varios

métodos moleculares para la identificación a nivel de género y especie (Collado et al. 2008), aunque ninguno de estos permite la identificación de las 12 especies actualmente aceptadas en el género.

1.9 Resistencia a Antibióticos.

(Calvo et al. 2013) menciona la mayoría de los casos de enteritis causada por *Arcobacter* son auto limitadas y no requieren de terapia antimicrobiana, aunque la severidad y prolongación de los síntomas pueden justificar la antibioticoterapia. Para el caso de *Arcobacter* no se han estandarizado los test de susceptibilidad y se han ensayado E-test, dilución en agar, difusión en agar por discos, métodos de micro dilución en caldo, los cuales han revelado que algunas cepas de *A butzleri* son resistentes a la clindamicina, azitromicina, ciprofloxacina, metronidazole, carbenicillina, a la cefoperazona, al cloranfenicol y ampicilina.

(Calvo et al. 2013) menciona que el tratamiento con fluoroquinolonas y tetraciclina se ha propuesto para el tratamiento de las infecciones por *Arcobacter* tanto en animales como en humanos ya que estos presentan una buena actividad contra las cepas de *Arcobacter*.

1.9.1 Mecanismo de Resistencia.

Las quinolonas son un grupo importante de antibióticos bactericidas que actúan al inhibir las topoisomerasas bacterianas tipo II. Una de las primeras quinolonas en uso clínico es el ácido nalidíxico (Álvarez et al. 2015).

(Álvarez et al. 2015) indica que las bacterias típicamente desarrollan resistencia a las quinolonas a través de mutaciones cromosómicas en los genes que codifican las topoisomerasas II o a través de alteraciones en la expresión de porinas de membrana y bombas de expulsión de fármacos que determinan la concentración del fármaco en el interior de la bacteria. Son poco comunes los efectos secundarios pero incluyen náuseas vómito, diarrea y rara vez tendinitis, rotura de tendón y neuropatía periférica.

(Álvarez et al. 2015) menciona que la reducción de la concentración intracelular de quinolonas se da principalmente por dos mecanismos; pasivamente, mediante reducción de la permeabilidad por "*downregulation*" de proteínas extra-membranales que forman canales y activamente, mediante sobreexpresión de sistemas de eflujo multidroga pertenecientes a la

superfamilia de división de resistencia-nodulación (DRN), AcrAB-TolC³⁶. Estos últimos reducen la acumulación de quinolonas en el citoplasma, proporcionando el tiempo suficiente para que la bacteria se adapte y adquiera resistencia.

1.9.2 Técnica Molecular de Identificación de Especies de *Arcobacter*

(Valcárcel, 2014) nos comenta que las técnicas están basadas en el análisis del ADN genómico bacteriano. Son especialmente interesantes en la detección e identificación de microorganismos muy sensibles a las condiciones ambientales o a la presencia de microbiota competitiva, o de difícil cultivo. Estas técnicas no dependen de la expresión fenotípica, por lo que los resultados obtenidos son consistentes y reproducibles. Como presentan una gran sensibilidad a variaciones mínimas en las secuencias de nucleótidos, constituyen métodos precisos de identificación bacteriana. Entre los métodos moleculares existentes estarían las sondas de ácidos nucleicos y la PCR. Recientemente se han desarrollado modificaciones de la técnica PCR, de las cuales, las principales adaptaciones al protocolo básico de PCR serían RT-PCR, Nested PCR, Multiplex PCR, PCR cuantitativa y PCR in situ (Vílchez et al. 2009).

1.9.2.1 Reacción en la cadena de la polimerasa (PCR).

(Tamay et al. 2013) nos explica la reacción en cadena de la polimerasa es una reacción in vitro que amplifica una secuencia específica de ADN. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células.

La PCR se lleva a cabo en tres pasos: desnaturalización, va a permitir la separación de dos hebras de ADN; hibridación en el cual los primers se alinean al extremo 3' del ADN y se forman complejo templado- primer; Extension, aquí la Taq actúa sobre el complejo agregado dNTPs complementarios para crear cadenas de ADN (Tamay et al. 2013).

1.9.2.3 Multiplex-PCR.

Es uno de los métodos más utilizados en la actualidad y fue desarrollado por Houf et al. (2000) donde se diseñaron cinco cebadores dirigidos a los genes ARN 16S Y 23S para la identificación de *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y *A. skirrowi*.

Douidah et al. (2010), Realizaron una multiplex- PCR con cinco cebadores dirigidas hacia el gen 23S ARNr para *A. butzleri*, *A. skirrowi*, *A. thereius* y *A. cibarius* y dos cebadores dirigidos hacia

el gen *gryA* para *A. cryaerophilus*, siendo una herramienta útil y precisa para la identificación a nivel de especies de estos patógenos emergentes, además el tamaño de los fragmentos generados difieren significativamente uno del otro (Tabla 4).

Tabla Nro. 4 Identificación de especies de *Arcobacter* mediante Multiplex-PCR

Especie	Gen	Tamaño del Producto (pb)
<i>A. butzleri</i>	23S ARNr	2061
<i>A. thereius</i>	23S ARNr	1590
<i>A. cibarius</i>	23S ARNr	1125
<i>A. cryaerophilus</i>	GyrasA	396
<i>A. skirrowi</i>	23S ARNr	198

Fuente: (Doudah et al., 2010)

Elaboración: Autor

CAPÍTULO II

METODOLOGIA

2.1 Muestras.

Para el estudio se trabajó con muestras de leche cruda provenientes de los acopios de las ciudades de Loja y Zamora Chinchipe; transportadas en tanques refrigerados de acero inoxidable de la empresa Ecolac. El muestreo se realizó en meses de pocas lluvias con temperaturas entre 18°C a 23°C.

Las muestras fueron recolectadas durante los meses de mayo y abril de 2017 en recipientes estériles y transportadas al Laboratorio de Microbiología de Investigación de la Sección de Genética Humana, Microbiología y Bioquímica Clínica de la Universidad Técnica Particular de Loja.

2.2 Preparación de la unidad de muestra.

Las muestras fueron almacenadas en refrigeración con el fin de que no haya una alteración de los resultados. Se tomó una alícuota de 12.5 ml de leche y se mezcló en 112,5 ml de caldo *Arcobacter* suplementadas con mezcla de antibiótico cefoperazona-anfotericina-teicoplanina (CAT). De la solución anterior se tomó 1ml y se lo depositó en un tubo que contenía 9 ml de caldo *Arcobacter* modificado, con extracto de levadura al 1% y sangre al 5% (Figura 2).

2.3 Identificación fenotípica de *Arcobacter*

2.3.1 Aislamiento y detección.

Las muestras sembradas en el medio de transporte fueron incubadas a 30°C durante 72 horas en aerobiosis. Pasado este tiempo fueron filtradas (filtro de membrana de triacetato de celulosa de 47mm), en Agar Sangre enriquecido con extracto de levadura (Anexo 1), se procedió a incubar por 48 a 72 horas a 30°C en aerobiosis. (Figura 2).

