



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**Prevalencia de *Arcobacter* spp en niños con diarrea y sin diarrea de la
ciudad de Loja**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Beltrán Cano, Lilibeth Alejandra

DIRECTORA: Simaluiza Masabanda, Rosa Janneth, Mgtr

LOJA – ECUADOR

2018



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>

2018

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Mgtr.

Rosa Janneth Simaluiza Masabanda

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: **Prevalencia de *Arcobacter* spp en niños con diarrea y sin diarrea de la ciudad de Loja**, realizado por Beltrán Cano Lilibeth Alejandra, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por lo que se aprueba la aprobación del mismo.

Loja, abril del 2018.

f)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESION DE DERECHOS

Yo, Lilibeth Alejandra Beltrán Cano declaro ser autora del presente trabajo de titulación: **Prevalencia de *Arcobacter* spp en niños con diarrea y sin diarrea de la ciudad de Loja**, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo la Mgtr. Janneth Simaluiza directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posible 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 permitente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional de la Universidad”.

f)

Autora: Beltrán Cano Lilibeth Alejandra

Cédula: 1105042350

DEDICATORIA

A Dios y la Virgencita del Cisne por mantenerme con salud y permitirme cumplir este objetivo en mi vida.

A mis padres, Pablo y Fresia, por su apoyo incondicional durante todo este tiempo, y de manera especial a mi mamá que ha sido mi inspiración y un gran ejemplo, motivándome día a día a seguir adelante y no dejarme vencer a pesar de los obstáculos presentados en el camino. Gracias por ser parte de mi vida, para ti mami es todo esto.

A mi querido hermano, Pablo César por conservarme siempre positiva.

A mis amigos y compañeros que me ayudaron y guiaron durante el desarrollo de este trabajo, sin su apoyo y paciencia no lo habría logrado.

Y finalmente a mis abuelitos, César, Estila, José y Estrella, que son lo más bonito que tengo en mi vida. A mi familia por ser el pilar fundamental en mi vida, su cariño y constancia han sido el motor que me ha permitido llegar a donde estoy, siempre serán mi más grande tesoro.

Con mucho cariño,

Lilibeth Alejandra.

AGRADECIMIENTO

A Dios y a la Virgencita del Cisne, por darme salud y la sabiduría necesaria para terminar con éxito mi carrera universitaria.

A mi directora, Mgtr. Janneth Simaluiza por la confianza y por haberme dado la oportunidad de participar en este proyecto que me ha llenado de mucha satisfacción.

Al Dr. Heriberto Fernández, gracias por aportarnos su conocimiento y habernos apoyado para la finalización de este proyecto.

A mis compañeros Ángel y Nicole, por su amistad, apoyo y colaboración no solo durante la realización de mi tesis, sino en todos los años compartidos, sin ustedes, nada hubiera sido igual.

De manera especial también agradezco a todas y cada una de las personas que estuvieron conmigo y creyeron en mi capacidad para lograr este objetivo, que sin duda me ha llenado de una enorme satisfacción.

Y finalmente a mis compañeros de investigación, Jimmy y Dayanara, que no solo han sido mis compañeros, sino que se han convertido en grandes amigos agradezco su amistad, entrega y sobre todo por los momentos compartidos durante todo este trayecto universitario.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CARÁTULA.....	I
APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESION DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO	V
ÍNDICE DE CONTENIDO	VI
INDICE DE TABLAS	VIII
INDICE DE FIGURAS.....	IX
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I	5
1.1 Antecedentes	6
1.2 Taxonomía	7
1.3. Género <i>Arcobacter</i>	9
1.4. Características fisiológicas	11
1.5. Principales especies zoonóticas.....	13
1.6. Epidemiología.....	14
1.7. Vías de transmisión y reservorios de <i>Arcobacter</i>	16
1.8. Patogenia	18
1.9. Manifestaciones clínicas.....	21
1.10. Identificación y caracterización clínica de <i>Arcobacter</i>	22
1.10.1. Identificación molecular.....	24
1.10.2. Otros métodos moleculares utilizados para la identificación de especies de <i>Arcobacter</i>	25
1.11. Tratamiento	27
1.11.1. Resistencia a antimicrobianos	27
CAPÍTULO II	29
2.1. Recolección de muestras	30
2.2. Procesamiento de muestras.....	30
2.2.1. Inoculación e incubación	30
2.3. Identificación fenotípica de <i>Arcobacter</i>	31
2.3.2. Identificación morfológica.....	31
2.3.3. Identificación mediante pruebas bioquímicas	32
CAPÍTULO III	36

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
3.1. Frecuencia de aislamiento.....	37
3.2. Identificación molecular de especies.	38
3.3. Actividad antimicrobiana.....	42
CONCLUSIONES.....	45
RECOMENDACIONES.....	46
BIBLIOGRAFÍA.....	47
ANEXOS	56
PROTOSCOLOS	57
ANEXO 1: Caldo de enriquecimiento para <i>Arcobacter</i>	57
ANEXO 2: Medio de agar sangre enriquecido para <i>Arcobacter</i>	59
ANEXO 3: Tinción de Hucker.....	61
ANEXO 4: Pruebas bioquímicas para la identificación de especies de <i>Arcobacter</i>	62
ANEXO 5: Caldo tioglicolato modificado	63
ANEXO 6: Criopreservación	64
ANEXO 7: Extracción de ADN Genómico de Bacterias Gram negativas.....	66
ANEXO 8: Multiplex-PCR para identificación de especies de <i>Arcobacter</i>	68
ANEXO 9: Electroforesis en Gel de Agarosa	70
ANEXO 10. Determinación de actividad antimicrobiana.....	71

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Arcobacter</i>	7
Tabla 2. Listado de especies de <i>Arcobacter</i> y origen.....	8
Tabla 3. Propiedades fenotípicas de especies zoonóticas de <i>Arcobacter</i>	12
Tabla 4. Especies del género <i>Arcobacter</i> con sus respectivos cebadores.....	33
Tabla 5. Condiciones utilizadas en PCR múltiple.....	34
Tabla 6. Concentración de antibióticos y puntos de corte.....	35
Tabla 7. Frecuencia de aislamiento de <i>Arcobacter</i> spp.	37

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de <i>Arcobacter</i>	9
Figura 2. Microscopía electrónica de barrido que muestra morfología de <i>Arcobacter</i>	11
Figura 3. Mecanismos de virulencia descritos para <i>Arcobacter</i>	19
Figura 4. A. Inoculación de muestras fecales; B. Incubación a 30°C.....	30
Figura 5. Crecimiento de colonias de <i>Arcobacter</i> spp en agar sangre.....	31
Figura 6. Morfologías de <i>Arcobacter</i> en tinción de Gram y Hucker.....	32
Figura 7. Revelación de gel de agarosa	39
Figura 8. Actividad antimicrobiana de 6 antibióticos frente a <i>A. butzleri</i>	43
Figura 9. Medio de transporte selectivo para <i>Arcobacter</i>	58
Figura 10. Medio de agar sangre enriquecido con extracto de levadura.	59
Figura 11. Método de aislamiento de especies de <i>Arcobacter</i> mediante técnica de filtrado	60
Figura 12. Tinción de Hucker.....	61
Figura 13. Crecimiento en agar MacConkey.....	62
Figura 14. Criotubos inoculados con cepas de <i>Arcobacter</i> spp.....	64
Figura 15. Caldo tioglicolato inoculado con una cepa de <i>Arcobacter</i> spp.....	65
Figura 16. Actividad antimicrobiana de una cepa de <i>A. butzleri</i>	71

RESUMEN

El género *Arcobacter* refiere a bacterias morfológicamente similares al género *Campylobacter*, considerado como enteropatógenos de origen zoonótico emergente, asociados a transmisión por vía alimentaria. El incremento de su aislamiento, ha llamado la atención ya que su incidencia ha sido subestimada tanto en infecciones en humanos como en animales. Se ha asociado principalmente a niños de edad escolar y ancianos con diarrea crónica o gastroenteritis, lo que hace que la preocupación aumente en el sector de salud pública. Se analizaron 100 muestras de heces de niños, de entre 0-12 años de edad, tanto diarreicas como no diarreicas derivadas de distintos centros de salud de la ciudad de Loja. Del total de muestras analizadas un 8% (8/100) correspondieron a *Arcobacter* spp de las cuales el 100% (8/8) pertenecieron a *A. butzleri*. El análisis de susceptibilidad antimicrobiana, arrojó que el 100% de las cepas era resistente hacia ácido nalidíxico, seguida por ampicilina y tetraciclina con un 75%. Por otra parte, las cepas fueron sensibles a gentamicina en un 100%, seguido de ciprofloxacino y eritromicina con un 87.5%.

Palabras clave: *Arcobacter*, prevalencia, niños, emergente.

ABSTRACT

The *Arcobacter* genre refers to bacteria morphologically similar to the *Campylobacter* genre, considered as enteropathogens of emerging zoonotic origin, associated with transmission by food route. The increase of its isolation, has called attention since its incidence has been underestimated both in human and animal infections. It has been associated mainly with children of school age and the elderly with chronic diarrhea or gastroenteritis, which causes the increase of concern in the public health sector. We analyzed 100 stool samples from children, between 0-12 years of age, both diarrheal and non-diarrheal derived from different health centers in the city of Loja. From the total of samples analyzed, 8% (8/100) corresponded to *Arcobacter* spp of which 100% (8/8) belonged to *A. butzleri*. The antimicrobial susceptibility analysis, threw as a result 100% of the strains that showed resistance to nalidixic acid, followed by ampicillin and tetracycline with 75%. On the other hand, the strains were sensitive to gentamicin in 100%, followed by ciprofloxacin and erythromycin with 87.5%.

Key words: *Arcobacter*, prevalence, children, emerging.

INTRODUCCIÓN

Arcobacter es un germen zoonótico que ha sido reconocido como un agente potencialmente patógeno para el ser humano, en particular para los niños en edad escolar. No forman parte de la flora intestinal y los seres humanos pueden infectarse por la presencia de la bacteria en alimentos de origen animal o en agua (Mansilla, 2006).

En la actualidad se ha reconocido a las especies zoonóticas del género *Arcobacter*: *A. cryaerophilus*, *A. butzleri*, *A. skirrowii* y *A. thereius* como patógenos emergentes, agentes de diarrea entre otros cuadros infecciosos en el ser humano (Calvo, Arias, Fernández, 2013). Sin embargo, y a pesar de la importancia que se le ha dado al tema, existe muy poca información acerca de esta bacteria, y en países que se encuentran investigando sobre dichas especies bacterianas la información es aún limitada e incompleta, desconociéndose la mayoría de las características importantes y de relevancia clínica. Además de lo poco que se conoce acerca de factores epidemiológicos como su distribución ecológica, frecuencia de aislamiento en clínica, animales reservorios o alimentos en los que posiblemente se encuentran (Calvo et al., 2013).

Por otro lado, también se sabe que aún es insuficiente la información que se tiene acerca de los factores bacterianos que son los que intervienen en la producción del cuadro infeccioso en los humanos, asimismo de sus perfiles de sensibilidad y resistencia a los antimicrobianos. Se ha visto la identificación de *Arcobacter* en niños con diarrea, pero no en niños sin diarrea; probablemente esto podría indicar que este género es un patógeno potencial en niños, pero por otra parte estudios han demostrado que es menos frecuente que el género *Campylobacter*, que ha sido reconocido como un agente frecuente de diarrea en la población infantil, siendo muy poco común su aislamiento en adultos (Zerpa et al., 2014).

La mayoría de casos de enteritis causada por *Arcobacter* son autolimitadas y no suele requerir de terapia antimicrobiana, sin embargo, cuando el cuadro se prolonga se puede justificar la antibioticoterapia (Calvo et al., 2013). Para el caso de *Arcobacter* no existe un test de susceptibilidad estandarizado; no obstante, dentro de las investigaciones realizadas se han elaborado ensayos E-test, dilución en agar, difusión en agar por discos y métodos de micro dilución en caldo los cuales han revelado que algunas cepas de *Arcobacter butzleri* son resistentes a clindamicina, azitromicina, ciprofloxacino, metronidazol, carbenicilina, cefoperazona, cloranfenicol y ampicilina (Calvo et al., 2013).

El tratamiento con fluoroquinolonas y tetraciclinas se ha propuesto como tratamiento de infecciones por *Arcobacter* tanto en animales como en humanos, ya que se ha visto una buena actividad contra las cepas (Calvo et al., 2013).

Por lo dicho anteriormente se cree que es necesario el estudio e investigación de *Arcobacter*

ya que su búsqueda no se encuentra priorizada dentro del campo clínico y muchas veces puede pasar desprevenida complicando en un futuro la salud de quienes la posean, siendo aún más preocupante el hecho de que se haya visto su aislamiento en niños de corta edad en los cuales suele ser más común.

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes

El género *Arcobacter* fue definido hace aproximadamente 20 años por miembros del género *Campylobacter*, y ha tomado una gran importancia debido a que se han considerado como enteropatógenos emergentes y potenciales agentes de carácter zoonótico (Collado y Figueras, 2011).

Estos microorganismos se han reconocido en un principio como campilobacterias, y fueron observados por primera vez en el año 1881 por el alemán Escherich a partir de heces de niños con diarrea (Bayas, 2016). En primera instancia se definieron como “*Vibrio Spirillum organisms*” debido a su morfología de tipo espiral.

De acuerdo a su historia, en 1913, Mcfaydean y Stockman describieron la existencia de un microorganismo que presentaba una morfología curvada, implicado en casos de abortos e infertilidad en ganado bovino. Mas tarde, en 1919, Smith y Taylor aislaron un espirilo similar a partir de fluidos fetales bovinos, proponiendo el nombre de *Vibrio fetus* (Skirrow, 2006).

En 1931, se aislaron bacterias de forma espiral causantes de enteritis en terneras, pero al diferenciarse de *V. fetus* en cuanto a longitud y número de vueltas de la espiral, se propuso una nueva especie conocida como *V. jejuni* (Bayas, 2016). Posteriormente en 1944 se describió una bacteria similar aislada de intestinos de cerdos con disentería, a los cuales se les nombró como *V. coli* (Son, 2005).

Durante 1963, Sebald y Verón propusieron el género *Campylobacter*, el cual etimológicamente significa “germen curvado”, para agrupar y diferenciar las especies de *Vibrio* anteriormente mencionadas, por su crecimiento microaerófilo, metabolismo no fermentativo y baja composición de ADN (Bayas, 2016). En 1979, se aislaron a partir de abortos de bovinos y porcinos microorganismos que presentaban morfología helicoidal similar a la del género *Campylobacter*, a diferencia de que presentaban la capacidad de crecer en presencia de oxígeno. Después, en 1982 se aislaron campilobacterias aerotolerantes en leche de vaca con mastitis y en 1983 de la cavidad prepucial de ganado bovino (Bayas, 2016).

Unos años después Neill et al. (1985) estudiaron un gran número de cepas de “campilobacterias aerotolerantes” extraídas de animales abortados, definiéndose así una nueva especie, *Campylobacter cryaerophilus*, capaz de crecer en presencia de oxígeno ambiental a 30°C después de un primer aislamiento en microaerofilia.

Posteriormente en 1991, se identificaron un grupo de campilobacterias aerotolerantes de humanos y animales con enfermedades diarreicas diferente a *C. cryaerophilus*, por lo que se propuso una nueva especie, *C. butzleri*. Mas adelante en el mismo año, estudios de

inmunotipificación e hibridación de DNA-RNA corroboraron que no existía ninguna relación genotípica con *Campylobacter*, proponiéndose así un nuevo género denominado *Arcobacter* (Vandamme et al., 1991).

Durante el mismo año se aceptó la inclusión de una nueva familia, *Campylobacteriaceae*, así como la agrupación en ella de los géneros de *Campylobacter* y *Arcobacter*. Este agrupamiento se hizo basándose en las características fenotípicas y genotípicas que estos géneros mantenían en común y que además los separaba de otros (Vandamme et al., 1991). El género fue modificado y ampliado por Vandamme et al. (1992) con la inclusión de otra nueva especie, *A. skirrowii*, recuperado de animales enfermos y abortos. Los mismos autores también propusieron la reclasificación de *Campylobacter butzleri* como *Arcobacter butzleri*.

El género *Arcobacter* se aisló por primera vez en 1977 en la ciudad de Belfast en Reino Unido a partir de fetos bovinos abortados e inicialmente fueron asociados con mastitis bovina y con abortos en ovinos, bovinos y porcinos. Consecutivamente, se relacionó a la bacteria con cuadros clínicos de enteritis, diarreas y bacteremias en el ser humano (Carrizo, 2007).

1.2 Taxonomía

La clasificación descrita por el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology en el año 2012 indica que el género *Arcobacter* forma parte de la familia *Campylobacteriaceae* (Bayas, 2016), y que en conjunto con las familias *Helicobacteriaceae* e *Hydrogenimonaceae* conforman el orden *Campylobacterales* (Collado et al., 2011).

Tabla 1. Taxonomía de *Arcobacter*.

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

Fuente: (Bayas, 2016)

Elaboración: La autora.

Su taxonomía está basada principalmente en el análisis del gen ARNr 16S. El género en la actualidad comprende 25 especies con una diversidad genética significativa (Ramees et al., 2017). El listado de las diferentes especies de *Arcobacter* spp y su origen, se muestran a continuación en la **tabla 2**.

Tabla 2. Listado de especies de *Arcobacter* y origen.

N°	Especie de <i>Arcobacter</i>	Lugar de primer aislamiento	Referencia
(1)	<i>A. Nitrofigilis</i>	Raíces de <i>Spartina alterniflora</i>	McClung et al. (1983)
(2)	<i>A. Cryaerophilus</i>	Feto abortado de bovino	Neill et al. (1985)
(3)	<i>A. Butzleri</i>	Heces humanas	Kiehlbauch et al. (1991)
(4)	<i>A. Skirrowii</i>	Heces de oveja	Vandamme et al. (1992b)
(5)	<i>Candidatus Arcobacter sulfidicus</i>	Agua de mar de la costa	Wirsén et al. (2002)
(6)	<i>A. Cibarius</i>	Carne de pollo	Houf et al. (2003)
(7)	<i>A. Halophilus</i>	Laguna hipersalina	Donachie et al. (2005)
(8)	<i>A. mytili</i> sp. nov.	Mejillones	Collado et al. (2009b)
(9)	<i>A. thereius</i> sp. nov.	Aborto porcino	Houf et al. (2009)
(10)	<i>A. marinus</i> sp. nov.	Agua de mar, algas marinas y una estrella de mar	Kim et al. (2010)
(11)	<i>A. tropharium</i>	Heces de cerdos	De Smet et al. (2011)
(12)	<i>A. defluvii</i> sp. nov.	Muestras de aguas residuales	Collado et al. (2011)
(13)	<i>A. molluscorum</i> sp. nov.	Mariscos	Figueras et al. (2011a, 2011b)
(14)	<i>A. ellisii</i> sp. nov.	Mariscos	Figueras et al. (2011a, 2011b)
(15)	<i>A. venerupiss</i> sp. nov.	Mariscos	Levican et al. (2012)
(16)	<i>A. bivalviorum</i> sp. nov.	Mariscos	Levican et al. (2012)
(17)	<i>A. cloacae</i> sp. nov.	Aguas residuales	Levican et al. (2013a)
(18)	<i>A. suis</i> sp. nov.	Carne de cerdo	Levican et al. (2013a)
(19)	<i>A. anaerophilus</i> sp. nov.	Sedimento estuarino	Sasi Jyothsna et al. (2013)
(20)	<i>A. ebronensis</i> sp. nov.	Mejillones	Levican et al. (2015)
(21)	<i>A. aquimarinus</i> sp. nov.	Agua de mar	Levican et al. (2015)
(22)	<i>A. lanthieri</i> sp. nov.	Ganado y estiércol de cerdo	WhiteduckLeveillee et al. (2015)
(23)	<i>A. pacificus</i>	Agua de mar	Zhang et al. (2016)
(24)	<i>A. acticola</i> sp. nov.	Agua de mar	Park et al. (2016)
(25)	<i>A. lekithochrous</i> sp. nov.	Gran Vieira (<i>Pecten maximus</i>) larvas y tanque de agua de mar	Dieguez et al. (2017)

Fuente: (Ramees et al., 2017).

Elaboración: La autora.

Entre las especies mencionadas, *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* y *A. thereius* se encuentran considerados como patógenos para los seres humanos y los animales (Bayas, 2016; Collado y Figueras, 2011), siendo de estos *A. butzleri*, *A. skirrowii* y además, *A. cibarius* patógenos emergentes transmitidos por alimentos (Ramees et al., 2017).

La evolución de este patógeno debe aclararse de una mejor manera con el fin de conocer sobre su epidemiología y los factores patogénicos que lo conforman. Los plásmidos están generalmente presentes en muchos procariontes y juegan un papel fundamental en la evolución de estas especies (Ricci & Hernández, 2000). Últimamente, se han aislado varios plásmidos pequeños y grandes de *A. butzleri*, en la que la secuencia del plásmido de mayor tamaño reveló que las proteínas peg21, peg22, peg24, peg25, peg26 y peg29 mostraban homología con respecto a la secreción de tipo IV que se encuentra participando en la transferencia de material de ADN y toxinas. Por lo que este mismo plásmido puede desempeñar un papel en la transferencia de genes dentro de *Arcobacter* spp llevando a la evolución de nuevas especies (Doudah et al., 2014). En la figura 1, se presenta el panorama evolutivo que han tenido las especies emergentes de *Arcobacter*, con la inclusión de nuevas especies a lo largo de los años.

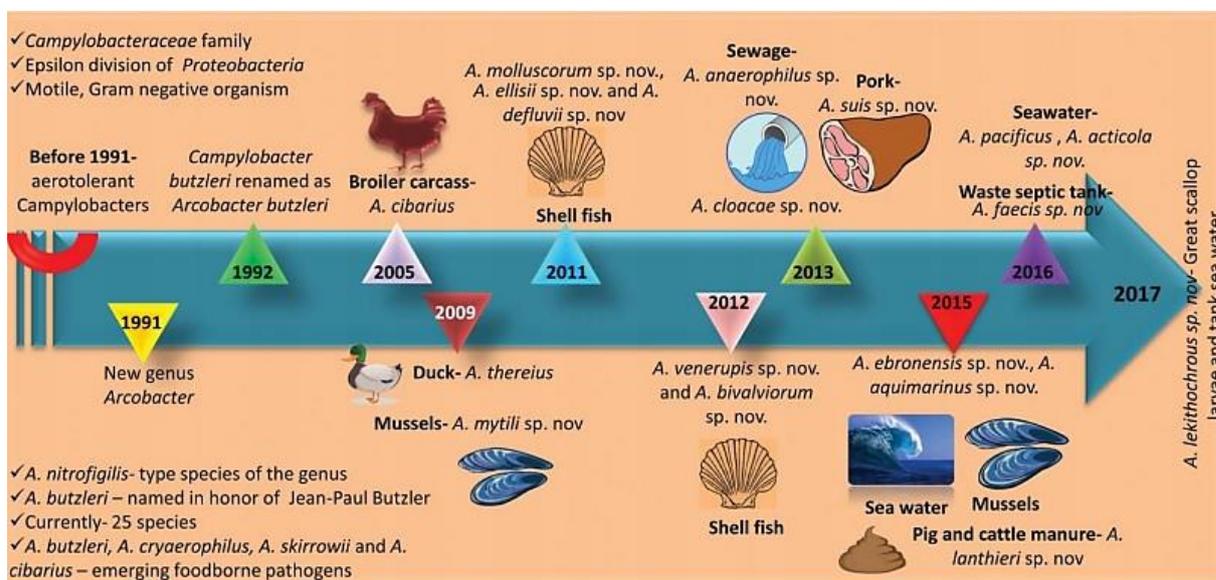


Figura 1. Evolución de *Arcobacter*. Se estableció el género *Arcobacter* en 1991. Nuevas especies fueron incorporadas en la línea del tiempo, reconociéndose actualmente 25 especies. Se describe en la figura algunos de los miembros de *Arcobacter* junto a su fuente de origen y año de aislamiento.

Fuente:(Ramees et al., 2017).

Elaboración: Autor.

Para las especies de *Arcobacter* descritas, se cuenta con similitudes desde 92.1% hasta un 98.9%. Relacionándose más entre si *A. cibarius* y *A. cryaerophilus*, mientras que las menos relacionadas son *A. thereius* y *A. halophilus* (Calvo et al., 2013).

1.3. Género *Arcobacter*

El género *Arcobacter* propuesto por Vandamme et al. (1991) y anteriormente reconocido como “campilobacterias aerotolerantes”, está conformado por bacilos gram negativos de morfología curva, helicoidal o en forma de S itálica en cultivos jóvenes, tomando una forma cocoide en

cultivos de varios días. No forman esporas y poseen un tamaño que varía entre 0.2 a 0.9 μm de ancho por 0.5 a 3 μm de largo (Carrizo, 2007).

Son capaces de sobrevivir y crecer a condiciones de aerobiosis y microaerofilia, en un rango de temperatura entre 15°C a 37°C, diferenciándose del género *Campylobacter* que solo lo hace en microaerofilia (Bayas, 2016).

Vandamme et al. (1992) formalmente transfirió a *Campylobacter butzleri* al género *Arcobacter* como *Arcobacter butzleri* y también identificaron cinco grupos principales utilizando datos de hibridación ADN-ARN, incluyendo así a: *A. cryaerophilus* (dos subgrupos electroforéticos distintos), *A. butzleri* y una nueva especie *A. skirrowii*. La especie *A. butzleri* fue nombrado en honor a Jean-Paul Butzler, un clínico y microbiólogo belga. Los organismos se han identificado a partir de una amplia variedad de hábitats y huéspedes que hace que el género sea atípico dentro de la subdivisión épsilon de las Proteobacterias.

El término *Arcobacter* en latín significa “bacteria en forma de arco”, y está incluido en la familia *Campylobacteriaceae*, junto con el género *Helicobacter*, se forman los “Arcobacters” un grupo filogenéticamente distinto al que se hace referencia como superfamilia de ARNr VI o como la división épsilon de la Proteobacteria (Collado y Figueras, 2011; Vandamme et al., 1991). Estas bacterias son usualmente helicoidales, curvados o en forma de "S" cuando se ve por microscopía de luz convencional.

Poseen movilidad por medio de un solo flagelo polar desenfundado y exhibe un movimiento en sacacorchos vertiginoso, movimiento que les permite pasar los filtros de membrana que suele retener a la mayoría de otras bacterias, por lo que esta característica suele utilizarse para su aislamiento (Banting, et al., 2017).

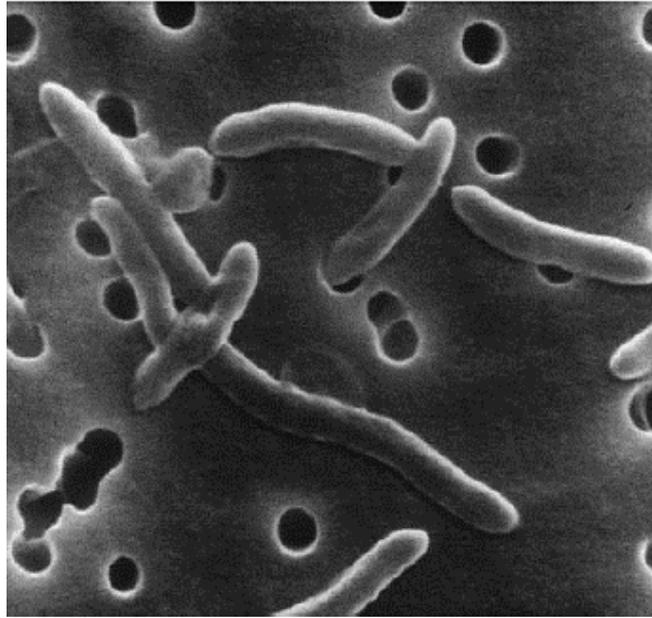


Figura 2. Microscopía electrónica de barrido que muestra morfología de *Arcobacter*.

Fuente: (Snelling, Matsuda, Moore y Dooley, 2006).

Elaboración: Autor.

1.4. Características fisiológicas

Son quimioorganótrofos y utilizan una gran variedad de fuentes de carbono, como ácidos orgánicos y aminoácidos (Bayas, 2016). Bioquímicamente, las especies de *Arcobacter* muestran reacción positiva a oxidasa y catalasa, en algunas ocasiones variable. Presentan reacción negativa con el rojo de metilo y no producen indol. En su mayoría reducen nitratos y no hidrolizan el hipurato, en la prueba de ureasa y producción de ácido sulfhídrico (H₂S) a partir del agar triple hierro y azúcar (TSI) suelen ser negativos (**Tabla 3**). Las colonias de *Arcobacter* comúnmente carecen de pigmentación y se observan incoloras (Bayas, 2016). El contenido de G + C de su ADN es 27.2-28.2% en moles (Vandamme et al., 1991).

Las especies de *Arcobacter* tienen ciertos requerimientos nutritivos y condiciones de cultivo, aunque menos exigentes como lo es el caso de *Campylobacter*. La mayoría de especies de *Arcobacter* muestran una aerotolerancia de al menos 5% de oxígeno y un amplio rango de tolerancia de temperatura, que va de 15°C a 42°C dependiendo de la especie o cepa. Se considera que el crecimiento óptimo de este género suele ser de 15°C a 37°C en condiciones microaeróbicas a 30°C (Banting y Figueras, 2017). Siendo necesario para el aislamiento primario dicha condición microaeróbica (Vandamme et al., 1991), mientras que no se observa crecimiento detectable a 40°C (Vandamme et al., 1992).

Una de las características más importantes es su dependencia del ion sodio. Por lo general, requieren de concentraciones mínimas de sodio que van desde 0.5 al 4 %. Todas las especies

reaccionan positivamente a estas concentraciones, a excepción de *A. halophilus* y *A. marinus* (Bayas, 2016). Recientemente estas dos especies se han recuperado de agua y mariscos utilizando medio líquido de enriquecimiento de *Arcobacter* y medio CAT enriquecido con cloruro de sodio (NaCl) al 2.5% (p/v) seguido de cultivo en agar marino (Banting et al., 2017).

Pueden resistir la congelación hasta 6 meses a 20°C y hasta 24 meses a 70°C, siendo la temperatura de 55°C o más, la que inactivará al microorganismo rápidamente. Las cepas de *Arcobacter* toleran un amplio rango de pH que va de 5.5 a 9.5, sin embargo, el crecimiento óptimo ocurre entre 6.8 – 8.0 (Banting et al., 2017).

De las especies que se han analizado, *A. butzleri* parece ser el menos exigente ya que muestra crecimiento en lactosa, glucosa y citrato con algunas cepas que muestran termotolerancia a 42°C, además de que crece al 1.5% de NaCl y tiene la capacidad de reducir el nitrato (Levican, Collado y Figueras, 2013; Vandamme et al., 1992).

El crecimiento rápido que posee *A. butzleri* en el cultivo de enriquecimiento puede de cierta manera enmascarar la abundancia de otras especies, así como cuando se enriquece para *Campylobacter* o *A. cryaerophilus* (Banting et al., 2016).

A. cryaerophilus no se ha recuperado utilizando medios suplementados con NaCl, indicando que esta especie no tolera el 2.5% del mismo. Por lo que el rango de especies recuperadas del ambiente va a depender de los medios de cultivos y las condiciones de incubación que sean empleadas (Banting et al., 2017).

Tabla 3. Propiedades fenotípicas de especies zoonóticas de *Arcobacter*.

Test	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. skirrowii</i>
Oxidasa	+	+	+
Catalasa	V	V	+
Reducción de nitritos	+	+	+
Ureasa	-	-	-
H ₂ S (TSI)	-	-	-
Hidrólisis de: Hipurato	-	-	-
Indoxilacetato	+	+	+
Crecimiento a: 15°C	+	+	+
25°C	+	+	+
42°C	V	-	-
Crecimiento en: Glicerina al 1%	-	V	-/V
NaCl 5%	V	-	V
Agar MacConkey	V	V	-
Medio mínimo	+	-	-

Susceptibilidad: NA	V	V	S
Cefalotina	R	R	R/S

+, reacción positiva; -, reacción negativa; TSI, agar triple hierro azúcar; NA, ácido nalidixico; V, reacción variable; S, sensible; R, resistente.

Fuente: Fernández et al., (2004).

Elaboración: La autora.

1.5. Principales especies zoonóticas

Arcobacter butzleri

Es un bacilo gramnegativo, no esporulado, de morfología curva que mide entre 0.2 y 0.4 μm de ancho por 1 a 3.0 μm de largo. Entre sus características se destaca la presencia de motilidad característica “en sacacorchos”. Crece a temperaturas óptimas de 25 a 30°C, en medios enriquecidos con sangre formando colonias no pigmentadas, redondas, convexas y de bordes netos, suelen ser traslúcidas o de un ligero tinte blanquecino o grisáceo (Fernández y Jaramillo, 2016).

Su identificación fenotípica suele dificultarse debido a su escasa actividad metabólica y la escases de pruebas que se pueden utilizar, además de que no permiten llegar a resultados precisos y que incluso pueden trascender a datos erróneos (Fernández y Jaramillo, 2016). Por otro lado, se destaca que posee un crecimiento mucho más rápido en contraste con el resto de especies por lo que se podría enmascarar el crecimiento de estas otras (Banting y Figueras, 2017).

En un principio *A. butzleri* fue aislado del tracto intestinal de diferentes animales y muestras humanas. Además se ha asoció a mastitis y abortos de bovinos y porcinos (Kiehlbauch et al., 1991). La infección intestinal causada en el ser humano por esta especie se caracteriza por una diarrea acuosa con dolor abdominal, náuseas y vómitos, siendo ocasional la presentación de fiebre (Calvo et al., 2013).

Por otra parte, tiene potencial para invadir otras partes del organismo, ya que se ha aislado de pacientes con cirrosis hepática, apendicitis gangrenosa aguda y bacteriemia (Fernández y Jaramillo, 2016). Es por ello que esta especie ha ido tomando su importancia como agente de diarrea en humanos, mostrándose como principales rutas de infección el consumo y manipulación de alimentos de origen animal así como la ingesta de agua no tratada (Fernández y Jaramillo, 2016).

Arcobacter cryaerophilus

Aislado a partir de productos alimenticios y muestras clínica de humanos y animales (Collado et al., 2011). Está asociada predominantemente a casos de abortos en animales, sin embargo

también se ha encontrado en pacientes con cáncer, fallo renal e incluso en pacientes con hiperuricemia y alcoholismo (Calvo et al., 2013). Se ha reportado en casos de enteritis y ocasionalmente bacteriemia (Vandenberg et al., 2004).

Existen dos grupos dentro de esta especie: 1A y 1B que se diferencian por distintos polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de los genes 16S y 23S, y, por otro lado, por el contenido total de proteínas celulares y ácidos grasos. Siendo el grupo 1A el que más prevalece.