Aislamiento y Detección de *Arcobacter* en Leche Cruda

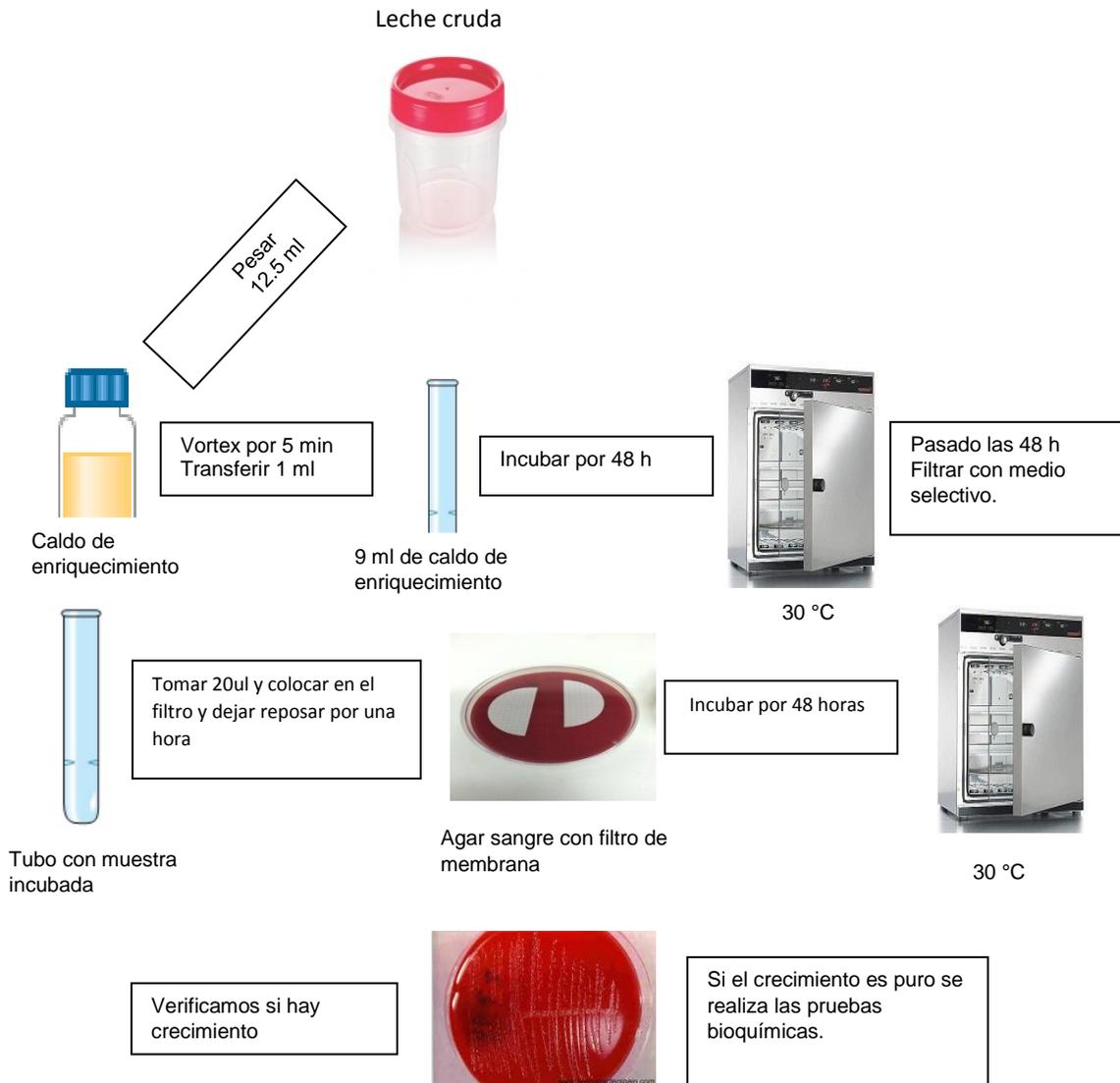


Figura 2. Técnica de aislamiento de *Arcobacter*.

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

2.3.2 Identificación Morfológica.

Se catalogó como colonias sospechosas aquellas que pasaron por el filtro y presentaron características típicas del género: colonias pequeñas, brillantes, de bordes lisos y con un olor característico. Se tomaron colonias aisladas y se realizó la tinción de Gram modificada y tinción de Hucker, y se los consideró como presuntivos de *Arcobacter* aquellos que presentaron bacilos curvos en forma de "S" itálica, y Gram negativos de color morado respectivamente. (Anexo 2).

Se emplearon cepas control donadas por la Universidad Austral de Chile.

2.3.3 Identificación bioquímica

Para las cepas presuntivas de *Arcobacter* se les realizó las diferentes pruebas:

Tabla Nro. 5 Identificación presuntiva de *Arcobacter*

	Positiva	Negativa	Positiva Color Morado	Negativa Color Pálido
Oxidasa	X			
Catalasa	X			
Hipurato			x	

Fuente: (Autor)

Elaboración: Autor

- Las cepas confirmadas de *Arcobacter* se procedió a crioconservar, en glicerol y en dimetil sulfoxido (DMSO) al 10%, en el – 80 °C. (Anexo 4)

2.4 Identificación molecular o genotípica

Los cultivos puros de las cepas aisladas y los controles positivos se realizó la extracción del ADN mediante el uso del kit de purificación de ADN Genómico Wizard Promega (Anexo 5). El ADN obtenido fue conservado a – 80°C.

2.4.1. Multiplex-PCR.

Las cepas de *Arcobacter* se analizaron para determinar las especies, por medio de la técnica Multiplex PCR descrita por Doudah et al. (2010). Se trabajó con un volumen final de reacción de 25 ul (Anexo 6). Se empleó 5ul de ADN, 5X Green GoTaq Buffer, 10Mm dNTPs, 25Mm MgCl₂, 5ul GoTaq flexi ADN polimerasa (Promega). Para la identificación a nivel de especie se amplificaron fragmentos del gen 23S ARNr y del gen Gyrasa A, para ello se usó cebadores a una concentración de 5um (Invitrogen) detallados en la Tabla 6.

Tabla 6. Identificación de especies de *Arcobacter*.

Especie	Cebador	Gen	Tamaño (pb)	Secuencia
<i>A. butzleri</i>	ArcoF	23S ARNr	2061	5'-GCYAGAGGAAGAGAAATCAA-3'
	ButR			5'-TCCTGATACAAGATAATTGTACG-3'
<i>A. thereius</i>	ArcoF	23S ARNr	1590	5'-GCYAGAGGAAGAGAAATCAA-3'
	TherR			5' GCAACCTCTTTGGCTTACGAA-3'
<i>A. cibarius</i>	ArcoF	23S ARNr	1125	5'-GCYAGAGGAAGAGAAATCAA-3'
	CibR			5'-CGAACAGGATTCTCACCTGT-3'
<i>A. cryaerophilus</i>	GyrasF	Gyrasa A	395	5'-AGAACATCACTAAATGAGTTCTCT-3'
	GyrasR			5'-CCAACAATATTTCCAGTYTTTGGT-3'
<i>A. skirrowii</i>	ArcoF	23S ARNr	198	5'-GCYAGAGGAAGAGAAATCAA-3'
	SkiR			5'-TCAGGATACCATTAAAGTTATTGATG-3'

Fuente: (Doudah et al., 2010).

Elaboración: Autor.

La amplificación de los genes se realizó mediante una multiplex- PCR touchdown, disminuyendo 0.5 °C cada ciclo (Tabla 7). Los amplicones generados fueron detectados en un gel de agarosa Ultrapura (Invitrogen) al 2% con condiciones de corrida de 120 V, 60 min, 300 mA; usándose un peso molecular de 100 pb (Promega) (Anexo 7). Las bandas se visualizaron en un tras luminador UV Enduro GDSTOUCH Labnet.