Arcobacter skirrowii

Ocupa el tercer lugar dentro de las especies de *Arcobacter* relacionadas a humanos, ya que fue aislada por primera vez en un único paciente con diarrea crónica (Calvo et al., 2013). Otras fuentes de las cuales ha sido obtenida han sido a partir de heces de corderos con diarrea, fetos abortados, ovinos y bovinos, y del prepucio de toros (Collado et al., 2011).

Arcobacter thereius

Descubierto en el año 2009, ha sido aislado a partir de hígado y riñón de cerdo con abortos espontáneos y en muestras recogidas de cloacas de patos. Hasta el momento no se ha detectado en muestras de origen humano (Calvo et al., 2013).

1.6. Epidemiología

Lamentablemente los datos epidemiológicos sobre la colonización de *Arcobacter* en humanos son limitados, y generalmente la presencia de estos patógenos parece ser generalmente bajo. No obstante, en la actualidad representa un potencial patógeno de transmisión por agua y vía alimentaria por lo que plantea serios problemas para el sector de salud pública.

Se han reportado casos de la presencia de *Arcobacter* en humanos en varias partes del mundo como Bélgica, Estados Unidos, Dinamarca, Brasil, Australia, Italia, los Países Bajos, Malasia, Japón, España, la República Checa, Corea, Egipto y la India (Ramees et al., 2017). Entre las especies más importantes que se han aislado principalmente de muestras de heces de pacientes con diarrea y en algunos casos de septicemia se encuentran *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* (Karadas et al., 2013).

Desde principios del año 2000 han ido surgiendo informes de la identificación de *Arcobacter* en humanos. En la **tabla 4** se muestran varios estudios de la última década de estos hechos, sin embargo, los métodos no han sido consistentes entre estudios, por lo que se debe tener cautela a la hora de interpretar los resultados (Banting y Figueras, 2017).

Tabla 4. Incidencias notificadas de *Arcobacter* spp detectadas en heces humanas.

Zona	Periodo de estudio	Especies	Matriz	Método	Edad de paciente	Porcentaje positivo (%) / N° de muestras	Referencia
Bélgica	1995-2002	<i>A. butzleri</i> <i>A. cryaerophilus</i>	Presentada para cultivo de heces	Cultivo en agar selectivo, SDS PAGE	0 a 90	0.2% (77/40.995)	Vandenberg et al., 2004
Bélgica	2008-2013	<i>A. butzleri</i> <i>A. cryaerophilus</i> <i>A. thereius</i>	Pacientes sospechosos de gastroenteritis	Cultivo enriquecido, PCR	0 a 99	1.3% (89/6.774)	Van de Abeele et al., 2014
Canadá	2008	<i>A. butzleri</i>	Heces diarreicas (PCR) Heces diarreicas (Cultivo) No diarreicas (PCR)	Cultivo enriquecido, PCR	0 a > 65	57.0% (845/1.482) 0.8% (12/1.482) 45.5% (40/88)	Webb et al., 2016 ^a
Chile	2010-2012	<i>A. butzleri</i>	Heces diarreicas (PCR) Heces diarreicas (Cultivo) No diarreicas	PCR, Enriquecimiento del cultivo, filtración en agar sangre	0 a > 50	1.4% (2/140) 0.7% (2/140) 0.0% (0/116)	Collado et al., 2013
India	2009-2010	<i>A. butzleri</i> <i>A. cryaerophilus</i> <i>A. skirrowii</i>	Heces diarreicas (PCR) Heces diarreicas (Cultivo)	PCR, agar de enriquecimiento o selectivo	0 a 97	4.0% (3/75) 2.7% (2/75)	Patyal et al., 2011
Italia	2005-2009	<i>A. butzleri</i> <i>A. cryaerophilus</i>	Diabético vs no diabético, heces no diarreicas	PCR	47 a 72	46.5% (46/99)	Fera et al., 2010a
Países Bajos	2011	<i>A. butzleri</i>	Pacientes sospechosos de gastroenteritis	qPCR	0 a 97	0.4% (2/493)	de Boer et al., 2013
Nueva Zelanda	2007-2008	<i>A. butzleri</i> <i>A. cryaerophilus</i>	Heces diarreicas	Agar de enriquecimiento selectivo, PCRF, PFGE	2 a 78	0.9% (12/1.380)	Mandisodza et al., 2012
Portugal	2012	<i>A. butzleri</i> <i>A. cryaerophilus</i>	Heces diarreicas	qPCR (FRET)	0 a > 65	1.7% (5/298)	Ferreira et al., 2014
Sudáfrica	1990-2000	<i>A. butzleri</i>	Heces diarreicas pediátricas	Filtración en agar sangre / atmosfera enriquecida con H2	0 a 19	0.1% (16/19.535)	Lastovica y Roux, 2000

Fuente: (Banting y Figueras, 2017).

Elaboración: La autora.

Arcobacter butzleri es del género, la especie más comúnmente implicada en enfermedades humanas, y quienes presentan un mayor riesgo de desarrollar los síntomas asociados a las infecciones provocadas por *Arcobacter* son los niños de corta edad, aunque cualquier grupo de edad puede ser susceptible (Prouzet-Mauléon, et al., 2006). Sin embargo, la identificación del género en niños con diarrea, pero no en niños sin diarrea, indica el probable potencial patogénico sobre esta población. Aun así, se ha observado que *Arcobacter* es menos frecuente que *Campylobacter*, un género que ha sido reconocido como un agente frecuente productor de diarrea en la población pediátrica (Zerpa et al., 2013).

La distribución global del género *Arcobacter* en los humanos es actualmente desconocida debido a la naturaleza emergente de los informes que se han realizado. No obstante, es probable que tenga una distribución más amplia que *Campylobacter* debido a su capacidad de sobrevivir y probablemente de replicarse en el agua (Banting et al., 2017).

Hasta el momento, los casos humanos informados provienen de cuatro continentes, lo que sugiere una amplia distribución. El cultivo de heces humanas de pacientes con diarrea han indicado una prevalencia de *Arcobacter* que varía del 0.1% a 1.25%, mientras que en estudios que detectaron estas bacterias en heces por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) los resultados fueron mucho más elevados, oscilando entre 0.4% y 56.7% (Ferreira et al., 2014; Figueras et al., 2013).

En el lejano Oriente, se identificó *A. butzleri* en 2.4% de muestras de heces diarreicas de niños tailandeses. Los informes europeos son escasos, únicamente se conoce de 10 pacientes pediátricos en Italia con un brote de cólico abdominal recurrente, bacteriemia en un recién nacido en el Reino Unido y dos casos de diarrea grave en Alemania (Prouzet-Mauléon et al., 2006).

Por otra parte, en Bélgica y Francia *A. butzleri* fue el cuarto organismo más recuperado de pacientes con diarrea. De acuerdo a Collado et al. (2007) se ha visto que ha sido encontrado como agente etiológico de la “diarrea del viajero” adquirida por viajeros estadounidenses y europeos que se trasladan a México, Guatemala e India, siendo la primera asociación del género con este tipo de infecciones.

1.7. Vías de transmisión y reservorios de *Arcobacter*

El hábitat de este género es muy diverso, y se ha registrado como reservorios a varias especies animales que incluyen tanto domésticos como salvajes, donde las especies patógenas han sido aisladas de órganos reproductivos, fetos abortados y desde el tracto intestinal de humanos y animales (Carrizo, 2007).

Se denota como principales reservorios al ganado vacuno, porcino, ovino, caprino, gallinas entre otras aves de corral, así también como productos alimenticios y agua contaminada. (Calvo et al., 2013).

El consumo de alimentos o agua contaminada con *Arcobacter* se considera como la vía de transmisión a humanos y animales, a pesar de ello, aún no ha quedado completamente esclarecido. Además, es posible que en la transmisión hídrica tengan participación amebas de vida libre, como *Acanthamoeba castellanii*, con la cual *A. butzleri* puede establecer endosimbiosis sobreviviendo al interior del protozoo al menos por 10 días (Calvo et al., 2013).

Tanto *Arcobacter* como *Campylobacter* se han encontrado de forma común en cadáveres de aves de corral, y el consumo de carne de ave cruda o mal cocida es también posiblemente una fuente importante de transmisión (Banting et al., 2017).

Arcobacter se ha hallado no solo en productos alimenticios crudos, sino también en comidas de restaurantes de gran apogeo en Bangkok, donde además se determinó que existía un riesgo de exposición por comida consumida de un 13%, que podría llegar hasta el 75% en el caso de 10 comidas o más (Banting et al., 2017).

Por otra parte, el contacto directo con heces contaminadas de animales domésticos (gatos, perros) podría ser de igual modo una forma de transmisión de la bacteria a los humanos, ya que recientemente se ha observado el aislamiento del patógeno en muestras de hisopado oral de gatos domésticos (Collado et al., 2011). Este hecho sugiere que la presencia de *Arcobacter* en estas mascotas puede jugar un papel importante en su diseminación en el hábitat doméstico.

Un informe de una escuela primaria de Italia sugirió, además, la posibilidad de la transmisión de *A. butzleri* de persona a persona durante un periodo de aproximadamente tres semanas con 10 casos en total (Vandamme et al., 1992).

En los países en desarrollo donde el saneamiento y la higiene suelen ser deficientes y la interacción con los animales es habitual, la transferencia persona a persona es significativa, principalmente en los niños (Coker, Isokpehi, Thomas, Amisu y Obi, 2002). Muy poco se conoce sobre este tipo de transmisión, aunque se dice que es posible que en este sentido se relacione con la de *Campylobacter* (Banting et al., 2017).

Por otro lado, existen casos que refieren transmisión vertical (de madre a bebé) y horizontal (de animal a animal) de *Arcobacter* entre cerdas y lechones. Se ha demostrado que las cerdas gestantes presentan la presencia de *A. cryaerophilus* en el líquido amniótico, por lo que se transmite a sus lechones recién nacidos (Ho, Lipman, van der Graaf-van Bloois, van Bergen,

y Gaastra, 2006). No obstante, se demostró que las cerdas transportaban asimismo *A. skirrowii* o *A. butzleri* en el recto y en el transcurso de tres semanas los lechones habían descartado *A. cryaerophilus* a favor de *A. skirrowii* y/o *A. butzleri* que supuestamente habrían adquirido vía oral debido a la proximidad de las heces fecales de la madre (Banting y Figueras, 2017).

1.8. Patogenia

A pesar de que el papel del género *Arcobacter* en las enfermedades humanas no se ha esclarecido, se ha visto que las especies *butzleri*, *cryaerophilus*, *skirrowii* y *thereius* se asocian a enfermedades gastrointestinales (Collado et al, 2011). Además, existen informes sobre la existencia de portadores asintomáticos de especies de *Arcobacter*, con lo que persisten ciertos enigmas acerca de su potencial patógeno (Calvo et al., 2013).

Los mecanismos patogénicos de este género no han sido claramente distinguidos, a pesar de la existencia de estudios en los que se analizan su capacidad invasiva, adherencia y citotoxicidad en algunas líneas celulares (CHO, Vero, HeLa) (Carbone et al., 2003; Gugliandolo, Irrera, Lentini y Maugeri, 2008; Ho et al., 2007; Villarruel-López et al., 2003). Estas investigaciones han puesto en manifiesto grandes diferencias de estas capacidades entre las distintas cepas, llegando a la conclusión de que esas diferencias pueden estar dadas de acuerdo a su origen, sea este animal o clínico y, por otra parte, el tipo de célula que se utilice (Bayas, 2016).

Los flagelos bacterianos y subunidades proteicas, también llamadas flagelinas, se encuentran implicados en la motilidad y la quimiotaxis celular y juegan un papel importante en la colonización e invasión de las células del huésped, siendo las flagelinas el objetivo principal del sistema inmunitario (Collado, Jara, Vásquez y Telsaint, 2014). Ho et al., (2007) determinaron las secuencias de los dos genes de flagelina, *flaA* y *flaB*, en cepas de cinco especies de *Arcobacter* y demostraron mediante la construcción de mutantes con mutaciones en cualquier gen *fla* para una cepa de *A. butzleri*, que solo *flaA* es necesario para la motilidad. Además, se observó que los genes de flagelina de *Arcobacter* no están relacionados filogenéticamente con los de *Campylobacter*.

La especie *cryaerophilus* parece tener un comportamiento mucho más invasivo que el resto de especies debido a su capacidad para invadir tejidos intestinales porcinos, así como la placenta con diseminación hacia el feto (Collado et al., 2011). Por otra parte, *butzleri* ha mostrado también la presencia de moléculas de adhesión por su capacidad para aglutinar eritrocitos humanos, de conejo y de oveja, y una hemaglutinina de 20 kDa en ensayos con cepas de esta especie (Bayas, 2016). Esta hemaglutinina consistía en una molécula de tipo

lectina, sensible al tratamiento térmico y proteólisis enzimática, que podía interactuar con un receptor de eritrocitos que contenía D-galactosa (Milesi, 2009).

Collado y Figueras (2011) mencionan que el mecanismo por el cual *butzleri* induce a diarrea ha sido estudiado infectando células epiteliales de colon humano (HT-29/B6), indicando así que el proceso se encuentra mediado por una expresión reducida de las proteínas de unión estrecha de Claudina -1, -5 y -8, lo que generó una disfunción de la barrera epitelial y la apoptosis de esas células, dando como resultado la diarrea (**Figura 3**). La expresión inducida de una citoquina, la interleucina 8 (IL-8), es considerada como un factor de virulencia importante para los géneros *Helicobacter* y *Campylobacter*, siendo también reportada en *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*, y *A. cibarius* (Collado y Figueras, 2011).

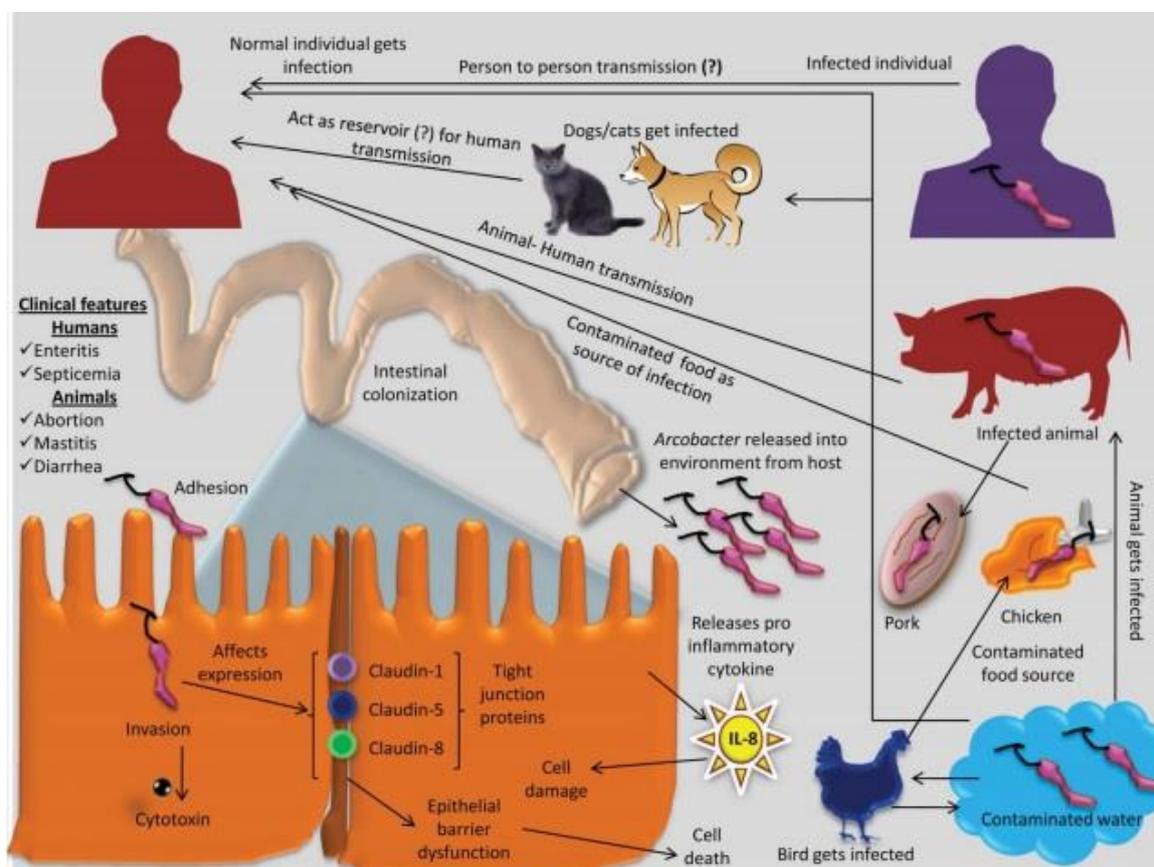


Figura 3. Mecanismos de virulencia descritos para *Arcobacter*. *Arcobacter* luego de su entrada a través del tracto digestivo, coloniza el intestino. Varios mecanismos, como la producción de citotoxinas, afectan la expresión de proteínas de unión, la liberación de citoquinas proinflamatorias y la disfunción de la barrera epitelial que conduce a la muerte celular. El organismo se libera al medio ambiente, donde contamina el agua y las fuentes de alimentos y entra en la cadena alimentaria humana.

Fuente: (Ramees et al., 2017).

Elaboración: Autor.

A pesar del hecho de que todas estas especies de *Arcobacter* probadas muestren la capacidad de inducir la producción de IL-8 por las células humanas caco-2 y células epiteliales porcinas, no se mostró correlación con los niveles de adhesión o invasión celular (Ho et al., 2007).