Tabla 7. Condiciones de la multiplex-PCR touchdown

Etapa	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	2 min.	1
Desnaturalización	95	45 seg.	
Anillamiento	61	45 seg.	8
Extensión	72	2 min.	
Desnaturalización	95	45 seg.	
Anillamiento	56	45 seg.	27
Extensión	72	2 min.	
Extensión final	72	10 min.	1

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

2.5 Susceptibilidad antimicrobiana

2.5.1 Método de difusión en disco.

Para el método de difusión en disco se probaron 6 antibióticos: Eritromicina (E- 15ug); Gentamicina (GM-10ug); Ciprofloxacino (CIP-5ug); Acido Nalidixico (NA-30ug); Ampicilina (AM-10ug); Tetraciclina (TE-30ug).

Las cepas aisladas fueron sembradas en placas de Agar sangre enriquecidas con extracto de levadura a 30°C por 48 horas, a partir de este cultivo se preparó una suspensión en suero fisiológico hasta una turbidez de 0.5 en la escala de McFarland. Posteriormente con un hisopo estéril, se realizó la siembra sobre la placa de Agar Muller Hinton enriquecido con extracto de levadura al 1% y sangre al 5%.

La interpretación de los resultados se llevó a cabo en base a las recomendaciones del comité Europeo de Pruebas de susceptibilidad según el (SFM y EUCAST, 2017) siguiendo los puntos de corte para *Campylobacter* spp. y Enterobacterias ya que en la actualidad no se han desarrollado puntos de corte estandarizados para la evaluación de susceptibilidad de especies de *Arcobacter* (Tabla 8).

Tabla 8. Criterios de interpretación de susceptibilidad antimicrobiana.

Antibióticos	Concentración del disco (µg)	Diámetro del punto de corte (mm)	
		S ≥	R <
Eritromicina	15	20	20
Gentamicina	10	17	14
Ciprofloxacina	5	26	26
Ácido nalidíxico	30	19	14
Ampicilina	10	14	14
Tetraciclina	30	30	30

S: sensible; R: resistente.

Fuente: SFM & EUCAST, (2017).

Elaboración: Autor.

CAPITULO III:
RESULTADOS Y DISCUSION

Las especies del género *Arcobacter* son consideradas como patógenos emergentes que se transmiten por alimentos, particularmente a través de carnes inadecuadamente cocidas u otros alimentos de origen animal contaminados con materia fecal (Tompkin et al., 2002); (Shah et al. 2011).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron una prevalencia de *Arcobacter* spp. del 18% (9/50), como observamos en la Tabla 9.

Tabla 9. Prevalencia de especies de *Arcobacter* en leche cruda

	Nº	%
Muestras positivas	9	18
Muestras negativas	41	82
Total	50	100

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

Se identificó como *A. butzleri* la única especie aislada a partir de leche cruda de origen bovino, (Figura 3). Estos son los primeros reportes de prevalencia de estas bacterias aisladas de leche cruda en el Ecuador, sin embargo, en comparación con datos registrados de otras investigaciones llevadas a cabo en diferentes países del mundo, las tasas de prevalencia son diversas.

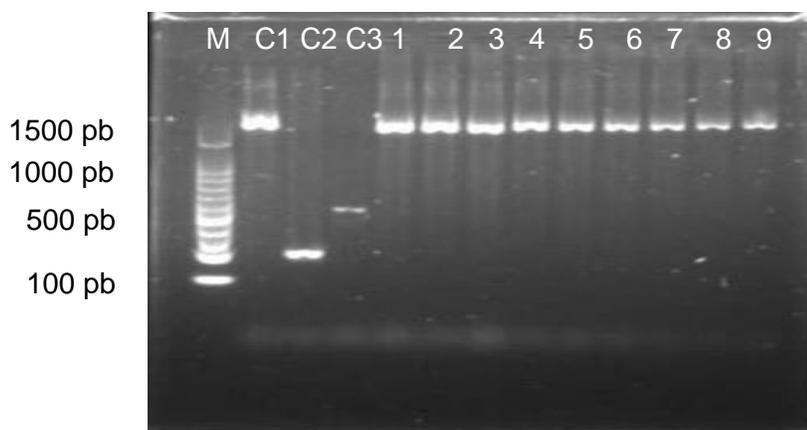


Figura 3. Identificación molecular de especies de *Arcobacter* mediante multiplex PCR. En muestras de leche cruda. Electroforesis en gel de agarosa al 2% a la izquierda se muestra las bandas de los controles positivos empleados; C1 (*A. butzleri*), C2 (*A. skirrowi*), C3 (*A. cryaerophilus*); los carriles del 1 al 9 corresponden a las muestras. M: marcador de peso molecular de 100 pb.

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

Se muestra la amplificación de los fragmentos esperados para la identificación de *A. butzleri* (2061 pb), *A. therius* (1590 pb), *A. cryaerophilus* (395 pb) y *A. skirrowi* (198 pb) mediante Multiplex PCR de acuerdo los descritos por (Doudah et al. 2010)

En un estudio realizado en Brasil (Pianta et al. 2007) reportó por primera vez el aislamiento de *Arcobacter* spp. en leche cruda con una frecuencia del 3%, siendo más prevalente *A. cryaerophilus*, seguida de *A. butzleri*. SHAH et al. (2012), en su estudio llevado a cabo en Malaysia encontraron una prevalencia del 5.8% de *Arcobacter* spp. en leche de vacas clínicamente sanas, identificando en un 60% *A. butzleri*, seguida de *A. cryaerophilus* en un 40%. (Ertas et al. 2010) obtuvieron resultados similares, con un 6% de aislamiento de *Arcobacter* spp. en leche cruda, siendo las especies detectadas *A. skirrowii* y *A. butzleri*, estos resultados son inferiores a los encontrados en este estudio.

Datos más recientes y superiores a los encontrados en esta investigación fueron los obtenidos por (Elmali et al. 2017) quienes reportaron una prevalencia del 23.9% de *Arcobacter* spp. en leche cruda, no obstante, en este estudio la especie más frecuentemente detectada fue *A. cryaerophilus* con un 36.3%. Giacometti et al. (2015) determinaron tasas de prevalencia del género del 22.6%, encontrando únicamente *A. butzleri* en muestras de leche así como en los sistemas de ordeño, también fue frecuente aislarla a partir de muestras de agua, hisopados de las ubres y muestras fecales de los animales.

En un estudio llevado a cabo por (Scullion et al. 2006) en Irlanda del Norte, la prevalencia de *Arcobacter* spp. en leche cruda local fue del 46%, los autores explican que las elevadas tasas de aislamiento pueden deberse a la contaminación de la leche con materia fecal presente en las ubres de las vacas. La investigación realizada por (Yesilmen et al. 2014), en leche de vaca, leche de búfalo y queso fresco mostró una elevada prevalencia de estas bacterias con porcentajes del 36%, 48% y 56% respectivamente, siendo interesante el aislamiento de 8 especies de *Arcobacter* diferentes, de las cuales la más prevalente en muestras de leche de vaca fue *A. butzleri* con un 38.8%.

(Ertas et al. 2010) señala que la contaminación de la leche con estos patógenos está sujeta a múltiples fuentes y vías de transmisión, el agua y los mismos animales son los principales focos de contaminación de la leche. *Arcobacter* spp. coloniza el tracto digestivo de los bovinos sin causarle ninguna sintomatología, no obstante expulsan en sus heces una gran cantidad de estas bacterias, las cuales pueden llegar hasta las ubres y permanecer viables contaminando la

leche al momento de la ordeña (Aydin et al. 2007); (Öngör et al. 2004). En el ámbito industrial, es importante considerar que la leche contaminada con *Arcobacter* que procedente de un solo animal basta para contaminar todo el tanque de almacenamiento del producto (Scullion et al. 2006). Los tanques de almacenamiento de la leche se ha observado son lugares propicios para el aislamiento de estas bacterias, con porcentajes de hasta un 80% (Giacometti et al. 2015).

Los resultados obtenidos en este trabajo referente a la presencia de *A. butzleri* en leche cruda, podrían coincidir con la hipótesis que plantea un alto nivel de contaminación fecal de la leche (Collado et al. 2008). Es así, que la prevalencia de *Arcobacter* en leche cruda está relacionada directamente con las condiciones higiénicas instauradas en la granja, con las fuentes de agua, dieta de los animales, metodología de muestreo y/o asilamiento, etc. (Öngör et al. 2004); (Scullion et al. 2006); (Van Driessche et al. 2005); Por otro lado, se ha observado que la distribución de las especies es muy dependiente del tipo de muestra, siendo más frecuente el aislamiento de *A. cryarophilus* y *A. skirrowii* a partir de muestras fecales del ganado bovino, mientras que *A. butzleri* tiende a ser aislada con mayor frecuencia en la leche, ubres y máquinas de ordeño, sugiriéndose que la contaminación de la leche proviene principalmente de las ubres de los animales y de las máquinas empleadas (en estas últimas incluso a pesar de haber sido sanitizadas) (Giacometti et al. 2015). Parece ser que *A. butzleri*, a diferencia del resto de las especies del género, es afectada parcialmente por los procesos de sanitización, lo que al parecer permite la selección de las cepas de *A. butzleri* más resistentes permitiéndoles sobrevivir en una gran variedad de alimentos y ambientes (Giacometti et al. 2015); (Giacometti et al. 2013); (Giacometti et al. 2014).

En la figura 4 se muestran los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de seis antibióticos frente a las cepas de *A. butzleri* aisladas por el método de difusión en disco, del total de aislamientos de *A. butzleri* se observaron mayores frecuencias de resistencia al ácido nalidíxico con un 100%, seguido de tetraciclina con un 77.78%, ciprofloxacina y ampicilina con un 44.45%. La eritromicina presentó una sensibilidad con un 33.33% de resistencia, la gentamicina registrándose un 100%. Estos datos hacen evidente que el uso de algunos antibióticos en la clínica veterinaria es frecuente en nuestro medio, como es el caso de las tetraciclinas o de las quinolonas.

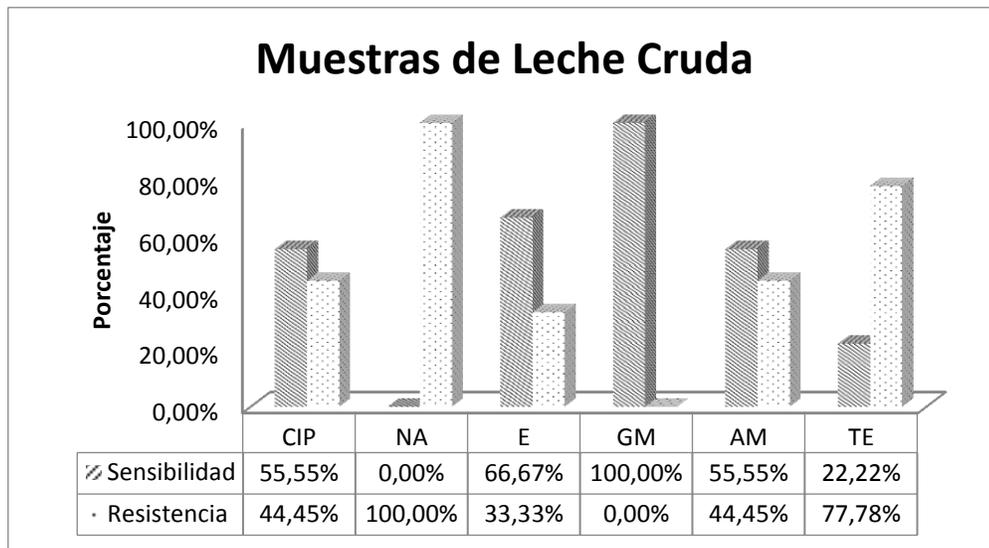


Figura 4. Actividad antimicrobiana
Fuente: Autor
Elaboración: Autor

A pesar de que los datos sobre los perfiles de susceptibilidad de *Arcobacter* spp. son limitados, especialmente en cepas procedentes de leche y productos lácteos, se cuenta con algunos trabajos que expresan resultados dispares, probablemente sujetos a la frecuencia y forma de uso de estos antibióticos en los países donde se llevaron a cabo.

Similar datos a los obtenidos en esta investigación, encontraron (Yesilmen et al. 2014) en donde las mayores tasas de resistencia a tetraciclinas y ampicilina. En comparación a lo reportado por otros autores, con tasas de sensibilidad elevadas a la tetraciclina (Zacharow et al. 2015); (Kabeya et al. 2004); (Atabay et al. 2001), incluso mayor al 91% (Elmali et al. 2017); (Shah et al. 2012).

Se han observado elevadas tasas de resistencia al ácido nalidíxico (Elmali et al. 2017); (Collado et al. 2014) ; e incluso eritromicina (Akıncioğlu, 2011); (Yesilmen et al. 2014); (Zacharow et al. 2015). Como se observó el antibiótico más eficiente en este trabajo fue la gentamicina, sin embargo en otros estudios se han reportado porcentajes de hasta un 22% de resistencia para este antibiótico (Elmali et al. 2017) manifestando una relación directa entre el grado de uso de estas drogas y el porcentaje de resistencia bacteriana.

El hallazgo de *A. butzleri* en leche cruda en este trabajo, es de gran importancia debido a que como resultado del consumo de este alimento contaminado con *Arcobacter*, es posible que en el ser humano se desarrolle una gastroenteritis entre otros síntomas (Snelling et al. 2006); (Ertas et al. 2010). A pesar de que un proceso de pasteurización elimina las bacterias, sigue

representando un riesgo de contaminación hacia otros productos alimenticios por diferentes vías (Scullion et al. 2006), además de que en nuestro medio aún se considera común el consumo de leche cruda especialmente en zonas rurales.

Los resultados presentados en este estudio, muestran que la leche cruda es un alimento propenso a estar contaminado con *Arcobacter* spp. particularmente por *A. butzleri*, la cual mostró elevadas tasas de resistencia a antibióticos de uso común en la clínica humana, como lo es la tetraciclina, tendiendo como antibiótico de mejor espectro la gentamicina, al mostrar tasas de sensibilidad de un 100%.