Un estado necesario para una colonización exitosa por parte de patógenos microbianos se basa en el establecimiento y la capacidad de estos para adherirse a superficies del huésped, tales como membranas mucosas, tejido epitelial o endotelio gástrico e intestinal. En este sentido, es un rasgo común la expresión de factores de adherencia que son los responsables de reconocer y unirse a receptores específicos de las células, permitiendo así a la bacterias resistir las estrategias del huésped que impedirán la colonización (Milesi, 2009).

Debido a que las campilobacteriosis y las enfermedades producidas por *A. butzleri* tienen características clínicas similares, se podría esperar que *Arcobacter* asuma algunos factores de virulencia que presenta *C. jejuni*. En un análisis de secuencia genómica de la cepa LMG 10828T perteneciente a *A. butzleri*, se detectaron homólogos de la proteína de unión a fibronectina CadF y Cj1349, la proteína invasiva CiaB, el factor de virulencia MyiN, fosfolipasa PldA y la hemolisina TlyA. Pero, por otro lado, otros genes asociados a la virulencia de *Campylobacter* no estaban presentes, especialmente los genes que codifican la toxina distal citoquetal (CDT), que produce citotoxicidad en células eucariotas rompiendo ADN bicatenario, este hecho se correlacionaba con estudios de Johnson y Murano que no pudieron detectar genes CDT en especies de *Arcobacter* por PCR (Milesi, 2009).

Un estudio más actual, realizado en 2014 reveló seis genes de virulencia en *Arcobacter* spp: *cadF*, *ciaB*, *cj1349*, *mviNin*, *PldA* y *tlyA*, los cuales estaban presentes en todos los aislamientos de *A. butzleri*. Además, el *cadF*, *ciaB*, *cj1349*, *mviNin*, *PldA* y los genes *tlyA* estaban presentes en 55% y 53%, 98% y 87%, 45% y 60%, 90% y 80%, 33% y 13%, y 38% y 40% de *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii*, respectivamente (Tabatabaei, Shirzad Aski, Shayegh y Khoshbakht, 2014).

Se ha comprobado que varios de estos genes de virulencia son responsables de la adhesión, concretamente *cadF*, *HecA* y *cj1349*, invasión: *ciaB*, lisis de eritrocitos: *HecB*, *tlyA* y *PldA*, adquisición de hierro y mantenimiento de la infección: *IrgA* e *IroE* y biosíntesis de peptidoglicano: *MviN* en otras bacterias (Ruiz, 2008). Sin embargo, se desconoce si estos genes de virulencia muestran acciones similares en *Arcobacter*.

A pesar de que *A. butzleri* se adhiere e invade diversas líneas celulares in vitro, no se ha confirmado correlación entre los genes de virulencia de *A. butzleri* y los fenotipos adhesivos e invasivos (Karadas et al., 2013; Tabatabaei et al., 2014). Del mismo modo, se ha detectado

la presencia de cinco genes de virulencia (*ciaB*, *cadF*, *cj1349*, *IrgA* y *HecA*) de *Arcobacter* aislados de distintos tipos de fuentes como carne, mariscos, aguas residuales, heces de cerdos, ovejas y pollos, fuentes ambientales, efluentes de cerdos, raíces de agua de mar y fetos abortados porcinos (Levican et al, 2013).

Whiteduck-Léveillé et al., (2016) informaron sobre la prevalencia de genes asociados a la virulencia, entre ellos, los genes *ciaB* (90%), *mviN* (70%), *tlyA* (50%) y *PldA* (45%) los cuales fueron significativamente mayores en comparación con *HecA* (16%), *HecB* (10%) y cada uno de los genes *IrgA* y *cj1349* (6%), tanto para *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii*.

La información disponible actualmente basada en estudios moleculares e in vitro ha sugerido que la adhesión, invasión y la producción de toxinas podrían ser los mecanismos por los cuales las especies de *Arcobacter* pueden causar enfermedades. No obstante, mientras que la colonización del intestino y la producción de citotoxinas por las bacterias generalmente se asocia con diarrea sanguinolenta, este síntoma rara vez se describe en los casos humanos reportados hasta la fecha. Es necesario realizar nuevos estudios para explicar la patobiología de las especies del género en cuestión (Milesi, 2009).

1.9. Manifestaciones clínicas

Se ha hablado de tres especies de *Arcobacter* asociadas a cuadros de enteritis humana y ocasionalmente con bacteriemia, tanto en estudios de población como en casos clínicos, entre ellas se encuentra *A. butzleri* y, más raramente *A. skirrowii* y *A. cryaerophilus* (Snelling et al., 2006).

La dosis infectiva y el tiempo de incubación aún son desconocidos (Sagua, 2013). El cuadro clínico de las infecciones por *Arcobacter* puede ser variada. La infección intestinal se presenta principalmente con diarrea acuosa persistente que puede estar acompañada de dolor abdominal, náuseas y vómitos, y en ocasiones puede haber fiebre y escalofríos. Los síntomas perduran típicamente entre 3 y 15 días, pudiendo persistir o volverse a presentar hasta por dos meses e incluso se han reportado septicemias (Fernández y Jaramillo, 2016; Sagua, 2013). La diarrea producida por *Arcobacter* contrasta con la diarrea sanguinolenta asociada a la infección por *Campylobacter jejuni* (Fernández y Jaramillo, 2016).

Las manifestaciones clínicas, también pueden ir desde asintomáticas o diarreas leves, hasta diarreas crónicas y abundantes que este caso requerirían de hospitalización (Calvo et al., 2013). Sin embargo, en un brote por *A. butzleri* en una escuela italiana en el año 1992, el síntoma principal fueron calambres abdominales recurrentes sin presencia de diarrea. (Vandamme et al., 1992).

En general las infecciones referentes a la presencia de *A. butzleri*, especie de mayor frecuencia de aislamiento en humanos, suele mostrar características similares a *Campylobacter jejuni* con una diarrea acuosa, sin embargo la diarrea asociada con *A. butzleri* suele ser más persistente y menos aguda que la que causa *C. jejuni*, además suele asociarse con dolor abdominal que al mismo tiempo incluye la aparición de síntomas como náuseas, vómito y fiebre (Ramees et al., 2017; Vandenberg et al., 2004).

En lo que refiere al resto de especies anteriormente mencionadas, en general las manifestaciones y sintomatología son prácticamente similares a las que produce *A. butzleri*, en donde el síntoma predominante es la diarrea. *Arcobacter skirrowii*, aunque se ha mencionado que es menos común, fue aislado de una muestra de heces humana perteneciente a un hombre de 73 años con una válvula cardiaca aortica protésica, que ingresó al hospital luego de presentar diarrea persistente durante 2 meses (Wybo, Breynaert y Lauwers, 2004). Por su parte, *A. cryaerophilus* se ha aislado en un único caso en Australia a partir de un adulto con diarrea intermitente que presentaba además dolor abdominal (Ramees et al., 2017).

1.10. Identificación y caracterización clínica de *Arcobacter*

El aislamiento e identificación de *Arcobacter* spp en animales y humanos ha mostrado cierta dificultad. Y aunque las infecciones intestinales por este género en seres humanos se han reportado desde el año 1987 (Fernández et al., 2004), no existe una metodología estandarizada que permita el diagnóstico clínico y aislamiento del género, además de que los medios ensayados para su aislamiento no se aplican en la cotidianidad para su detección en laboratorios clínicos (Calvo et al., 2013).

Si bien en cuanto a morfología y características fenotípicas *Arcobacter* es muy similar a *Campylobacter*, los medios selectivos y condiciones de crecimiento son muy diferentes. Entre ellos la principal diferencia como ya se ha mencionado es la temperatura, que puede también utilizarse para distinguir entre ambas especies (Bayas, 2016).

En un principio, *Arcobacter* fue aislado mediante el uso de medio de enriquecimiento semisólido para *Leptospira*, EMJH P-80 suplementado con 5-fluoracilo (100 µg/ml) (Son, 2005).

En 1999, se diseñaron placas de medio que consistían en peptona especial, 2.5% de sangre de oveja, 0.05% de piruvato, 0.05% de tioglicolato y 0.032 mg/L de cefoperazona para el aislamiento de *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y *A. nitrofigilis*. Esta mezcla tuvo una eficacia

significativa en cuanto a índice de crecimiento absoluto, tamaño de las colonias y valores de diferenciación de las colonias a la obtenida en otras formulaciones (Son, 2005).

Houf et al., (2001) también describieron un nuevo caldo y medio selectivo para el aislamiento de las especies de *Arcobacter*, el cual incluía anfotericina B, cefoperazona, 5-fluoracilo, novobiocina y trimetropin como suplementos de selección para el género que también permitió su crecimiento.

En cuanto a diferenciación de especies, algunas son difíciles de identificar debido a que sus requerimientos de crecimiento suelen ser más exigentes (Son, 2005). La identificación de *Arcobacter* a nivel de la especie basándonos en sus características bioquímicas es complicado ya que muestran una escasa actividad metabólica (Milesi, 2009).

Sin embargo, entre las pruebas bioquímicas más confiables para la identificación de *A. butzleri* se puede incluir el crecimiento en 1% de glicina y en 1.5% de NaCl, posee una actividad catalasa débil y resistencia al cloruro de cadmio (Son, 2005). Las cepas de *A. cryaerophilus* muestran una fuerte actividad catalasa y son sensible al cloruro de cadmio (Son, 2005).

A nivel de crecimiento en medio de cultivo sólido las colonias de *A. butzleri* y *A. cryaerophilus* cultivadas durante 48 h en condiciones óptimas son de 2-4 mm y 1-3 mm de diámetro para cada uno de los casos y son convexas con un borde completo. El crecimiento de *A. butzleri* tiene un aspecto blanquecino, mientras que en el caso de *A. cryaerophilus* tienen principalmente un pigmento amarillo sucio. Las colonias de *A. skirrowii* cultivadas durante 48 h en condiciones óptimas presentan un diámetro que va de 1 a 3 mm y tienen una forma plana irregular, su crecimiento tiene una apariencia grisácea y generalmente no es profuso (Son, 2005).

A diferencia de otros microorganismos tales como *Salmonella*, *Campylobacter* y *Listeria*, la serología no se usa para la identificación de *Arcobacter* debido a que los intentos por realizar la identificación del género o la especie mediante aglutinación específica de anticuerpos no tuvieron éxito (Milesi, 2009). Es por esta razón y debido a la alta heterogeneidad antigénica de las especies que la identificación serológica no se pudo ampliar más y no es utilizada hasta la fecha.

En la actualidad, existe el consenso que para aislar *A. butzleri* se requiere en primer lugar su enriquecimiento en un periodo de 24 a 48h en un caldo que contenga antimicrobianos y sangre ya que son de vital importancia para que se pueda aislar a la bacteria en muestras de heces, agua y alimentos, ya que su presencia raramente ocurre como bacteria dominante. La incubación puede realizarse entre 25°C a 30°C y puede hacerse tanto en aerobiosis como en microaerofilia (Fernández y Jaramillo, 2016).

Para su aislamiento se suele utilizar, como en el caso de *Campylobacter*, el método de filtración por membrana que utiliza filtros de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0.45 μm , con la diferencia de que se incuban en placas con medio selectivo en una temperatura de 37°C en medio de aerobiosis.

Cabe señalar que el enriquecimiento del cultivo con antibióticos selectivos puede dar lugar a un sesgo significativo y una subestimación de *Arcobacter* spp. aparte de *A. butzleri*. Esto se debe al hecho de que los antibióticos utilizados en el enriquecimiento de cultivos seleccionan cepas resistentes a los antibióticos, a la vez que evitan la recuperación de cepas sensibles a los antibióticos que pueden ser motivo de preocupación para la salud humana (Banting y Figueras, 2017).

1.10.1. Identificación molecular

Las dificultades para encontrar un medio apropiado, requerimientos gaseosos, el tiempo de incubación y la pérdida de cultivos debido a las condiciones de estrés, se encuentran entre las principales limitaciones que conlleva la identificación convencional de la bacteria, además de que estos métodos pueden originar identificaciones erróneas debido a la escasez de pruebas claras que permitan distinguir entre las especies (Bayas, 2016; Milesi, 2009). Es por ello que estos inconvenientes sugieren el uso de métodos moleculares basados en el ADN para la identificación de *Arcobacter* a nivel de género y especie.

El estudio basado en el análisis de ácidos nucleicos, como lo es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de las técnicas mayormente utilizadas para la detección e identificación de microorganismos, gracias a su precisión, discriminación, reproducibilidad y rapidez (Engberg, On, Harrington y Gerner-Smidt, 2000).

Se informó el uso de la técnica de microarrays y PCR de transferencia de energía, resonancia y fluorescencia en tiempo real para la detección e identificación de *Arcobacter* spp, pero aún no se aplican de forma rutinaria (Milesi, 2009).

La idoneidad de la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) como técnicas de caracterización descritas por Liar y Wang confirmaron el aislamiento del género a partir de heces o carne (Milesi, 2009). La técnica de Polimorfismo de Longitud de Fragmento Amplificado (AFLP) mostró cualidades eficaces como método de genotipado para los miembros de la familia *Campylobacteraceae*. De esta manera se obtuvieron buenos grupos de distinción para *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii*, con perfiles que reproducen la relación clonal de los aislamientos dentro de cada especie (Milesi, 2009). A pesar de la eficacia de este método, se trata de una técnica exigente que además requiere de una gran base de referencia.

Sin embargo, los métodos basados en PCR son más rápidos, y poseen una especificidad mucho mayor que la identificación convencional y superan las complicaciones de la identificación bioquímica. La técnica de PCR múltiple desarrollada por Houf, et al., (2001) , el cual consiste en una PCR múltiple del gen 16S ARNr de las especies *A. butzleri* y *A. skirrowii* y del gen 23S ARNr de la especie *A. cryaerophilus*. No obstante, el método tiene un defecto, este no permite distinguir entre *A. skirrowii*, *A. nitrofigilis* y *A. mytili* (Figueras et al., 2011) y entre las especies *A. thereius*, *A. defluvii*, *A. molluscorum* y *A. cryaerophilus* (Collado et al., 2009; Doudah et al., 2010).

Doudah et al., (2010) tomaron en cuenta las limitaciones que la PCR múltiple propuesta por Houf et al., (2001) y propusieron una nueva metodología, dirigida a los genes 23S ARNr y *gyrasaA*, idóneo para la identificación de las 5 especies que se encuentran ligadas a los seres humanos y otros mamíferos: *A. butzleri*, *A. skirrowii*, *A. cryaerophilus*, *A. cibarius* y *A. thereius*. En la actualidad este es el método mayormente utilizado para la identificación de especies de *Arcobacter*.

1.10.2. Otros métodos moleculares utilizados para la identificación de especies de *Arcobacter*

Existen además otros métodos que se pueden utilizar para la identificación de las especies de *Arcobacter*, en los que la mayoría permiten detectar principalmente *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii*; entre ellos podemos mencionar: qPCR, RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción), PCR-DGGE (Reacción en Cadena de la Polimerasa-Electroforesis en Gel con Gradientes de Desnaturalización), así como MALDI-TOF MS (Espectrometría de Masas mediante Desorción de Matriz Asistida por Láser/Ionización-TOF) (Bayas, 2016).

PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR)

Es una técnica derivada de la PCR convencional que permite amplificar y detectar al mismo tiempo los fragmentos amplificados en un mismo proceso, sin la necesidad de realizar electroforesis o espectrofotometría. Con esto, se disminuye la sobre manipulación de las muestras y el consigo el riesgo de contaminaciones y el tiempo de reacción (Martínez, Pedraza, Ortuño y Rojas, 2017).

El método de qPCR múltiple permite detectar *A. butzleri* y bacterias del género *Campylobacter* a partir de heces diarreicas. Los genes utilizados son *hsp60*, para *A. butzleri*, y el gen 16S ARNr para *Campylobacter* spp. Se determinó que la sensibilidad de esta técnica para la detección de *A. butzleri* era de 103 UFC g de heces, similar a la descrita para la PCR múltiple de Houf en el año 2000 (Bayas, 2016).

Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

La técnica PCR-RFLP es rápida y sencilla basada en el análisis de los polimorfismos del gen 16S ARNr (Bayas, 2016). Este método utiliza enzimas de restricción, nucleasas o endonucleasas de restricción, estas reconocen secuencias de bases específicas de DNA, cortando en lugares concretos que contienen las secuencias reconocidas. La cantidad de fragmentos obtenidos dependerá de la frecuencia de corte de dicha enzima (Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, 2010). Los fragmentos de restricción producidos durante la fragmentación de DNA se analizan mediante electroforesis (Cheriyedath, 2016).

Se diseñó un método basado en esta técnica dirigida al gen 16S ARNr con la endonucleasa *MseI* que permitía además de la identificación de *A. butzleri*, *A. skirrowii* y *A. cryaerophilus*, otras tres nuevas especies *A. cibarius*, *A. nitrofigilis* y *A. halophilus* (Figueras, Collado y Guarro, 2008).

La implementación más tarde de dos enzimas de restricción adicionales, *Mnli* y *Bfal*, permitieron la identificación de más especies, llegando a la diferenciación de las 17 especies reconocidas hasta el año 2012 (Figueras, Levican, y Collado, 2012).

Electroforesis en gel desnaturizante en gradiente (DGGE)

Es una técnica que permite discriminar dos cadenas dobles de DNA con el mismo tamaño, pero con diferencias en secuencia si la energía necesaria para llegar a su desnaturalización es diferente. Es decir, hace posible definir aproximadamente la cantidad de fragmentos de DNA del mismo tamaño pero que tienen secuencias diferentes en contenido de guanina-citocina (Nuñez, 2013).