CONCLUSIONES

- La prevalencia de *Arcobacter spp.* en muestras de leche cruda fue del 18%.
- Se determinó que la especie de *Arcobacter* aislada fue la especie *butzleri*.
- La resistencia antimicrobiana de *Arcobacter spp.* en leche cruda fue para ácido nalixídico 100%, tetraciclina 77.78%, ampicilina 44.45%, ciprofloxacina 44.45%, eritromicina 33.33% y gentamicina 100% de sensibilidad.
- Referente a la susceptibilidad antimicrobiana podemos darnos cuenta del mal manejo de antibióticos que existe a nivel veterinario ya que el porcentaje de resistencia frente a ácido nalixídico y tetraciclina es muy alto lo cual hace evidente que no hay un manejo adecuado. Por lo tanto al no llevar una buena administración de antibióticos solo pelagra la salud del consumidor ya que al momento de ingerir leche cruda puede ser contaminado de dicha bacteria y al querer ser tratada con dichos antibióticos va a existir resistencia al medicamento, dándonos como consecuencia utilizar antibióticos más fuertes como es el caso de antibióticos de tercera generación.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda analizar otros productos derivados lácteos como queso, yogurt, manjar, bebidas lácteas y determinar la posible presencia de esta bacteria.
- En cuanto al trabajo realizado se recomienda ampliar el muestreo con el fin de determinar otras especies que podrían ser patógenas para el hombre.
- Las etapas de aislamiento directo y de enriquecimiento se las puede realizar conjuntamente, con la finalidad de potenciar la sensibilidad y especificidad en la determinación de la bacteria *Arcobacter spp.*
- No hay suficiente evidencia para la patogenicidad de otras especies (*A. nitrofigilis*, *A. halophilus*, *A. cloacae*, *A. bivalvorum* y *A. cibarius*) en animales o humanos por lo que sería recomendable estudiar estas especies y posibles fuentes de transmisión.
- Se recomienda utilizar el antibiótico CAT ya que se comprobó un mayor crecimiento de bacterias del género *Arcobacter spp.*

BIBLIOGRAFÍA

- Akincioğlu, F. (2011). Isolation of *Arcobacter* species from different water sources and characterization of isolated species by molecular techniques (Master thesis). İzmir Institute of Technology, İzmir.
- Álvarez-Hernández, D. A., Garza-Mayén, G. S., & Vázquez-López, R. (2015). Quinolonas: Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Revista Chilena de Infectología*, 32(5), 499–504. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182015000600002>
- Atabay, H. I., & Aydin, F. (2001). Susceptibility of *Arcobacter butzleri* isolates to 23 antimicrobial agents. *Letters in Applied Microbiology*, 33(6), 430–433. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.01025.x>
- Atabay, H. I., Wainø, M., & Madsen, M. (2006). Detection and diversity of various *Arcobacter* species in Danish poultry. *International Journal of Food Microbiology*, 109(1–2), 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.020>
- Aydin, F., Gümüşsoy, K. S., Atabay, H. I., Iça, T., & Abay, S. (2007). Prevalence and distribution of *Arcobacter* species in various sources in Turkey and molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 103(1), 27–35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03240.x>
- Bayas, I. (2016). Aportaciones a la epidemiología de *arcobacter* y *helicobacter* spp.: aplicación de métodos moleculares a su detección e identificación en alimentos. *Article*. Retrieved from [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/75087/BAYAS - Aportaciones a la epidemiología de *Arcobacter* y *Helicobacter* spp.%3A Aplicación de métodospdf?sequence=1](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/75087/BAYAS - Aportaciones a la epidemiología de Arcobacter y Helicobacter spp.%3A Aplicación de métodospdf?sequence=1)
- Bücker, R., Troeger, H., Kleer, J., Fromm, M., & Schulzke, J. (2009). *Arcobacter butzleri* Induces Barrier Dysfunction in Intestinal HT-29/B6 Cells. *The Journal of Infectious Diseases*, 200(5), 756–764. <https://doi.org/10.1086/600868>
- Calvo, G., Arias, M. L., & Fernández, H. (2013). *Arcobacter*: un patógeno emergente de origen alimentario. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 63(2), 164–172. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222013000200008
- Collado, L., & Figueras, M. J. (2011a). Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 174–192.

<https://doi.org/10.1128/CMR.00034-10>

- Collado, L., & Figueras, M. J. (2011b). Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 174–192. <https://doi.org/10.1128/CMR.00034-10>
- Collado, L., Inza, I., Guarro, J., & Figueras, M. J. (2008). Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution. *Environmental Microbiology*, 10(6), 1635–1640. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01555.x>
- Collado, L., Jara, R., Vásquez, N., & Telsaint, C. (2014). Antimicrobial resistance and virulence genes of *Arcobacter* isolates recovered from edible bivalve molluscs. *Food Control*, 46, 508–512. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.013>
- De Smet, S., Vandamme, P., De Zutter, L., On, S. L. W., Doudah, L., & Houf, K. (2011). *Arcobacter trophiarum* sp. nov., isolated from fattening pigs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(2), 356–361. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.022665-0>
- Delgado, R., Gutierrez, C., & Hurtado, A. (2003). Revista. *ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETA) DE ORIGEN MARINO EN NUEVA ESPARTA II. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y ETIOLÓGICAS*, 34(2), 11–16. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772003000200003
- Doudah, L., De Zutter, L., Vandamme, P., & Houf, K. (2010). Identification of five human and mammal associated *Arcobacter* species by a novel multiplex-PCR assay. *Journal of Microbiological Methods*, 80(3), 281–286. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.01.009>
- Ellis, W., Neill, S., O'Brien, J., Ferguson, H., & Hanna, J. (1977). Isolation of *Spirillum/Vibrio*-like organisms from bovine fetuses. *Veterinary Record*, 100(21), 451–452. <https://doi.org/10.1136/vr.100.21.451>
- Elmali, m., & Can, h. Y. (2017). Occurrence and antimicrobial resistance of *Arcobacter* species in food and slaughterhouse samples. *Food Science and Technology (Campinas)*, 37(ahead), 0–0. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.19516>
- Ertas, N., Dogruer, Y., Gonulalan, Z., Guner, A., & Ulger, I. (2010). Prevalence of *arcobacter* species in drinking water, spring water, and raw milk as determined by multiplex PCR. *Journal of Food Protection*, 73(11), 2099–2102. [33](https://doi.org/10.4315/0362-028X-</p></div><div data-bbox=)