Su utilidad en la diferenciación radica en que esta situación donde hay mezclas de varios fragmentos de DNA con estas características es muy común cuando se amplifican fragmentos de genes utilizando la técnica de PCR (Nuñez, 2013).

Espectrometría de Masas mediante Desorción de Matriz Asistida por Láser/Ionización (MALDI-TOF)

Este método en la actualidad se ha convertido en un recurso para la identificación de microorganismos en el campo de la microbiología clínica, ya que permite la identificación de estos mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosomales, a partir de colonias (Zárate, Romano, Nievas y Smayevsky, 2014). El proceso es rápido, sensible y económico en términos de mano de obra y costos involucrados (Singhal, Kumar, Kanaujia y Virdi, 2015). Este análisis conduce a la creación de un espectro de masas que es específico para cada especie (Zárate et al., 2014).

1.11. Tratamiento

La mayoría de los casos de enteritis causada por *Arcobacter* suelen ser autolimitadas y habitualmente no se requiere de un tratamiento con antibióticos, no obstante, en casos severos o en los que el cuadro se prolongue se puede justificar el uso de antibioticoterapia (Calvo et al., 2013).

Se ha propuesto el tratamiento tanto en animales como en humanos el uso de fluoroquinolonas y tetraciclina, ya que presentan una buena actividad contra las cepas de *Arcobacter* (Calvo et al., 2013). Pero, por otro lado, distintos estudios han indicado que el género *Arcobacter* podría ser susceptible también a aminoglucósidos, incluyendo kanamicina y estreptomina (Snelling et al., 2006).

1.11.1. Resistencia a antimicrobianos

Los informes disponibles en la actualidad sugieren un aumento en la resistencia antimicrobiana por parte del género *Arcobacter* conduciendo a problemas y fallas en el tratamiento con antibióticos de uso común (Ramees et al., 2017).

Se menciona que *A. butzleri* presenta mayor resistencia en comparación con *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* (Houf et al., 2001). Otros estudios informaron que todas las cepas de *Arcobacter* analizadas fueron susceptibles a ampicilina, aminoglucósidos y tetraciclina (Kabeya et al., 2004; Kayman et al., 2012).

A. butzleri es resistente a ampicilina en un 56%, seguido de cefotaxima y ciprofloxacino con un 33% y sensible a enrofloxacin y gentamicina, fármacos de elección para el tratamiento de infecciones causadas por *Arcobacter* (Shah et al., 2013). Por otra parte, otro estudio menciona que *A. skirrowii* y *A. cryaerophilus* se encontró susceptible a amoxicilina + ácido clavulánico y resistente a optoquina, vancomicina, ácido fusídico, cloxacilina y cefazolina, además de susceptibilidad moderada ante amikacina, enrofloxacin, ofloxacin, oxitetraciclina, cloranfenicol, nitrofurantoína, eritromicina, ampicilina, sulbactam y amoxicilina (Ünver, Atabay, Şahin y Çelebi, 2013).

Existe un patrón de resistencia contra antibióticos como cefalotina, novobiocina y vancomicina, mientras que en la mayoría de los casos se ha encontrado sensibilidad hacia la azitromicina, ácido nalidixico y gentamicina (Mohan et al., 2014).

La actividad antimicrobiana medida a través de la técnica de difusión en disco a 71 cepas aisladas de *Arcobacter* demostró que eran resistentes a uno o más agentes antimicrobianos, donde el resultado más común fue la resistencia a cefalotina y vancomicina en un 96% de los casos, seguido de resistencia a meticilina, azitromicina y ampicilina. También se observó susceptibilidad a gentamicina, estreptomina, tetraciclina y kanamicina (Rahimi, 2014).

Por otro lado, la presencia de resistencia adquirida a la eritromicina y el ciprofloxacino encontrada en aves de corral es un motivo de preocupación, ya que estos son lo que usualmente se prescriben como tratamiento en infecciones humanas por miembros de la familia *Campylobacteriaceae*; y aunque aún no se ha aclarado este tema para el caso del género *Arcobacter* es importante tomar en cuenta estudios de susceptibilidad antes del establecimiento del tratamiento (Banting y Figueras, 2017).

CAPÍTULO II
METODOLOGÍA

2.1. Recolección de muestras

Durante el periodo marzo-junio del año 2017, se recolectaron 100 muestras de heces entre diarreicas y no diarreicas de población infantil de 0 a 12 años en diferentes centros de salud, tanto públicos como privados de la ciudad de Loja: Centro de Salud N°1, Centro de Salud N°3, Centro de Salud N°4, Laboratorio clínico “Analizar”, Laboratorio de Patología Clínica “Inmunolab” y Laboratorio clínico de la Cooperativa CACEL.

Las muestras fueron transportadas y analizadas dentro del laboratorio de Microbiología de la sección de Genética Humana, Microbiología y Bioquímica Clínica de la Universidad Técnica Particular de Loja.

2.2. Procesamiento de muestras

Antes de la inoculación se realizó un análisis macroscópico de las mismas, tomando en cuenta características tales como consistencia y color. Por otro lado, se registró la edad de los pacientes a las que pertenecía cada muestra, excluyendo muestras que no pertenezcan al rango de edad establecido.

2.2.1. Inoculación e incubación

Una vez realizado el análisis macroscópico de las muestras, se tomó con ayuda de un hisopo estéril aproximadamente 1g de muestra y se inoculó en caldo de enriquecimiento suplementado con mezcla antibiótico Houf et al., (2001) modificada, enriquecida con extracto de levadura y sangre al 5% (**anexo 1**), posteriormente se incubó durante 72h a una temperatura de 30°C.

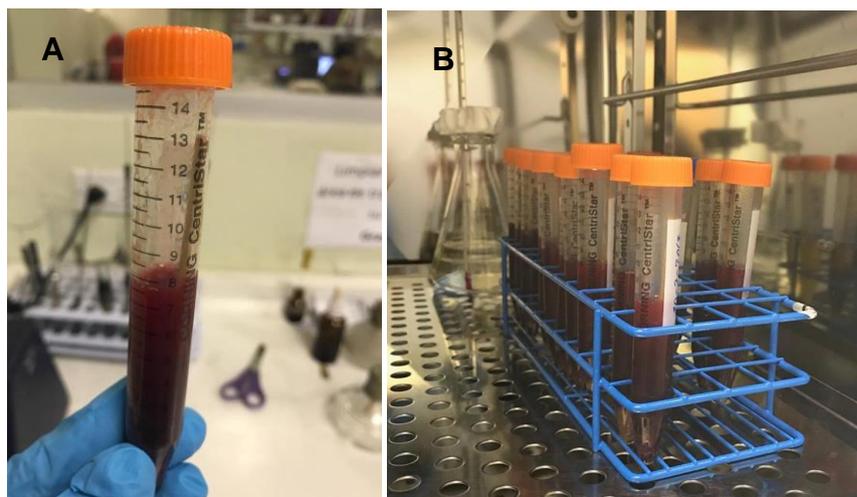


Figura 4. A. Inoculación de muestras fecales; B. Incubación a 30°C.

Fuente: La autora.

Elaboración: Autora.

2.3. Identificación fenotípica de *Arcobacter*

2.3.1. Aislamiento mediante técnica de filtración en membrana

Pasado el tiempo de incubación, se procedió a filtrar las muestras para lo cual se utilizó membranas de triacetato de celulosa con un poro de 47 mm de diámetro (0.45 μm) sobre medio de agar sangre enriquecido con extracto de levadura (**anexo 2**). Para esto se tomó aproximadamente 200 μL de caldo, y homogenizando suavemente por pipeteo se colocó sobre las membranas, procurando no salir del área del filtro y evitando salpicaduras en el resto del medio. Se dejó actuar por aproximadamente 90 min y se llevó a incubación por 72 h a 30°C.

2.3.2. Identificación morfológica

Se consideraron como colonias presuntivas aquellas que pasaron el filtro y que presentaron características típicas del género: colonias no pigmentadas, redondas, convexas y de bordes netos, traslúcidas o de un ligero tono blanquecino o grisáceo (**Figura 5**). Posterior, se tomó una asada de las colonias para su análisis microscópico a través de tinción Gram modificada y tinción de Hucker (**anexo 3**), considerando como presuntivos *Arcobacter* aquellas bacterias de tipo bacilo curvada, gram negativos con la tinción de Gram (**Figura 6A**) y de coloración morada y de aspecto más grueso con la tinción de Hucker (**Figura 6B**).



Figura 5. Crecimiento de colonias de *Arcobacter* spp en agar sangre.

Fuente: La autora.

Elaboración: Autora.

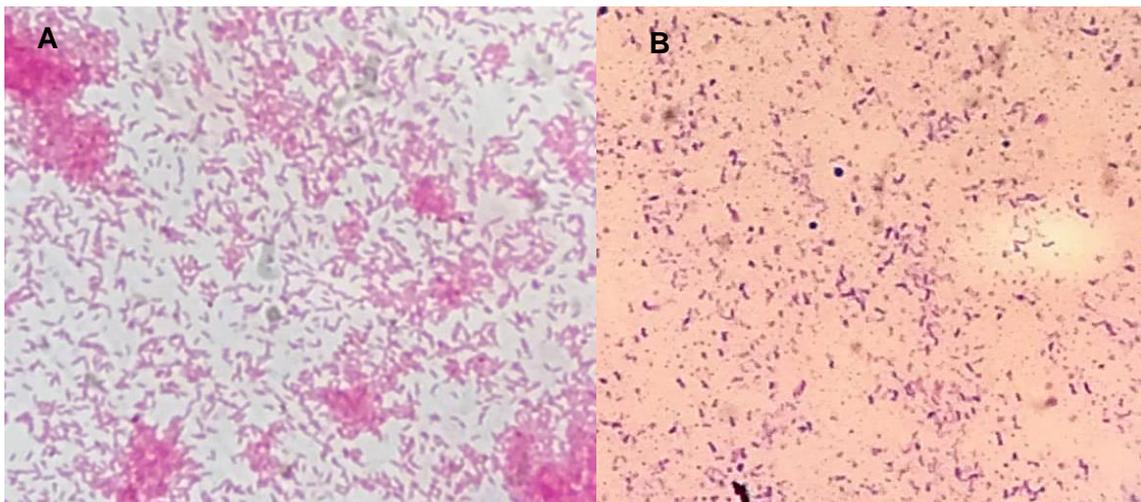


Figura 6. A. Morfología de *Arcobacter* en tinción de Gram; B. Morfología de *Arcobacter* en tinción de Hucker.

Fuente: La autora.

Elaboración: Autora.

2.3.3. Identificación mediante pruebas bioquímicas

A las colonias presuntivas de *Arcobacter* se les realizó pruebas de catalasa y oxidasa, siendo ambas positivas para el género. Por otra parte, se empleó como prueba el crecimiento de las cepas en agar MacConkey para la identificación presuntiva de *Arcobacter butzleri*, siendo esta la única capaz de crecer en este medio de cultivo (**anexo 4**).

2.4. Criopreservación de cepas presuntivas de *Arcobacter*

Con el fin de conservar las cepas presuntivamente positivas, se procedió a sembrar en caldo de tioglicolato. Para esto se tomó una asada considerable de colonias y se inoculó con ayuda de un asa estéril. Se incubó por 48h a 30°C. Luego de este tiempo se tomaron 900 µL de caldo de tioglicolato (**anexo 5**) y se colocaron en tubos eppendorf a los que seguidamente se le añadió 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Se preservaron a -80° C en glicerol y DMSO (**anexo 6**).

2.5. Identificación molecular de *Arcobacter*

2.5.1. Extracción de ADN

Las cepas presuntivas se descongelaron y se sembraron en agar sangre enriquecido con extracto de levadura, incubándose a 30° C por 48h. Se realizó la extracción de ADN genómico de las cepas puras y de los controles positivos con el uso del kit de purificación de ADN Genómico Wizard® (Promega) (**anexo 7**).

2.5.2. PCR Múltiple

La identificación molecular de las especies se realizó a través de PCR siguiendo la metodología descrita (**anexo 8**) por Doudiah et al., (2010). Se utilizó un volumen final de reacción de 25 µL. Tomando 5 µL de DNA, 5x Green GoTaq Buffer, 5 mM dNTP's, 25 mM MgCl₂, 5U/ µL GoTaq Flexi ADN Polimerasa (Promega). La identificación de las especies se llevó a cabo por medio de la amplificación de fragmentos del gen 23S rRNA, para ello se utilizaron los siguientes primers o cebadores en una concentración 5 µM (Invitrogen™): *ArcoF* (5'-GCYAGAGGAAGAGAAATCAA-3'); *ButR* (5'-TCCTGATACAAGATAATTGTACG-3'), para la identificación de *A. butzleri*; *TheR* (5'-GCAACCTCTTTGGCTTACGAA-3'), para *A. thereius*; *CibR* (5'-CGAACAGGATTCTCACCTGT-3'), para la identificación de *A. cibarius*; *SkiR* (5'-TCAGGATACCATTAAGTTATTGATG-3'), para la identificación de *A. skirrowii*; *GyrasF* (5'-AGAACATCACTAAATGAGTTCTCT-3') y *GyrasR* (5'-CCAACAATATTTCCAGTYTTTGGT-3') para la identificación de *A. cryaerophilus* (**Tabla 5**).

Tabla 5. Especies del género *Arcobacter* con sus respectivos cebadores.

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

Fuente: Doudiah et al., (2010).

Elaboración: La autora.

La amplificación de los genes se llevó a cabo por medio de Touch Down (**anexo 9**), disminuyendo 0.5°C cada 2 ciclos (**Tabla 6**). Los amplicones generados se detectaron mediante un gel de agarosa ultrapura (Invitrogen) al 2%, en condiciones de 90V, 30 minutos, 300 m; tomándose como referencia un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega). La visualización de las bandas se realizó en un transiluminador UV Enduro™ GDSTOUCH Labnet.

Se utilizaron como controles positivos cepas pertenecientes a la colección alemana la cual certifica que pertenecen al género *Arcobacter* y a cada una de las especies analizadas: *A. butzleri* LMG 10828 (C1), *A. skirrowii* LMG 6621 (C2), *A. cryaerophilus* LMG 9904 (C3).

Tabla 6. Condiciones utilizadas en PCR múltiple.

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: Doudah, et al., (2010) .

Elaboración: La autora.

2.6. Actividad antimicrobiana

2.6.1. Técnica de difusión en disco

Para determinar la actividad antimicrobiana de las cepas puras identificadas como *Arcobacter*, se utilizó el método de difusión en disco en agar Müller Hinton enriquecido con extracto de levadura y sangre al 5% (**anexo 10**). Dentro de esta prueba se probaron 6 antibióticos: Ciprofloxacino (CIP-5 µg), Eritromicina (E-15 µg), Gentamicina (GM-10 µg), Ampicilina (AMP-10µg), Ácido nalidíxico (NA-30 µg), Tetraciclina (TE-30 µg). Los resultados obtenidos se interpretaron tomando en cuenta las recomendaciones del Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad según el SFM & EUCAST (2017) tomando en cuenta los puntos de corte establecidos para *Campylobacter* spp y enterobacterias (**Tabla 7**), debido a que hasta la fecha no se han estandarizado puntos de corte para la evaluación de la susceptibilidad de especies del género *Arcobacter*.

Tabla 7. Concentración de antibióticos y puntos de corte utilizados para la determinación de susceptibilidad antimicrobiana según el SFM & EUCAST (2017).

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

Fuente: (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2017; SFM & EUCAST, 2017).

Elaboración: La autora.

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Frecuencia de aislamiento.

En la presente investigación se realizó el análisis de 100 muestras de heces entre diarreicas y no diarreicas pertenecientes a niños de 0 a 12 años de edad, provenientes de la ciudad de Loja, de las cuales se encontró que el 8% (8/100) correspondían a *Arcobacter* spp como se muestra a continuación en la tabla 8.

Tabla 8. Frecuencia de aislamiento de *Arcobacter* spp.

Resultado:	Número	%
Positivas	8	8
Negativas	92	92
TOTAL	100	100

Elaboración: La autora.

El rol de las especies de *Arcobacter* como causantes de patología en los humanos no se ha establecido completamente, y únicamente 3 especies, *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii*, han sido asociadas con padecimientos gastrointestinales, en donde la diarrea ha sido el principal síntoma reportado (Calvo, *et al.*, 2013).

La mayoría de casos de infecciones producidas por este género obtenidos hasta la fecha, utilizando métodos convencionales de cultivo, muestran porcentajes bajos mientras que estudios que implican métodos moleculares han dado lugar a porcentajes más elevados.

El 8% de aislamiento de *Arcobacter* spp obtenido mediante método de cultivo convencional es mayor a los porcentajes obtenidos por África, Tailandia e India a partir de heces diarreicas en niños, los cuales representan un 0.1%, 2.4% y 2.7%, respectivamente (Prouzet-Mauléon *et al.*, 2006). Por otra parte, en Bélgica se ha hablado de prevalencias aún más bajas a la conseguida, siendo del 0.14% las correspondientes a muestras diarreicas y 0.06% de muestras no diarreicas (Vandenberg *et al.*, 2004).

En Nueva Zelanda la prevalencia de *Arcobacter* spp, estudiada en muestras diarreicas, fue del 0.9% el cual representa un valor menor si se compara con el obtenido, asimismo como es el caso de Canadá que reporta el 0.8% de aislamiento (Banting *et al.*, 2017).

En lo que respecta América Latina son escasos los informes de aislamiento de *Arcobacter* en humanos, y los que se han informado de igual manera representan porcentajes bajos en comparación al reportado en esta investigación. Por una parte, Perú ha revelado una prevalencia del 2% en población pediátrica (Zerpa *et al.*, 2013), mientras que Chile muestra un aislamiento de 2.9% (Jara, 2006). En Ecuador no se han realizado más estudios que nos permitan comparar el porcentaje obtenido frente a aislamientos de *Arcobacter* en humanos y

mucho menos en animales. Además, al presente no han sido informados más aislamientos de esta bacteria en humanos con diarrea o sin diarrea en otros países de América Latina.

Hasta el momento, los casos humanos informados provienen de los cuatro continentes, sugiriendo así una amplia distribución del género. En general, el cultivo de heces humanas de pacientes con diarrea ha indicado una prevalencia de *Arcobacter* spp que varía del 0.1% a 1.25% (Ferreira et al., 2014), esto significa que el valor obtenido en nuestra ciudad, además de superar estas cifras, representa uno de los resultados más elevados a nivel de América Latina y el mundo.

Sin embargo, estudios que detectaron estas bacterias en heces por PCR muestran resultados que oscilan entre 0.4% y 56.7% (Ferreira et al., 2014). En este sentido, se han obtenido prevalencias de 1.2% en Francia y de un 12.9% en Sudáfrica (Bayas, 2016), siendo este último similar al alcanzado en esta investigación.

En este sentido, y de acuerdo a resultados que se han registrado en otros estudios en distintos lugares del mundo, se podría decir que el género *Arcobacter* tiende a ser más común en niños con diarrea, pero también puede encontrarse en niños sin diarrea. En el caso de esta investigación, el 8% correspondió a niños de edad escolar con heces no diarreicas, lo que podría sugerir la existencia de portadores asintomáticos de la bacteria en nuestra ciudad. De hecho existen estudios que confirman esta hipótesis, donde se mencionan también reportes de la presencia de portadores asintomáticos de especies de *Arcobacter*, con lo cual se dudaría acerca de su potencial patogénico en los seres humanos (Houf y Stephan, 2007; Samie, Obi, Barrett, Powell y Guerrant, 2007).

Aunque aún no se conoce a ciencia cierta los mecanismos de patogenicidad que posee esta bacteria, estos podrían estar relacionados con la edad y sobre todo, el estado inmunológico de la persona (Bayas, 2016). En este sentido, sería muy obvia la razón por la que se presenta más comúnmente en niños que en adultos, ya que su sistema inmunológico se encuentra menos preparado y, por lo tanto, más propenso al desarrollo de la infección que una persona adulta, y estos se estima que son factores predisponentes, los cuales facilitan la infección por parte de *Arcobacter* y otros microorganismos parecidos.

3.2. Identificación molecular de especies.

Del 8% de muestras aisladas como *Arcobacter* spp, el análisis molecular arrojó que el 100% (8/8) correspondían a *Arcobacter butzleri*. En la figura 7, podemos observar las bandas de las muestras a nivel del control número uno (C1) correspondiente a *A. butzleri* LMG 10828.

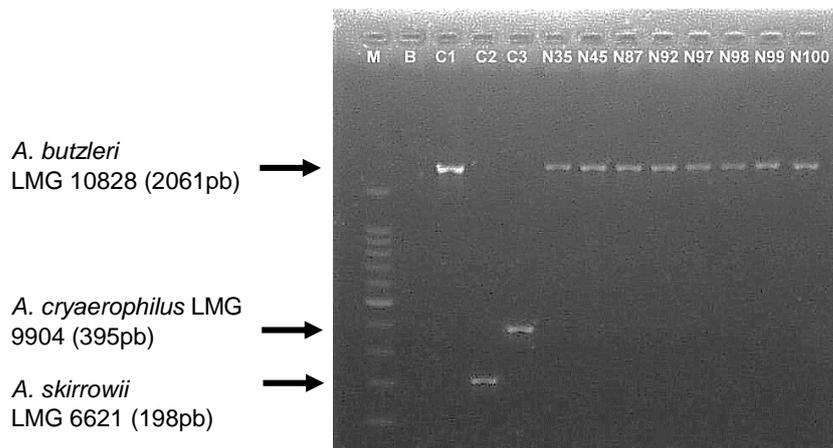


Figura 7. Revelación de gel de agarosa. Se utilizó como controles cepas de la colección alemana: C1: *A. butzleri* LMG10828; C2: *A. skirrowii* LMG6621; C3: *A. cryaerophilus* LMG9904. Se trabajó con un marcador (M) de 100 pb y un blanco (B).

Fuente: La autora.

Elaboración: Autora.

Como es el caso del presente trabajo, algo que es común y se asemeja a otros estudios en humanos, es que *A. butzleri* presenta la mayor prevalencia de aislamiento, seguido por *A. cryaerophilus* y menos frecuentemente se encuentra *A. skirrowii* (Collado, Jara, Vásquez y Telsaint, 2014; Samie, et al., 2007). En esta investigación, *A. butzleri* fue la única especie de *Arcobacter* identificada.

Un estudio realizado por Ferreira et al., (2014) en Portugal, donde se realizó el diagnóstico molecular de *Arcobacter* y *Campylobacter* en muestras diarreicas, mostró una frecuencia de aislamiento de 33.2% para ambos géneros, de las cuales el 1.3% correspondieron a *A. butzleri* que fue detectado de un hombre de 69 años y 3 niños con edad entre 2 y 5 años. Además de *A. butzleri*, la muestra de un niño de 2 años también fue positiva para 2 especies de *Campylobacter* spp., *C. jejuni* y *C. concisus*. Y también, encontraron *A. cryaerophilus* en la muestra de este mismo niño. En total, el estudio representó un aislamiento de *Arcobacter* del 2.2% en población pediátrica y 0.9% de prevalencia en la población adulta.

A pesar de que en el presente trabajo no se analizaron muestras de adultos que nos permitan diferenciar la presencia de la bacteria en esta población con relación a los niños, el porcentaje encontrado es significativo a diferencia del reportado por Ferreira et al. (2014), en el cual de las especies existentes de *Arcobacter*, *A. butzleri* fue la que se encontró principalmente, y únicamente un niño presentó *A. cryaerophilus*.

Otra investigación realizada por Samie et al., (2007) sobre la prevalencia de *Campylobacter*, *Helicobacter* y *Arcobacter*, en su análisis molecular a 322 muestras de heces de pacientes con y sin VIH en Sudáfrica, hallaron que la especie *butzleri* era la tercera especie más

frecuente con un 6.2% de prevalencia, después de *Helicobacter pylori* y *Campylobacter jejuni* con un 50.6% y 10.2%, respectivamente.

Por otra parte, estudios similares realizados en Bélgica y Francia (Prouzet-Mauléon, *et al.*, 2006; Vandenberg *et al.*, 2004) han posicionado a *A. butzleri* como el cuarto microorganismo frecuentemente aislado de pacientes con diarrea. También, se ha asociado con la “diarrea del viajero” en turistas de origen europeo y estadounidense que viajan a México, Guatemala y la India con una prevalencia que concuerda con la obtenida en la presente investigación (Jiang *et al.*, 2010).

A pesar de que *A. butzleri* suele ser la principal especie encontrada en humanos, *A. cryaerophilus* también ocupa un puesto importante dentro de las infecciones humanas provocadas por este género, ya que varios estudios en diferentes partes del mundo reportan su presencia e incluso se habla, aunque en menos situaciones, de la identificación de *A. thereius* y *A. skirrowii* (Banting y Figueras, 2017).

Para cada uno de estos estudios, se obtuvieron deposiciones de pacientes de hospitales que mostraban alguna enfermedad, y que requerían de un análisis de muestra de heces. Sin embargo, no se determinó si la presencia de *Arcobacter* estaba relacionada con los síntomas en cualquiera de estos (Banting y Figueras, 2017).

Uno de ellos en Bélgica, realizado durante los años 2008 a 2013, menciona que *Arcobacter* spp fue aislado en muestras de 89 pacientes (1.31%), de las cuales el 0.72% correspondió a *A. butzleri* mientras que el 0.56% representó a los aislamientos para *A. cryaerophilus*. *A. skirrowii* no se recuperó durante este estudio, sin embargo, se documentaron los primeros dos aislamientos de *A. thereius* en humanos, representando así el 0.03% (Van den Abeele, Vogelaers, Van Hende, y Houf, 2014).

Por otro lado, en la India se encontró un 2.67% de aislamientos para *Arcobacter* spp, donde se encontró, principalmente *A. butzleri* seguido de *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* (Patyal, Rathore, Mohan, Dhama y Kumar, 2011). En Nueva Zelanda e Italia también reportaron además de *A. butzleri* la presencia de *A. cryaerophilus*, en el primer caso de las cepas aisladas de *Arcobacter* spp, 7 muestras correspondieron a *A. butzleri* y 5 a *A. cryaerophilus* (Mandisodza, Burrows y Nulsen, 2012). En Italia, del 46.5% de muestras positivas para *Arcobacter* spp, 45.6% correspondían a *A. cryaerophilus*, 43.5% para *A. cryaerophilus* y *A. butzleri* y 10.9% en el caso de *A. butzleri* (Fera *et al.*, 2010).

Vandenberg *et al.*, (2004) sugiere que *A. butzleri* muestra características microbiológicas y clínicas similares a *C. jejuni*. Sin embargo, *A. butzleri* se asocia con mayor frecuencia a una

diarrea acuosa persistente y no a una diarrea sanguinolenta como es en el caso de *Campylobacter*.

Como se sabe *Campylobacter* se ha posicionado en la actualidad como un agente patógeno productor de diarrea en niños, siendo más común su aislamiento en contraste con *Arcobacter* (Fernández et al., 2004). Una de las razones que supone la bibliografía acerca de su mayor aislamiento, es que en el caso de *Campylobacter* se cuenta con métodos estandarizados para su aislamiento y que se aplican en la clínica de forma rutinaria, a diferencia de *Arcobacter* que no las posee.

El aislamiento de estos dos géneros difiere principalmente en temperaturas y condiciones atmosféricas y gaseosas. Por lo que puede ocurrir que tratando de aislar *Campylobacter* se termine por eliminar las cepas de *Arcobacter*, en el caso de presentarse una coinfección por parte de los dos géneros.

Por lo tanto, el bajo aislamiento de *Arcobacter* supone una deficiencia en la clínica rutinaria y al no proporcionar la importancia merecida a este microorganismo. Un estudio realizado por Bayas, (2016) demostró que el aislamiento de *Arcobacter* tiende a mejores resultados y a ser más específico cuando se realiza por métodos moleculares, en este caso utilizando PCR, que por métodos convencionales como es el método de cultivo en placa.

En el caso de la presente investigación, tanto el método de cultivo en placa como el análisis molecular permitieron el aislamiento de las 8 cepas *Arcobacter* a partir de heces diarreicas y no diarreicas de niños. No obstante, la posibilidad de que hayan existido falsos negativos en el cultivo en placa es muy probable debido a que el género no dispone de una metodología estándar que permita el aislamiento efectivo de este. Además, debe tomarse en cuenta que al ser *A. butzleri* una de las especies de más rápido crecimiento, se podría haber enmascarado el desarrollo de otra especie de *Arcobacter*, ya que las muestras no fueron analizadas directamente por un método molecular, sino únicamente las colonias que crecieron en el medio de cultivo a las 48 o 72 horas, y según otros estudios, se ha visto que otras especies de crecimiento más lento pueden tardar más del tiempo que se estableció, además de la falta de nutrientes para que crezcan las dos o más especies que pudieran haber estado presentes en la muestra (Fernández y Jaramillo, 2016).

A pesar de que *Arcobacter* spp no representaba un microorganismo de mayor relevancia para la salud pública y que además, no contaba con la importancia que se le da a otros enteropatógenos de transmisión alimentaria, en la actualidad, el incremento en los datos de prevalencia e incidencia de casos y aumento en los reportes e investigaciones sugiere que la infección en humanos y en animales ha sido subestimada, debido a la carencia de un

protocolo estándar para su aislamiento primario y al uso correcto de metodologías y técnicas de identificación (Collado et al., 2011).

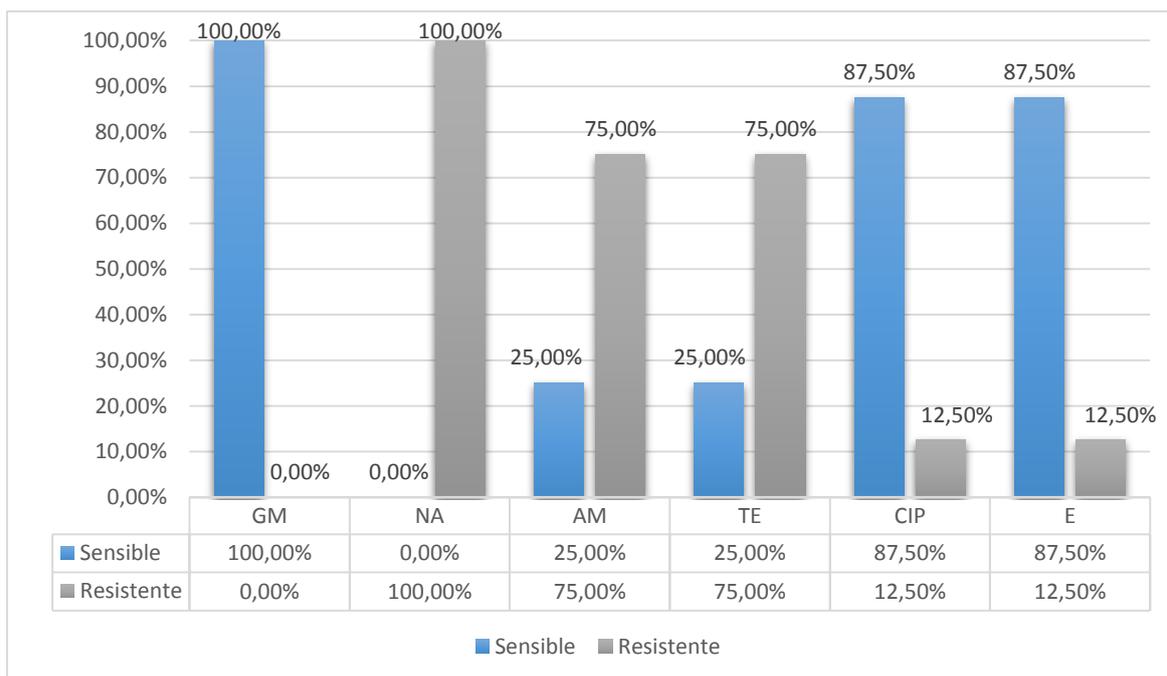
Aunque en países desarrollados y en vías de desarrollo, las infecciones por *Arcobacter* y por *Campylobacter* han sido descritas como zoonosis; todavía son escasos los reportes de *Arcobacter* como agente etiológico de diarrea en humanos, en especial en América Latina (Bayas, 2016), donde se puede suponer que es mayor con respecto a otros continentes.

Se podría sugerir que el aislamiento de *Arcobacter*, en especial la especie *butzleri* que se ha comprobado ser la más común en humanos, suele aislarse mayormente en personas cuyo sistema inmunológico se encuentra decaído, por lo que niños, adultos mayores y personas inmunosuprimidas serían la población blanco para este género, no obstante, se requieren de estudios más específicos que nos permitan llegar a una conclusión concreta, y también conocer los distintos mecanismos por los cuales *Arcobacter* invade al organismo y produce su sintomatología característica en la cual, en su mayoría, se destaca la diarrea persistente.

3.3. Actividad antimicrobiana.

Sobre el estudio de actividad antimicrobiana en las cepas aisladas de *Arcobacter*, se obtuvo que estas presentaban resistencia hacia el ácido nalidixico en un 100%, además de resistencia del 75% para ampicilina y tetraciclina, y 12.5% para ciprofloxacino y eritromicina.

Además, se pudo observar sensibilidad a gentamicina en un 100% de las cepas, 25% para ampicilina y tetraciclina y de un 87.5% para el caso de ciprofloxacino y eritromicina. Estos datos pueden observarse mejor en la figura 8.



GM: Gentamicina; NA: Ácido nalidíxico; AM: Ampicilina; TE: Tetraciclina; CIP: Ciprofloxacino; E: Eritromicina.

Figura 8. Actividad antimicrobiana de 6 antibióticos frente a *A. butzleri*.

Fuente: La autora.

Elaboración: Autora.

La enteritis producida por *Arcobacter* no suele requerir de terapia antimicrobiana; proporcional a esto se ha visto que pacientes con infecciones provocadas por *A. butzleri* han requerido de tratamiento con agentes antimicrobianos en una menor proporción (26.2%) en comparación con pacientes infectados por *C. jejuni* (41.4%) (Vandenberg et al., 2004). En este sentido, estudios anteriores han demostrado que existe sensibilidad ante fluoroquinolonas y tetraciclinas (Houf et al., 2004; Vandenberg et al., 2006).

En el caso de la presente investigación observamos una alta resistencia hacia una quinolona como lo es el ácido nalidixico y en menor proporción al ciprofloxacino. Estos resultados se asimilan a los obtenidos por Prouzet-Mauléon et al., (2006) en los que encontraron que casi todas las cepas fueron resistentes al ácido nalidixico y eran susceptibles al ciprofloxacino, como es en nuestro caso que observamos una mayor proporción de sensibilidad que de resistencia.