73.11.2099

- Fera, M. T., La Camera, E., Carbone, M., Malara, D., & Pennisi, M. G. (2009). Pet cats as carriers of arcobacter spp. in southern Italy. *Journal of Applied Microbiology*, 106(5), 1661–1666. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04133.x>
- Fera, M. T., Maugeri, T. L., Gugliandolo, C., Beninati, C., Giannone, M., La Camera, E., & Carbone, M. (2004). Detection of Arcobacter spp. in the Coastal Environment of the Mediterranean Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1271–1276. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1271-1276.2004>
- Fera, M. T., Russo, G. T., Di Benedetto, A., La Camera, E., Orlando, A., Giandalia, A., ... Cucinotta, D. (2010). High prevalence of arcobacter carriage in older subjects with type 2 diabetes. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 489784. <https://doi.org/10.1155/2010/489784>
- Fernández, H., & Jaramillo, A. (2016). Arcobacter butzleri. *Revista Chilena de Infectología*, 33(6), 663–664. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000600008>
- Fernández, H., Vera, F., & Villanueva, M. P. (2007). *Especies de Arcobacter y Campylobacter en aves y mamíferos Arcobacter and Campylobacter species in birds and mammals from Southern Chile*. Retrieved from <http://mingaonline.uach.cl/pdf/amv/v39n2/art11.pdf>
- Ferreira, S., Queiroz, J. A., Oleastro, M., & Domingues, F. C. (2016, March 25). Insights in the pathogenesis and resistance of Arcobacter: A review. *Critical Reviews in Microbiology*. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.954523>
- Figueras, M. J., Levican, A., Pujol, I., Ballester, F., Quilez, M. J. R., & Gomez-Bertomeu, F. (2014). A severe case of persistent diarrhoea associated with arcobacter cryaerophilus but attributed to campylobacter sp. and a review of the clinical incidence of Arcobacter spp. *New Microbes and New Infections*, 2(2), 31–37. <https://doi.org/10.1002/2052-2975.35>
- Giacometti, F., Lucchi, A., Di Francesco, A., Delogu, M., Grilli, E., Guarniero, I., ... Serraino, A. (2015). Arcobacter butzleri, Arcobacter cryaerophilus, and Arcobacter skirrowii circulation in a dairy farm and sources of milk contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(15), 5055–5063. <https://doi.org/10.1128/AEM.01035-15>
- Giacometti, F., Lucchi, A., Manfreda, G., Florio, D., Zanoni, R. G., & Serraino, A. (2013). Occurrence and genetic diversity of arcobacter butzleri in an artisanal dairy plant in Italy.

Applied and Environmental Microbiology, 79(21), 6665–6669.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02404-13>

- Giacometti, F., Serraino, A., Pasquali, F., De Cesare, A., Bonerba, E., & Rosmini, R. (2014). Behavior of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* in Ultrahigh-Temperature, Pasteurized, and Raw Cow's Milk Under Different Temperature Conditions. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(1), 15–20. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1597>
- Gonzalez, T., & Rojas, R. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de México*, 47(5), 388–390. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342005000500010>
- Ho, H. T. K., Lipman, L. J. A., Hendriks, H. G. C. J. M., Tooten, P. C. J., Ultee, T., & Gaastra, W. (2007). Interaction of *Arcobacter* spp. with human and porcine intestinal epithelial cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 50(1), 51–58. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00230.x>
- Houf, K., De Smet, S., Baré, J., & Daminet, S. (2008). Dogs as carriers of the emerging pathogen *Arcobacter*. *Veterinary Microbiology*, 130(1–2), 208–213. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.01.006>
- Houf, K., Tutenel, A., De Zutter, L., Van Hoof, J., & Vandamme, P. (2000). Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*. *FEMS Microbiology Letters*, 193(1), 89–94. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(00\)00461-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00461-4)
- Jiang, Z. D., Dupont, H. L., Brown, E. L., Nandy, R. K., Ramamurthy, T., Sinha, A., ... Steffen, R. (2010). Microbial Etiology of Travelers' Diarrhea in Mexico, Guatemala, and India: Importance of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and *Arcobacter* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1417–1419. <https://doi.org/10.1128/JCM.01709-09>
- Kabeya, H., Maruyama, S., Morita, Y., Ohsuga, T., Ozawa, S., Kobayashi, Y., ... Mikami, T. (2004, February 1). Prevalence of *Arcobacter* species in retail meats and antimicrobial susceptibility of the isolates in Japan. *International Journal of Food Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00322-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00322-2)
- Karadas, G., Bücker, R., Sharbati, S., Schulzke, J. D., Alter, T., & Götz, G. (2016). *Arcobacter butzleri* isolates exhibit pathogenic potential in intestinal epithelial cell models. *Journal of*

Applied Microbiology, 120(1), 218–225. <https://doi.org/10.1111/jam.12979>

- Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W., & Gutiérrez, G. (2009). Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Retrieved March 15, 2018, from <http://www.fao.org/3/a-i0480s.pdf>
- Levican, A., Collado, L., Aguilar, C., Yustes, C., Diéguez, A. L., Romalde, J. L., & Figueras, M. J. (2012). *Arcobacter bivalviorum* sp. nov. and *Arcobacter venerupis* sp. nov., new species isolated from shellfish. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(3), 133–138. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.01.002>
- Levican, A., Collado, L., & Figueras, M. J. (2013). *Arcobacter cloacae* sp. nov. and *Arcobacter suis* sp. nov., two new species isolated from food and sewage. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(1), 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.11.003>
- Levican, A., Rubio-Arcos, S., Martínez-Murcia, A., Collado, L., & Figueras, M. J. (2015). *Arcobacter ebronensis* sp. nov. and *Arcobacter aquimarinus* sp. nov., two new species isolated from marine environment. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(1), 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.10.011>
- Moreno, Y., Botella, S., Alonso, J. L., Alonso, L., Ferrús, M. A., Hernández, M., & Hernández, J. (2003). Specific Detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* Strains in Water and Sewage by PCR and Fluorescent In Situ Hybridization Specific Detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* Strains in Water and Sewage by PCR and Fluorescent In Situ Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 1181–1186. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.1181>
- Morita, Y., Maruyama, S., Kabeya, H., Boonmar, S., Nimsuphan, B., Nagai, A., ... Kimura, H. (2004). Isolation and phylogenetic analysis of *Arcobacter* spp. in ground chicken meat and environmental water in Japan and Thailand. *Microbiology and Immunology*, 48(7), 527–533. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2004.tb03548.x>
- Neill, S. D., Ellis, W. A., & O'Brien, J. J. (1978). The biochemical characteristics of *Campylobacter*-like organisms from cattle and pigs. *Research in Veterinary Science*, 25(3), 368–372. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/749088>
- On, S. L. W., Stacey, A., & Smyth, J. (1995). Isolation of *Arcobacter butzleri* from a neonate with bacteraemia. *Journal of Infection*, 31(3), 225–227. <https://doi.org/10.1016/S0163->

4453(95)80031-X

- Öngör, H., Çetinkaya, B., Açıık, M. N., & Atabay, H. I. (2004). Investigation of arcobacters in meat and faecal samples of clinically healthy cattle in Turkey. *Letters in Applied Microbiology*, 38(4), 339–344. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01494.x>
- Petersen, R. F., Harrington, C. S., Kortegaard, H. E., & On, S. L. W. (2007). A PCR-DGGE method for detection and identification of Campylobacter, Helicobacter, Arcobacter and related Epsilonbacteria and its application to saliva samples from humans and domestic pets. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2601–2615. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03515.x>
- Pianta, C., Passos, D. T., Hepp, D., & Oliveira, S. J. de. (2007). Isolation of Arcobacter spp from the milk of dairy cows in Brazil. *Ciência Rural*, 37(1), 171–174. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782007000100027>
- Ramees, T. P., Dhama, K., Karthik, K., Rathore, R. S., Kumar, A., Saminathan, M., ... Singh, R. K. (2017, January 10). Arcobacter: An emerging food-borne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control - A comprehensive review. *Veterinary Quarterly*. <https://doi.org/10.1080/01652176.2017.1323355>
- Rasmussen, L. H., Kjeldgaard, J., Christensen, J. P., & Ingmer, H. (2013). Multilocus sequence typing and biocide tolerance of Arcobacter butzleri from Danish broiler carcasses. *BMC Research Notes*, 6(1), 322. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-322>
- Rice, E. W., Rodgers, M. R., Wesley, I. V., Johnson, C. H., & Tanner, S. A. (1999). Isolation of Arcobacter butzleri from ground water. *Letters in Applied Microbiology*, 28(1), 31–35. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00483.x>
- Rivera, G. (2015). *Determinación de la presencia de los genes putativos de virulencia de Arcobacter en diferentes medios de crecimiento, temperaturas y condiciones atmosféricas*. Zamorano. Retrieved from <https://www.bing.com/search?q=Rivera%2C+G.+Determinación+de+la+presencia+de+los+genes+putativos+de+virulencia+de+Arcobacter+en+diferentes+medios+de+crecimiento%2C+temperaturas+y+condiciones+atmosféricas.&qsn&sp=-1&pq=rivera%2C+g.+determinaci%C3>
- Scullion, R., Harrington, C. S., & Madden, R. H. (2006). Prevalence of Arcobacter spp. in Raw

- Milk and Retail Raw Meats in Northern Ireland. *Journal of Food Protection*, 69(8), 1986–1990. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.8.1986>
- SFM, & EUCAST. (2017). Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
- Shah, A. H., Saleha, A. A., Murugaiyah, M., Zunita, Z., & Memon, A. A. (2012). Prevalence and Distribution of *Arcobacter* spp. in Raw Milk and Retail Raw Beef. *Journal of Food Protection*, 75(8), 1474–1478. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-487>
- Shah, A. H., Saleha, A. A., Zunita, Z., & Murugaiyah, M. (2011, May). *Arcobacter* - An emerging threat to animals and animal origin food products? *Trends in Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.01.010>
- Snelling, W. J., Matsuda, M., Moore, J. E., & Dooley, J. S. G. (2006). Under the microscope: *Arcobacter*. *Letters in Applied Microbiology*, 42(1), 7–14. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01841.x>
- Tamay de dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 22(5), 299–305. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(04\)73092-X](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(04)73092-X)
- Valcárcel, L. (2014). Aplicación de métodos moleculares a la detección y tipificación de patógenos alimentarios en alimentos . Retrieved from [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/40286/TFG LAURA VALCARCEL HERVAS.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/40286/TFG_LAURA_VALCARCEL_HERVAS.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Van Driessche, E., Houf, K., Vangroenweghe, F., De Zutter, L., & Van Hoof, J. (2005). Prevalence, enumeration and strain variation of *Arcobacter* species in the faeces of healthy cattle in Belgium. *Veterinary Microbiology*, 105(2), 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.11.002>
- Vandamme, P., Giesendorf, B. A. J., Van Belkum, A., Pierard, D., Lauwers, S., Kersters, K., ... Quint, W. G. V. (1993, December). Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Arcobacter butzleri* by polymerase chain reaction-mediated DNA fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8308127>
- Vandamme, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Mels, L., Hoste, B., Dewettinck, D., ... Hommez, J. (1992). Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated

- from veterinary specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(3), 344–356. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-3-344>
- Vílchez, G., & Alonso, G. (2009). Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos Scope and limitations of molecular methods applied to epidemiological studies. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(1), 6–12. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562009000100003
- Wesley, I. V., Wells, S. J., Harmon, K. M., Green, A., Schroeder-Tucker, L., Glover, M., & Siddique, I. (2000). Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in dairy cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1994–2000. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.1994-2000.2000>
- Whiteduck-Léveillée, K., Whiteduck-Léveillée, J., Cloutier, M., Tambong, J. T., Xu, R., Topp, E., ... Khan, I. U. H. (2016). Identification, characterization and description of *Arcobacter faecis* sp. nov., isolated from a human waste septic tank. *Systematic and Applied Microbiology*, 39(2), 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.12.002>
- Yesilmen, S., Vural, A., Erkan, M. E., & Yildirim, I. H. (2014). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Arcobacter* species in cow milk, water buffalo milk and fresh village cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 11–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.006>
- Zacharow, I., Bystroń, J., Wałęcka-Zacharska, E., Podkowik, M., & Bania, J. (2015). Prevalence and antimicrobial resistance of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* isolates from retail meat in Lower Silesia region, Poland. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 18(1), 63–69. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2015-0008>
- Zerpa, R., Alarcón, J., Lezama, P., Patiño, L., Reyes, A., Valencia, A., ... Alarcón, M. (2013). Identificación de *Arcobacter* en niños y adultos con/sin diarrea y en reservorios animales: aves, ganado vacuno y porcino, peces y mariscos. *Anales de La Facultad de Medicina*, 73(2), 35. <https://doi.org/10.15381/anales.v73i1.2191>
- Zihomara, R. S. (2011). *EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE DOS MÉTODOS MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES PERTENECIENTES AL GÉNERO ARCOBACTER*. Retrieved from <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2011/fcr7411e/doc/fcr7411e.pdf>

ANEXOS

ANEXO 1: Preparación de Medio AS2 enriquecido con extracto de levadura

Fórmula para 1000 ml

Medio base	Cantidades
Caldo Nutriente Nº 2 (OXOID)	25 g
Extracto de Levadura	10 g
Agar technical Nº 2 (OXOID)	14 g
Sangre	50 ml
Agua destilada	950 ml

NOTA: Ajustar el pH del medio a 7 antes de autoclavar.

Esterilizar el medio de cultivo en autoclave a 120 °C por 15 min, dejar enfriar a temperatura de 50 °C, añadir la sangre y la mezcla por algunos segundos.

Dispensar el medio en cajas Petri estériles, dejar solidificar y almacenar en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

Técnica de filtración en membrana de triacetato de celulosa de 47 mm de diámetro (0.45µm de tamaño poro).

ANEXO 2: Tinción de Hucker

Preparación de 100 ml de reactivo 1 de Hucker

Reactivo 1	
Cristal violeta	2 g
Alcohol etílico	20 ml
Oxalato de amonio	0.8 g
Agua destilada	870 ml

Reactivo 2	
Oxalato de amonio	1%

1. Colocar una asada de la colonia sospechosa y fijar.
2. Colocar unas gotas del reactivo 1 de madera que cubra toda la muestra.
3. Agregar una gota del reactivo 2, dejar actuar la tinción por 2 min, y lavar la muestra en agua corriente.
4. Secar las placas y observar al microscopio con objetivo de 100X.

Anexo 3: Pruebas bioquímicas para la identificación de especies de *Arcobacter*.

Prueba de oxidasa

1. A partir de un cultivo puro, tomar una colonia aislada e inocular sobre una tira de oxidasa.
2. Espera 10 segundos y observar si existe o no un cambio de coloración.
3. Se considera como una prueba positiva en caso de que antes de los 10 segundos se observe un color oscuro de la colonia. Si no hay cambio de la coloración, la prueba es considerada negativa.

Pruebas de catalasa

1. A partir de un cultivo puro, tomar con un asa estéril plástica una colonia aislada y depositarla sobre un portaobjetos limpio.
2. Añadir una gota de peróxido de hidrogeno sobre la colonia.
3. Se considera como prueba positiva la formación de burbujas, ya sea abundantes o no. Una prueba negativa es aquella en la que no se da la producción de burbujas.

Prueba de hipurato

1. Emulsionar bucle de 2mm de crecimiento de la selección restreaked en la placa de inhibición no selectiva o antibiótico a 0,4 ml de solución de hipuratoal 1% en un tubo de 13 x 100 mm. Incubar 2h en baño de agua a 37°C. Añadir 0,2 ml de reactivo de ninhidrina, agitar y reincubar durante 10 min. El color violeta (no mediano o purpura palido) es una reacción positiva.