Por otra parte, se distingue una alta sensibilidad de nuestras cepas a gentamicina y eritromicina, pero existe también una elevada resistencia a tetraciclina y ampicilina. Estos resultados contradicen a lo mencionado anteriormente por estudios de Vandenberg et al., (2006) y Houf et al., (2004). No obstante, otro estudio realizado por Fera et al., (2003) sobre susceptibilidad in vitro para *A. butzleri* y *A. cryaerophilus* mediante la medición de la concentración mínima inhibitoria (MIC), revelan un valioso nivel de resistencia antimicrobiana

hacia ampicilina, amoxicilina y piperacilina para aislamientos de *Arcobacter* spp, lo cual se asemeja al resultado presentado.

En este mismo estudio, por otra parte, observaron que, de las dos especies analizadas, *A. butzleri* era la menos susceptible a fluoroquinolonas, y que de los aminoglucósidos que se probaron, la tobramicina y la gentamicina fueron las que tuvieron mejor actividad antimicrobiana, resultado que concuerda con lo observado en la presente investigación.

Fera et al., (2003), también ha mencionado altos niveles de resistencia por parte de las cepas *Arcobacter* a clindamicina, cloranfenicol, trimetropim y vancomicina, y que el imipenem es el agente más activo contra *A. butzleri* y *A. cryaerophilus*, sin embargo, estos antibióticos no fueron probados en este estudio.

En Nueva Zelanda, Mandisodza et al., (2012) reportaron sensibilidad a ciprofloxacino y eritromicina por parte de las cepas de *Arcobacter* spp, mientras que para tetraciclina y ampicilina mostraron resistencia en un 67% y 50%, respectivamente.

En Turquía, durante el año 2012 aislamientos de *A. butzleri* a partir de heces de pacientes con gastroenteritis fueron resistentes a ampicilina y susceptibles a gentamicina, tetraciclina, eritromicina y ciprofloxacino (Kayman et al., 2012).

Un estudio más actual en Bélgica, menciona que el género *Arcobacter* presentó susceptibilidad del 78% para el caso de la eritromicina y 72% de susceptibilidad al ciprofloxacino. Mientras que para el caso de *A. cryaerophilus* presentó el 51% de resistencia a ciprofloxacino en comparación con un 13% que presentó *A. butzleri* (Van den Abeele, Vogelaers, Vanlaere y Houf, 2016). Mencionan, además, que la mayoría de cepas de *Arcobacter* del estudio resultaron ser susceptibles a tetraciclina (89%) y gentamicina (99%), mientras que para ampicilina estas resultaron resistentes en un 91% (Shah, Saleha, Zunita, Murugaiyah y Aliyu, 2012).

Así, de acuerdo a todos los estudios que se han realizado hasta la fecha, incluyendo el presente, se puede observar como el comportamiento de las cepas ha ido variando. Por una parte, esto podría deberse al origen geográfico de las investigaciones o por otra, a la evolución que han tenido las cepas dentro de los organismos mediante la adquisición de resistencias, que sugieren un mal uso de los antibióticos comúnmente utilizados en este tipo de infecciones o a nivel veterinario, siendo este motivo de preocupación tanto para la salud humana como animal.

CONCLUSIONES

- La prevalencia de *Arcobacter* spp en la población infantil analizada fue del 8% (8/100).
- La prevalencia obtenida representa a portadores asintomáticos de la bacteria, debido a que se aisló a partir de muestras pediátricas no diarreicas y aparentemente normales.
- La especie identificada en el análisis molecular de las muestras pediátricas perteneció en un 100% (8/8) a *A. butzleri*.
- Las cepas aisladas de *A. butzleri* presentaron un 100% de resistencia hacia ácido nalidíxico mientras que en el caso de ampicilina y tetraciclina fue de 75%.
- La gentamicina mostró una buena actividad antimicrobiana en el 100% de las cepas, y en un menor porcentaje estuvieron la eritromicina y ciprofloxacino con un 87.5%.
- El elevado nivel de resistencia hacia antibióticos de amplio espectro como lo son las fluoroquinolonas y tetraciclinas, hacen evidente el mal uso que se le está dando a estas en nuestro medio.
- La distribución de especies de *Arcobacter* que han desarrollado mecanismos de resistencia en la población humana, repercuten de forma importante en el sector salud debido a que esto podría afectar la eficacia de los tratamientos dirigidos contra estos patógenos y así, aumentar el costo de los mismos.
- La presencia de portadores asintomáticos en nuestra ciudad es un tema de interés debido a que evidencia el hecho de que requerimos de una carga bacteriana mayor para la exposición de síntomas, sin embargo, si hablamos de cepas multirresistentes esto puede llevar a un problema mayor, ya que la bacteria podría ir dejando plásmidos de resistencia, aludiendo que en un futuro no existan tratamientos efectivos si se llegara a presentar el cuadro infeccioso.

RECOMENDACIONES

- El aislamiento primario de *Arcobacter* es fundamental para su identificación, por lo que se debe tomar en cuenta el tiempo y las condiciones de incubación, ya que muchas de sus especies son de crecimiento lento.
- De acuerdo a lo obtenido, se podría recomendar el uso de gentamicina, eritromicina y ciprofloxacino para el tratamiento empírico de infecciones por parte de *A. butzleri*.
- Se recomienda el estudio de la actividad antimicrobiana antes de la prescripción de un tratamiento ya que es crucial en este tipo de infecciones, debido a que un mal uso de los tratamientos y antibióticos que disponemos puede afectar a la eficacia de los mismos y aumentar su costo dentro del sector de salud pública y privada.
- Es preciso que el ente médico y el sector de salud pública y privada en general, esté al tanto del papel que desempeña *Arcobacter* dentro de los padecimientos humanos y también animales. Dentro de este margen, nos correspondería crear un esfuerzo para utilizar técnicas de cultivo y métodos de detección que permitan la identificación de las especies del género *Arcobacter* que han sido reconocidas a nivel mundial pero muy poco en América Latina y por primera vez, en esta investigación dentro de Ecuador, de manera que se pueda conocer su papel patogénico y su implicación dentro de la medicina humana y veterinaria, así como su prevalencia en el ambiente.
- En este sentido, se recomienda la realización de más estudios dentro de nuestro país para conocer aún más como se desenvuelve el género y poder aportar con más información en nuestro país y también a nivel de América Latina.
- Además de la estandarización de protocolos para la identificación fenotípica de las especies de *Arcobacter*.

BIBLIOGRAFÍA

- Banting, G., & Figueras, M. (2017). *Arcobacter*. Retrieved January 11, 2018, from <http://www.waterpathogens.org/book/arcobacter>
- Banting, G. S., Braithwaite, S., Scott, C., Kim, J., Jeon, B., Ashbolt, N., ... Neumann, N. F. (2016). Evaluation of Various Campylobacter-Specific Quantitative PCR (qPCR) Assays for Detection and Enumeration of Campylobacteraceae in Irrigation Water and Wastewater via a Miniaturized Most-Probable-Number-qPCR Assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(15), 4743–56. <https://doi.org/10.1128/AEM.00077-16>
- Bayas Morejón, I. F. (2016). APORTACIONES A LA EPIDEMIOLOGÍA DE *Arcobacter* Y *Helicobacter* spp.: APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES A SU DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN EN ALIMENTOS. 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
- Calvo, Gerardo; Arias, María Laura; Fernández, H. (2013). *Arcobacter: un patógeno emergente de origen alimentario*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* (Vol. 63). Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222013000200008
- Carbone, M., Maugeri, T. L., Giannone, M., Gugliandolo, C., Midiri, L., & Fera, M. T. (2003). Adherence of environmental *Arcobacter butzleri* and *Vibrio* spp. isolates to epithelial cells in vitro. *Food Microbiology*, 20(5), 611–616. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00172-7](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00172-7)
- Carrizo Badilla, P. M. (2007). MODIFICACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS PATOGENICAS DE ARCOBACTER BUTZLERI POR PASAJES SUCESIVOS POR PERITONEO DE RATÓN. Retrieved from <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/fcc318m/sources/fcc318m.pdf>
- Cheriyedath, S. (2016). Técnica del Polimorfismo de Longitud de Fragmento (RFLP) de Restricción. Retrieved January 29, 2018, from [https://www.news-medical.net/life-sciences/Restriction-Fragment-Length-Polymorphism-\(RFLP\)-Technique-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Restriction-Fragment-Length-Polymorphism-(RFLP)-Technique-(Spanish).aspx)
- Coker, A., Isokpehi, R., Thomas, B., Amisu, K., & Obi, C. (2002). Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerging Infectious Diseases*, 8(3), 237–44.

<https://doi.org/10.3201/eid0803.010233>

Collado, L., Cleenwerck, I., Van Trappen, S., De Vos, P., & Figueras, M. J. (2009). *Arcobacter mytili* sp. nov., an indoxyl acetate-hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 59(6), 1391–1396. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.003749-0>

Collado, L., & Figueras, M. J. (2011). Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 174–92. <https://doi.org/10.1128/CMR.00034-10>

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>

Diaz Ricci, J. C., & Hernández, M. E. (2000). Plasmid Effects on *Escherichia coli* Metabolism. *Critical Reviews in Biotechnology*, 20(2), 79–108. <https://doi.org/10.1080/07388550008984167>

Doudah, L., De Zutter, L., Van Nieuwerburgh, F., Deforce, D., Ingmer, H., Vandenberg, O., ... Houf, K. (2014). Presence and Analysis of Plasmids in Human and Animal Associated *Arcobacter* Species. *PLoS ONE*, 9(1), e85487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085487>

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>

Engberg, J., On, S. L., Harrington, C. S., & Gerner-Smidt, P. (2000). Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, and *Sutterella* spp. in human fecal samples as estimated by a reevaluation of isolation methods for *Campylobacters*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 286–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10618103>

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2017). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, v 7.1, 79. Retrieved from http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_7.1_Breakpoint_Tables.pdf

Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. (2010). Polimorfismo en la de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) Enzimas de restricción. Retrieved January 29, 2018, from <http://www.aulavirtual->

exactas.dyndns.org/claroline/backends/download.php?url=L1Bvd2VycG9pbmRzL1JGTF
AvUkZMUF8tX0JTT1RFQ05PTE9HSUFFTU9MRUNVTEFSXzEyLTEwLnBkZg%3D%3D
&cidReset=true&cidReq=BIOTECMOL

- Fera, M., Maugeri, T., Giannone, M., Gugliandolo, C., La Camera, E., Blandino, G., & Carbone, M. (2003). In vitro susceptibility of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* to different antimicrobial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21(5), 488–491. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(03\)00004-9](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(03)00004-9)
- 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 & 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., & Jaramillo, A. (2016, December). *Arcobacter butzleri*. *Revista Chilena de Infectología*, 663–664. <https://doi.org/10.1128/AEM.02404-13>
- Fernández, H., Krause, S., & Paz Villanueva, M. (2004). *Arcobacter butzleri* an emerging enteropathogen: communication of two cases with chronic diarrhea. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(3), 216–218. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000200008>
- Ferreira, S., Júlio, C., Queiroz, J. A., Domingues, F. C., & Oleastro, M. (2014). Molecular diagnosis of *Arcobacter* and *Campylobacter* in diarrhoeal samples among Portuguese patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 78(3), 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.11.021>
- Figueras, M., Collado, L., & Guarro, J. (2008). A new 16S rDNA-RFLP method for the discrimination of the accepted species of *Arcobacter*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 62(1), 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.09.019>
- Figueras, M. J., Levican, A., Collado, L., Inza, M. I., & Yustes, C. (2011). *Arcobacter ellisii* sp. nov., isolated from mussels. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(6), 414–418. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.04.004>
- Figueras, M., Levican, A., & Collado, L. (2012). Updated 16S rRNA-RFLP method for the identification of all currently characterised *Arcobacter* spp. *BMC Microbiology*, 12(1), 292. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-292>
- Gugliandolo, C., Irrera, G. P., Lentini, V., & Maugeri, T. L. (2008). Pathogenic *Vibrio*,

- Aeromonas and Arcobacter spp. associated with copepods in the Straits of Messina (Italy). *Marine Pollution Bulletin*, 56(3), 600–606. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.12.001>
- 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 & Medical Microbiology*, 50(1), 51–58. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00230.x>
- Ho, T., Lipman, L., van der Graaf-van Bloois, L., van Bergen, M., & Gaastra, W. (2006). Potential routes of acquisition of Arcobacter species by piglets. *Veterinary Microbiology*, 114(1–2), 123–133. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2005.11.051>
- Houf, K., Devriese, L. A., De Zutter, L., Van Hoof, J., & Vandamme, P. (2001). Development of a new protocol for the isolation and quantification of Arcobacter species from poultry products. *International Journal of Food Microbiology*, 71(2–3), 189–196. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00605-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00605-5)
- Houf, K., Devriese, L. A., Haesebrouck, F., Vandenberg, O., Butzler, J.-P., Hoof, J. Van, & Vandamme, P. (2004). Antimicrobial Susceptibility Patterns of Arcobacter butzleri and Arcobacter cryaerophilus Strains Isolated from Humans and Broilers. *Microbial Drug Resistance*, 10(3), 243–247. <https://doi.org/10.1089/mdr.2004.10.243>
- Houf, K., & Stephan, R. (2007). Isolation and characterization of the emerging foodborn pathogen Arcobacter from human stool. *Journal of Microbiological Methods*, 68(2), 408–413. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.09.020>
- Jara, G. (2006). *Especies del género CAMPYLOBACTER y del género ARCOBACTER en muestras de deposiciones humanas y animales*. Universidad Austral de Chile . Retrieved from <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2006/fcj.37e/doc/fcj.37e.pdf>
- 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), 1417–9. <https://doi.org/10.1128/JCM.01709-09>
- Kabeya, H., Maruyama, S., Morita, Y., Ohsuga, T., Ozawa, S., Kobayashi, Y., ... Mikami, T. (2004). Prevalence of Arcobacter species in retail meats and antimicrobial susceptibility of the isolates in Japan. *International Journal of Food Microbiology*, 90(3), 303–308. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00322-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00322-2)
- Karadas, G., Sharbati, S., Hänel, I., Messelhäußer, U., Glocker, E., Alter, T., & Götz, G. (2013).

- Presence of virulence genes, adhesion and invasion of *Arcobacter butzleri*. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2), 583–590. <https://doi.org/10.1111/jam.12245>
- Kayman, T., Abay, S., Hizlisoy, H., Atabay, H. I., Diker, K. S., & Aydin, F. (2012). Emerging pathogen *Arcobacter* spp. in acute gastroenteritis: molecular identification, antibiotic susceptibilities and genotyping of the isolated arcobacters. *Journal of Medical Microbiology*, 61(Pt_10), 1439–1444. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.044594-0>
- Kiehlbauch, J. A., Brenner, D. J., Nicholson, M. A., Baker, C. N., Patton, C. M., Steigerwalt, A. G., & Wachsmuth, A. I. K. (1991). *Campylobacter butzleri* sp. nov. Isolated from Humans and Animals with Diarrheal Illness. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 29(2), 376–385. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC269771/pdf/jcm00038-0160.pdf>
- Levicán, 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>
- Mandisodza, O., Burrows, E., & Nulsen, M. (2012). *Arcobacter* species in diarrhoeal faeces from humans in New Zealand. *The New Zealand Medical Journal*, 125(1353), 40–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22522270>
- Mansilla, I. (2006). ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS MÉTODOS DE GENOTIPIFICACIÓN PARA *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* y *Arcobacter skirrowii* AISLADOS DE DIVERSOS RESERVORIOS BIOLÓGICOS. Retrieved from <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2006/fcm288e/doc/fcm288e.pdf>
- Martínez, A., Pedraza, E., Ortuño, D., & Rojas, A. (2017). DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DEL NEWCASTLE AVIAR. Retrieved from www.smcf.org.mx/smcfliv/visordoc.php?mostrar=589
- Milesi, S. (2009). *Emerging pathogen Arcobacter spp in food of animal origin*. Università degli Studi di Milano. Retrieved from https://air.unimi.it/retrieve/handle/2434/157298/133258/phd_unimi_R07490.pdf
- Mohan, H. V., Rathore, R. S., Dhama, K., Ramees, T. P., Patya, A., Bagalko, P. S., ... Kumar, A. (2014). Prevalence of *Arcobacter* spp. in Humans, Animals and Foods of Animal Origin in India Based on Cultural Isolation, Antibiogram, PCR and Multiplex PCR Detection. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(8), 452–466. <https://doi.org/10.3923/ajava.2014.452.466>

- Neill, S. D., Campbell, J. N., O'Brien, J. J., Weatherup, S. T. C., & Ellis, W. A. (1985). Taxonomic Position of *Campylobacter cvyaevophila* sp. nov. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*, 35(3), 342–356. Retrieved from <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/35/3/ijjs-35-3-342.pdf?expires=1515697983&id=id&accname=guest&checksum=3D039A7D1EF2A1B40ACECCF3810AE3D7>
- Nuñez, M. (2013). La electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización. Retrieved January 29, 2018, from <https://es.scribd.com/document/167456686/La-electroforesis-en-gel-con-gradiente-de-desnaturalizacion>
- Patyal, A., Rathore, R. S., Mohan, H. V., Dhama, K., & Kumar, A. (2011). Prevalence of *Arcobacter* spp. in Humans, Animals and Foods of Animal Origin Including Sea Food from India. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58(5), 402–410. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01221.x>
- Prouzet-Mauléon, V., Labadi, L., Bouges, N., Ménard, A., & Mégraud, F. (2006). *Arcobacter butzleri*: underestimated enteropathogen. *Emerging Infectious Diseases*, 12(2), 307–9. <https://doi.org/10.3201/eid1202.050570>
- Rahimi, E. (2014). Prevalence and antimicrobial resistance of *Arcobacter* species isolated from poultry meat in Iran. *British Poultry Science*, 55(2), 174–180. <https://doi.org/10.1080/00071668.2013.878783>
- Ramees, T., Dhama, K., Karthik, K., Rathore, R., Kumar, A., Saminathan, M., ... Singh, R. (2017). *Arcobacter*: an emerging food-borne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control – a comprehensive review. *Informa UK Limited*. <https://doi.org/10.1080/01652176.2017.1323355>
- Ricci, J. y Hernández, M. (2000). Plasmids Effects on *Escherichia coli* Metabolism. *Critical Reviews in Biotechnology*, 20(2), 79-108. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07388550008984167>
- Ruiz, N. (2008). Bioinformatics identification of MurJ (MviN) as the peptidoglycan lipid II flippase in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(40), 15553–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808352105>
- Sagua, T. (2013). Bacterias – Especie *Arcobacter*. Retrieved January 11, 2018, from <http://laenciclopediagalactica.info/2013/06/28/bacterias-especie-arcobacter/>
- Samie, A., Obi, C. L., Barrett, L. J., Powell, S. M., & Guerrant, R. L. (2007). Prevalence of *Campylobacter* species, *Helicobacter pylori* and *Arcobacter* species in stool samples from