ANEXO 4: Protocolo de criopreservación

Criopreservación en glicerol

1. A partir de un cultivo puro, tomar con un hisopo estéril todas las colonias.
2. Inocular dentro del criotubo que contiene glicerol.
3. Dejar reposar durante 15 min.
4. Retirar el glicerol restante e identificar las muestras.
5. Almacenar los criotubos a -80 °C.

Criopreservación DMSO

1. Inocular en el caldo tioglicolato la cepa de *Arcobacter* aislada y dejar incubar a 30 °C de 24 – 48 h.
2. Tomar 900 µl de la parte superior del cultivo en tioglicolato y colocar en un eppendorf de 1.5 ml.
3. Añadir 100 µl de DMSO, dar vórtex e identificar las muestras.
4. Almacenar las muestras a -80 °C.

ANEXO 5: Protocolo de Extracción de ADN Genómico de Bacterias Gram negativas

Este protocolo fue basado en el empleo del kit de purificación de ADN genómico de Wizard® para la obtención de ADN procedente de células blancas de ja sangre, cultivos celulares, tejido vegetal, verduras y bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Esta extracción se realiza en cuatro pasos. 1) lisis o rotura de la membrana celular y nuclear. 2) digestión enzimática mediante el uso de RNAsas. 3) Eliminación de proteínas celulares por precipitación salina, quedando el ADN genómico de alto peso molecular en la solución. 4) el ADN es concentrado y desalinizado mediante precipitación con isopropanol.

NOTA: El Kit debe ser almacenado a temperatura ambiente (15-30°C).

REACTIVOS

- Solución de Lisis Celular
- Solución de Lisis Nuclear
- Solución de Precipitación proteica
- Solución de Rehidratación de ADN
- RNAsa-A (4mg/ml)
- Isopropanol
- Etanol al 70%

MATERIALES Y EQUIPOS ,

- Tubos eppendorf de 1.5 ml
- Plancha calentadora de tubos
- Micro-centrifuga
- Vórtex
- Micropipetas
- Hielo

PROCEDIMIENTO

1. Tornar 1ml de cultivo de bacterias incubado durante ja noche y depositarlo en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
2. Centrifugar a 13.000 - 16.000 rpm durante 5 min. hasta obtener un sedimento celular. Eliminar el sobrenadante.
3. Añadir 600 µl de Solución de Lisis Nuclear. Resuspender las células o dar vórtex.

4. Incubar a 80°C durante 5 min para lisar las células y dejar enfriar a temperatura ambiente.
5. Añadir 3 ul de RNAsa, invertir suavemente los tubos de 2-5 veces para mezclar.
6. Incubar a 37°C durante 15-60 min. Enfriar las muestras hasta temperatura ambiente.
7. Añadir 200 ul de Solución de Precipitación Proteica al lisado celular tratado con RNAsa. Dar vórtex vigorosamente durante 20 segundos para mezclar.
8. Incubar las muestras en hielo durante 5 min.
9. Centrifugar a 13.000 -16.000 rpm de 3-6 min.
10. Transferir el sobrenadante que contiene el ADN hacia un tubo eppendorf que contenga 600 ml de isopropanol a temperatura ambiente.
NOTA: Dejar una pequeña cantidad de sobrenadante a fin de evitar la contaminación del ADN con residuos de proteínas.
11. Mezclar suavemente invirtiendo los tubos hasta que las hebras de ADN formen un conglomerado visible.
12. Centrifugar a 13.000 - 16.000 rpm durante 5 min
13. Cuidadosamente eliminar el sobrenadante y conservar el pellet. Añadir 60 ul de etanol al 70 °C y mezclar suavemente invirtiendo el tubo varias veces para lavar el pellet de ADN.
14. Centrifugar a 13.000 - 16.000 rpm durante 2 min. Cuidadosamente aspirar el etanol y desechar.
15. Dejar secar el pellet durante 10-15 min.
16. Añadir 100 µl de Solución Rehidratante de ADN al tubo y rehidratar el ADN, incubar a 65°C durante 60 min.
NOTA: Dar pequeños movimientos periódicamente para mezclar la solución con el ADN.
17. Conservar el ADN obtenido a 2-8 °C.

ANEXO 6: Protocolo de Multiplex-PCR para identificación de especies de Arcobacier.

Este protocolo está diseñado para la identificación de cinco especies (A. buízleri, A. cryaerophilus, A. skirrowii, A. thereius y A. cibarius) pertenecientes al género Arcobacier.

REACTIVOS

- Buffer Green
- dNTPs
- MgCl₂
- TaqPolimerasa
- Agua destilada estéril
- Primers

MATERIALES Y EQUIPOS

- Micropipetas
- Tubos eppendorf 1.5 ml
- Microtubos y tapas de 0.2 ml para PCR
- Termociclador

PROCEDIMIENTO

1. Prepara el mix según las especificaciones de la tabla.

Multiplex-PCR				
Componentes		1X (ul)	Concentración	Concentración final
H ₂ O		9.375		1 X
Buffer Green		5	5 X	200 µM
dNTPs		0.5	10 mM	1.5 µM
MgCl ₂		1.5	25mM	5 µM
Primers	ArcoF	0.5	100 µM	5 µM
	ButR	0.5	100 µM	5 µM
	TherR	0.5	100 µM	5 µM
	CibR	0.5	100 µM	5 µM
	SkiR	0.5	100 µM	5 µM
	GyrasF	0.5	100 µM	5 µM
	GirasR	0.5	100 µM	5 µM
TaqPolimerasa		0.125	5 µM	1.25 U/50 µl
ADN		5		
Volumen de reacción		25		

2. Dispensar 20 µl del mix en cada microtubo y añadir 5 µl de ADN de cada una de las muestras.

3. Mezclar cuidadosamente el ADN con el mix y llevarlo al Termociclador en base a las condiciones.

Condiciones de Multiplex-PCR touchdown

Etapa	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	2 min.	1
Desnaturalización	95	45 seg.	
Anillamiento	61	45 seg.	8
Extensión	72	2 min.	
Desnaturalización	95	45 seg.	
Anillamiento	56	45 seg.	27
Extensión	72	2 min.	
Extensión final	72	10 min.	1

4. Terminada la PCR los productos de PCR son conservados a 4 °C hasta su uso.

ANEXO 7: Protocolo de electroforesis en Gel1 de Agarosa

REACTIVOS

Agarosa Ultrapura

- Buffer TAE 1X
- SYBR
- Marcador de 100 pb

MATERIALES

- Micropipeta
- Matraz de 250 ml
- Probeta de 50 ml
- Espátula
- Cubeta para geles de electroforesis
- Balanza analítica
- Fuente de poder
- Transiluminador UV

PROCEDIMIENTO

1. Disolver 0.7 g de Agarosa Ultrapura en 35 ml de buffer TAE 1X y llevar a ebullición en la plancha calentadora hasta que se disuelva totalmente la agarosa.
2. Añadir 3.5 µl de SYBR, homogenizar, verter todo el contenido en la cubeta, añadir los peines y dejar solidificar.
3. Una vez solidificado el gel, colocar en la cubeta el gel junto con el buffer de corrido (TAE 1X) hasta cubrir totalmente el gel.
4. Cargar los pocillos con cada una de las muestras, controles y marcador de peso molecular de 100 pb.
5. Programar la corrida en la fuente de poder a 120 V, 60 min, 300 mA.
6. Mediante un íransiluminador UV visualizar y registrar las bandas obtenidas.