- the Venda region, Limpopo, South Africa: Studies using molecular diagnostic methods. *Journal of Infection*, 54(6), 558–566. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.10.047>
- SFM, & EUCAST. (2017). Comité de l'antibiograma de la Société Française de Microbiologie. Retrieved from http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFMV1_0_MARS_2017.pdf
- Shah, A. H., Saleha, A. A., Zunita, Z., Murugaiyah, M., & Aliyu, A. B. (2012). Antimicrobial susceptibility of an emergent zoonotic pathogen, *Arcobacter butzleri*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(6), 569–570. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.08.001>
- Shah, A. H., Saleha, A. A., Zunita, Z., Murugaiyah, M., Aliyu, A. B., & Jafri, N. (2013). Prevalence, Distribution and Antibiotic Resistance of Emergent *Arcobacter* spp. from Clinically Healthy Cattle and Goats. *Transboundary and Emerging Diseases*, 60(1), 9–16. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01311.x>
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P., & Viridi, J. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6, 791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>
- Skirrow, M. B. (2006). John McFadyean and the Centenary of the First Isolation of *Campylobacter* Species. *Clinical Infectious Diseases*, 43(9), 1213–1217. <https://doi.org/10.1086/508201>
- 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>
- Son, I. (2005). Prevalence, genetic diversity, and antimicrobial resistance patterns of *Arcobacter* and *Campylobacter* on boiler carcasses during processing. *Doctoral Thesis*. Retrieved from https://getd.libs.uga.edu/pdfs/son_insook_200512_phd.pdf
- Tabatabaei, M., Shirzad Aski, H., Shayegh, H., & Khoshbakht, R. (2014). Occurrence of six virulence-associated genes in *Arcobacter* species isolated from various sources in Shiraz, Southern Iran. *Microbial Pathogenesis*, 66, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2013.10.003>
- Ünver, A., Atabay, H. İ., Şahin, M., & Çelebi, Ö. (2013). Turkish Journal of Medical Sciences Antimicrobial susceptibilities of various *Arcobacter* species. *Turk J Med Sci*, 43, 548–552. <https://doi.org/10.3906/sag-1207-115>

- Van den Abeele, A.-M., Vogelaers, D., Van Hende, J., & Houf, K. (2014). Prevalence of *Arcobacter* Species among Humans, Belgium, 2008–2013. *Emerging Infectious Diseases*, *20*(10), 1746–1749. <https://doi.org/10.3201/eid2010.140433>
- Van den Abeele, A.-M., Vogelaers, D., Vanlaere, E., & Houf, K. (2016). Antimicrobial susceptibility testing of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* strains isolated from Belgium patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *71*(5), 1241–1244. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv483>
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., & De Ley, J. (1991). Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* Taxonomy: Emendation of Generic Descriptions and Proposal of *Arcobacter* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *41*(1), 88–103. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-1-88>
- Vandamme, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Mels, L., Hoste, B., Dewettinck, D., ... Goossens, H. (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>
- Vandenberg, O., Dediste, A., Houf, K., Ibeqwem, S., Souayah, H., Cadranel, S., ... Vandamme, P. (2004). *Arcobacter* species in humans. *Emerging Infectious Diseases*, *10*(10), 1863–7. <https://doi.org/10.3201/eid1010.040241>
- Vandenberg, O., Houf, K., Douat, N., Vlaes, L., Retore, P., Butzler, J.-P., & Dediste, A. (2006). Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of non-jejuni/coli campylobacters and arcobacters from Belgium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *57*(5), 908–913. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl080>
- Villarruel-López, A., Márquez-González, M., Garay-Martínez, L. E., Zepeda, H., Castillo, A., Mota de la Garza, L., ... Torres-Vitela, R. (2003). Isolation of *Arcobacter* spp. from retail meats and cytotoxic effects of isolates against vero cells. *Journal of Food Protection*, *66*(8), 1374–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12929822>
- Whiteduck-Léveillé, J., Cloutier, M., Topp, E., Lapen, D., Talbot, G., Villemur, R., & Khan, I. U. H. (2016). Development and evaluation of multiplex PCR assays for rapid detection of virulence-associated genes in *Arcobacter* species. *Journal of Microbiological Methods*, *121*, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.12.017>
- Wybo, I., Breynaert, J., & Lauwers, S. (2004). Isolation of *Arcobacter skirrowii* from a patient with chronic diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(4), 1851–2.

<https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1851-1852.2004>

Zárate, M. S., Romano, V., Nievas, J., & Smayevsky, J. (2014). Utilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(2), 98–102. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70055-0](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70055-0)

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(0), 35. <https://doi.org/10.15381/anales.v73i1.2191>

Zerpa, R., Alarcón, J., Lezama, P., Patiño, L., Reyes, A., Valencia, A., ... Alarcón, M. (2014). Identificación de *Arcobacter* en heces de niños y adultos con/sin diarrea y en reservorios animales. *Anales de La Facultad de Medicina*, 75(2), 185–187. Retrieved from http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1025-55832014000200017&script=sci_arttext

ANEXOS

PROTOCOLOS
ANEXO 1: Caldo de enriquecimiento para *Arcobacter*

Fórmula para 1000 ml	
Medio base	Cantidades
Nutriente Broth N°2 (OXOID)	25 g
Extracto de Levadura	10 g
Agar technical N° 2 (OXOID)	1 g
Sangre	50 ml
Agua destilada	950 ml
Mezcla Antibiótica de Houf	
Cefoperazona	16 mg
5-fluorouracil	100 mg
Novobiocina	32mg
Trimetropim	64 mg

Procedimiento

1. Pesar 25g de agar Nutrient Broth N°2.
2. Pesar 10g de Extracto de levadura.
3. Pesar 1g de Agar technical N°2.
4. Medir en una probeta 950 mL de agua destilada.
5. Colocar en un boheco con tapa el agar Nutrient Broth N°2, el extracto de levadura y el Agar technical N°2, añadiendo conjuntamente con el agua.
6. Mezclar hasta homogenizar completamente el medio.
7. Regular a un pH de 7, utilizando ácido clorhídrico al 5%.
8. Esterilizar el medio en autoclave a 121°C y 1.5 atm de presión por 20 minutos.
9. Enfriar el medio hasta una temperatura aproximada de 37°C.
10. Agregar mezcla antibiótica de Houf.
11. Adicionar 50 mL de sangre humana y homogenizar la mezcla.
12. Dispensar 8 mL de caldo en tubos corning de 15 mL con tapa rosca estériles.
13. Conservar el medio a 4°C.



Figura 9. Medio de transporte selectivo para *Arcobacter*.

Fuente: La autora.

ANEXO 2: Medio de agar sangre enriquecido para *Arcobacter*

Fórmula para 1000 ml	
Medio base	Cantidades
Caldo Nutriente N°2 (OXOID)	25 g
Extracto de Levadura	10 g
Agar technical N° 2 (OXOID)	14 g
Sangre	50 ml
Agua destilada	950 ml

1. Pesar 25 de agar Nutrient Broth N°2.
2. Pesar 14g de agar Extracto de Levadura.
3. Pesar 10g de extracto de levadura.
4. Medir en una probeta 950 ml de agua destilada.
5. Colocar en un boheco con tapa el agar Nutrient Broth N°2, el agar extracto de levadura y el extracto de levadura, añadiendo conjuntamente con el agua.
6. Mezclar todo hasta homogenizar.
7. Regular a un pH de 7, utilizando ácido clorhídrico al 5%.
8. Esterilizar el medio en autoclave a 121°C y 1.5 atm de presión por 20 minutos.
9. Enfriar el medio hasta temperatura aproximada de 37°C.
10. Adicionar 50ml de sangre humana y homogenizar suavemente la mezcla con el fin de no formar burbujas.
11. Dispensar en cajas de Petri, dejar reposar hasta su solidificación.
12. Conservar el medio a 4°C.



Figura 10. Medio de agar sangre enriquecido con extracto de levadura.

Fuente: La autora.

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



Figura 11. Método de aislamiento de especies de *Arcobacter* mediante técnica de filtrado. La figura muestra el crecimiento de colonias sospechosas tras 72 horas de incubación a 30°C.

Fuente: La autora.

ANEXO 3: 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	80 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 manera 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.

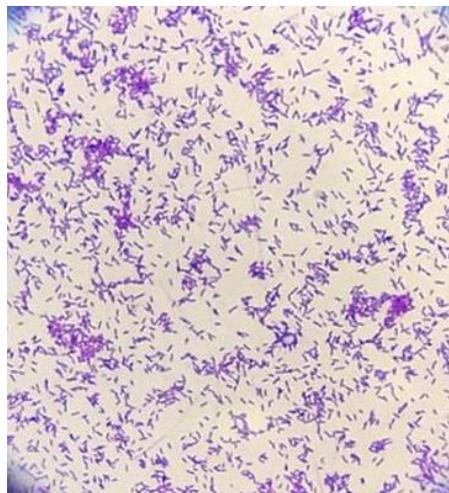


Figura 12. Microscopía óptica (100X). Tinción de Hucker.
Se observa la morfología curva característica de *Arcobacter* spp

Fuente: La autora.

ANEXO 4: 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. Esperar 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 coloración, la prueba es considerada negativa.

Prueba 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 hidrógeno 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 crecimiento en MacConkey

1. Tomar una colonia aislada de un cultivo puro sospechoso de *Arcobacter* e inocular en un agar MacConkey.
2. Realizar un estriado por cuadrantes e incubar a 30°C durante 24 a 48 horas.
3. Según la bibliografía, *A. butzleri* es la especie del género que mejor se desarrolla en este medio de cultivo.

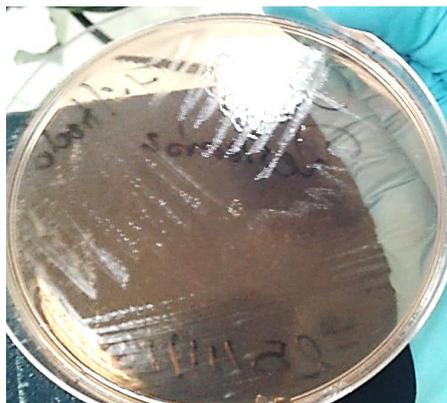


Figura 13. Crecimiento en agar MacConkey

Fuente: La autora.

ANEXO 5: Caldo tioglicolato modificado

Fórmula para 100 ml	
Medio base	Cantidades
Caldo Tioglicolato	2.98 g
Extracto de Levadura	1 g
Agar technical N° 2 (OXOID)	0.1 g
Agua destilada	100 ml

1. Pesar 2.98 g de medio de tioglicolato.
2. Pesar 1 g de extracto de levadura.
3. Medir en una probeta 100 ml de agua destilada.
4. Colocar en un boheco con tapa el medio de tioglicolato, el extracto de levadura e ir añadiendo conjuntamente poco a poco el agua.
5. Mezclar todo hasta su completa homogenización.
6. Esterilizar el medio en autoclave a 121°C y 1.5 atm de presión por 20 minutos.
7. Enfriar un poco y dispensar aproximadamente entre 7 ml a 8 ml en tubos Corning de 15 ml con tapa rosca estériles.
8. Conservar el caldo a 4°C.

ANEXO 6: 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 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Figura 14. Criotubos inoculados con cepas de *Arcobacter* spp.

Fuente: La autora.

Criopreservación DMSO

1. Inocular en caldo tioglicolato la cepa de *Arcobacter* aislada y dejar incubar a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 24-48 h.
2. Tomar $900\text{ }\mu\text{l}$ de la parte superior del cultivo en tioglicolato y colocar en un eppendorf de 1.5 ml .
3. Añadir $100\text{ }\mu\text{l}$ de DMSO, dar vórtex e identificar las muestras.
4. Almacenar las muestras a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

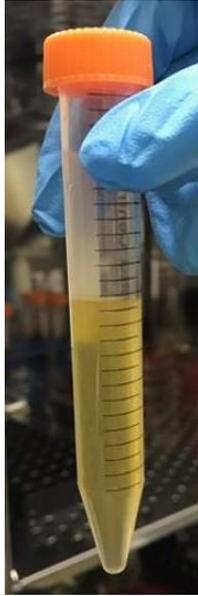


Figura 15. Caldo tioglicolato inoculado con una cepa de *Arcobacter* spp.

Fuente: La autora.

ANEXO 7: 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 la 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. Tomar 1ml de cultivo de bacterias incubado durante la 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 µl 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 µl 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 µl 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 8: Multiplex-PCR para identificación de especies de *Arcobacter*.

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

REACTIVOS

- Buffer Green
- dNTP's
- MgCl₂
- Taq Polimerasa
- 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 (μl)	Concentración	Concentración final
H ₂ O	9.375		
Buffer Green	5	5 X	1 X
dNTP's	0.5	10 mM	200 μM
MgCl ₂	1.5	25 mM	1.5 mM
Primers	ArcoF	0.5	100 μM
	ButR	0.5	100 μM
	TherR	0.5	100 μM
	CibR	0.5	100 μM
	SkiR	0.5	100 μM
	GyrasF	0.5	100 μM
	GyrasR	0.5	100 μM
TaqPolimerasa	0.125	5 U/μl	1.25U/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 la Multiplex-PCR touchdown.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	2 min.	1
Desnaturalización	95	45 seg.	8
Anillamiento	61	45 seg.	
Extensión	72	2 min.	
Desnaturalización	95	45 seg.	27
Anillamiento	56	45 seg.	
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 9: Electroforesis en Gel 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. Pesar 0.7 g de agarosa UltraPure™ de Invitrogen.
2. Medir con ayuda de una probeta 35 ml de TAE 1X.
3. En un matraz limpio y seco, añadir la agarosa y el TAE 1 x, disolver por calentamiento hasta su completa homogenización o hasta observar un líquido completamente transparente. Evitar llegar a la temperatura de ebullición con el fin de no perder producto.
4. Añadir 3.5 µl de SYBR a la solución y mezclar.
5. Verter el contenido total líquido en la bandeja de electroforesis, ubicar la peineta y reservar hasta la solidificación del gel.
6. Remover la peineta y accesorios. Colocar el gel de agarosa en la cubeta de electroforesis y adicionar TAE 1X hasta cubrir completamente.
7. En los pocillos correspondientes colocar 2 µl de marcador de peso molecular (100pb), seguidamente de 4 µl de cada uno de los controles y de las muestras resultantes de la PCR-múltiple.
8. Tapar la cubeta y conectar los electrodos a la fuente de poder.
9. Programar la corrida a 120 V / 300 mA por 60 min.
10. Revelar gel en luz UV en transiluminador UV Enduro™ GDSTOUCH Labnet.

ANEXO 10. Determinación de actividad antimicrobiana

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
Ciprofloxacino	5	26	26
Ácido nalidíxico	30	19	14
Ampicilina	10	14	14
Tetraciclina	30	30	30

1. Tomar con un hisopo estéril colonia del cultivo puro y colocarlo en 2 ml de solución fisiológica, homogenizar y ajustar la turbidez de 0.5 en la escala McFarland.
2. Dar vórtex.
3. Sembrar mediante hisopado continuo en Medio Agar Müller Hilton, enriquecido con extracto de levadura y 5% de sangre.
4. Colocar los discos de antibióticos e incubar a 30°C por 48 horas.

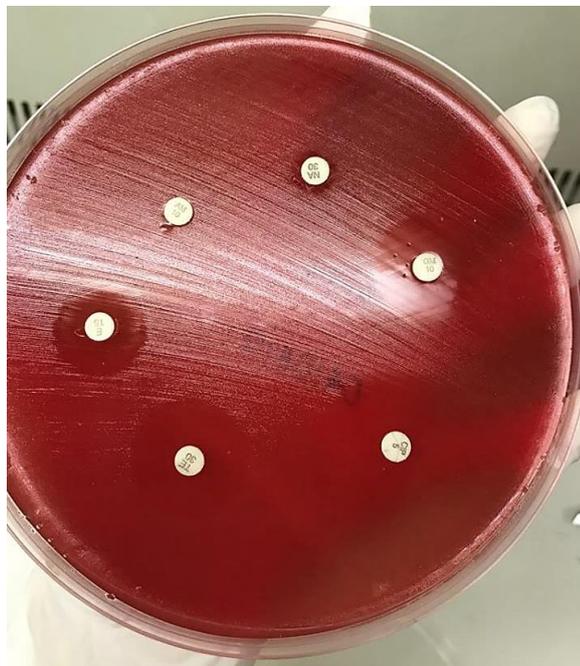


Figura 16. Actividad antimicrobiana de una cepa de *A. butzleri*.

Fuente: La autora.