



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**Prevalencia de especies de *Arcobacter* spp. en heces de ganado porcino
y bovino de la ciudad de Loja.**

TRABAJO DE TITULACIÓN.

AUTOR: Fernández Cajamarca, Jimmy Jordy

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 titulación: **Prevalencia de especies de *Arcobacter* spp. en heces de ganado porcino y bovino de la ciudad de Loja**, realizado por **Fernández Cajamarca, Jimmy Jordy**, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, abril del 2018

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Fernández Cajamarca, Jimmy Jordy**, declaro ser autor del presente trabajo de titulación: Prevalencia de especies de *Arcobacter* spp. en heces de ganado porcino y bovino de la ciudad de Loja, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo la Mgtr. Rosa Janneth Simaluiza Masabanda directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo de carácter investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

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

f).....

Autor: Jimmy Jordy Fernández Cajamarca

Cédula: 1105158198

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a mis padres, quienes con su amor me supieron ayudar, guiar y motivar para continuar con mis estudios y cumplir esta gran meta.

A mis hermanos quienes me supieron ayudar brindándome su apoyo durante el desarrollo de toda mi carrera universitaria.

Jimmy Fernández

AGRADECIMIENTO

Mi más sincero agradecimiento a mis padres y hermanos por apoyarme durante toda mi vida y sobre todo durante este gran paso que es terminar mis estudios universitarios.

Al Dr. Heriberto Fernández quien compartió sus conocimientos para poder desarrollar y culminar este proyecto con éxito.

A mi directora de tesis la Mgtr. Janneth Simaluiza, por haberme brindado la oportunidad y la orientación en el desarrollo de esta investigación.

A la Mgtr. Zorayda Toledo, por guiarme y ayudarme en el desarrollo del presente estudio.

A mis amigos y compañeros de investigación Nicole, Ángel, Dayanara y Lilibeth quienes me ayudaron en el transcurso del proyecto.

Jimmy Fernández

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CÁRATULA	i
APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Taxonomía de la Familia <i>Campylobacteraceae</i>	6
1.2. Género <i>Arcobacter</i>	7
1.2.1. Morfología y crecimiento.....	8
1.2.2. Características bioquímicas.....	9
1.2.3. Principales especies patógenas para el ser humano.	9
1.2.4. Reservorios y vías de transmisión.....	10
1.2.5. <i>Arcobacter</i> en ganado porcino.....	12
1.2.6. <i>Arcobacter</i> en ganado bovino.....	13
1.3. Infección por <i>Arcobacter</i>	14
1.3.1. Manifestaciones Clínicas.....	14
1.3.2. Patogenia.....	15
1.3.3. Epidemiología.....	17
1.4. Diagnóstico clínico	18
1.4.1. Aislamiento.....	18
1.4.2. Identificación fenotípica.....	18
1.4.3. Identificación molecular.....	19
1.5. Tratamiento.....	20
1.6. Resistencia bacteriana.....	20
1.6.1. Mecanismos de resistencia.....	21
1.7. Técnicas moleculares de identificación <i>Arcobacter</i> spp.	21
1.7.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	21
1.7.2. Multiplex-PCR.....	22
1.7.3. PCR en Tiempo Real.....	23
1.7.4. Espectrometría de masas (MALDI-TOF MS).....	23
1.7.5. Electroforesis en gel de campo pulsátil (EGCP).....	24
1.7.6. Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	25
CAPÍTULO II: METODOLOGÍA.....	26
2.1. Lugar de muestreo y Población de estudio	27
2.2. Identificación fenotípica de <i>Arcobacter</i>	27
2.2.1. Siembra y Aislamiento.....	27
2.2.2. Identificación morfológica.....	28
2.2.3. Identificación mediante pruebas bioquímicas.....	28
2.3. Identificación molecular.....	28
2.3.1. Extracción de ADN.....	28
2.3.2. Multiplex-PCR.....	28
2.4. Actividad antimicrobiana	30

2.4.1. Método de Difusión en Disco.....	30
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
RESULTADOS	32
3.1. Prevalencia de <i>Arcobacter</i> spp. en ganado porcino	32
3.2. Identificación de especies de <i>Arcobacter</i> en ganado porcino	32
3.3. Actividad antimicrobiana de 6 antibióticos frente a <i>Arcobacter</i> spp. en ganado porcino.....	33
3.4. Prevalencia de <i>Arcobacter</i> spp. en ganado bovino	36
3.5. Identificación de especies de <i>Arcobacter</i> en ganado bovino	36
3.6. Actividad antimicrobiana de 6 antibióticos frente a <i>Arcobacter</i> spp. en ganado bovino	37
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIONES	48
RECOMENDACIONES.....	49
BIBLIOGRAFÍA.....	49
ANEXOS	62
ANEXO 1: Caldo de enriquecimiento para <i>Arcobacter</i>	63
ANEXO 2: Medio de agar sangre enriquecido para <i>Arcobacter</i>	65
ANEXO 3: Tinción de Hucker.....	65
ANEXO 4: Pruebas bioquímicas para la identificación de especies de <i>Arcobacter</i>	67
ANEXO 5: Caldo tioglicolato modificado	68
ANEXO 6: Criopreservación	69
ANEXO 7: Extracción de ADN Genómico de Bacterias gramnegativas	70
ANEXO 8: Multiplex-PCR para identificación de especies de <i>Arcobacter</i>	72
ANEXO 9: Electroforesis en Gel de Agarosa	74
ANEXO 10: Determinación de actividad antimicrobiana.....	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies del género *Arcobacter*.

Tabla 2. Prevalencia de especies de *Arcobacter*.

Tabla 3. Características bioquímicas y de crecimiento de especies de *Arcobacter*.

Tabla 4. Primers utilizados en la identificación de especies de *Arcobacter* mediante Multiplex-PCR.

Tabla 5. Identificación de especies de *Arcobacter*.

Tabla 6. Condiciones de la Multiplex-PCR touchdown.

Tabla 7. Criterios de interpretación de susceptibilidad antimicrobiana.

Tabla 8. Prevalencia de especies de *Arcobacter* en porcinos.

Tabla 9. Especies de *Arcobacter* identificadas mediante Multiplex-PCR.

Tabla 10. Prevalencia de especies de *Arcobacter* en bovinos.

Tabla 11. Especies de *Arcobacter* identificadas mediante Multiplex-PCR.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Eje cronológico de la identificación de especies de *Arcobacter*.
- Figura 2.** Vías de transmisión y mecanismos de patogenicidad de *Arcobacter* spp.
- Figura 3.** Mecanismos de patogenicidad descritos para *Arcobacter* en células del epitelio intestinal.
- Figura 4.** Identificación molecular de especies de *Arcobacter* mediante Multiplex-PCR en porcinos.
- Figura 5.** Actividad antimicrobiana del género *Arcobacter* en porcinos.
- Figura 6.** Actividad antimicrobiana de seis antibióticos frente a especies de *Arcobacter* identificadas en porcinos.
- Figura 7.** Identificación molecular de especies de *Arcobacter* mediante Multiplex-PCR en bovinos.
- Figura 8.** Actividad antimicrobiana del género *Arcobacter* en bovinos.
- Figura 9.** Actividad antimicrobiana de seis antibióticos frente a especies de *Arcobacter* identificadas en bovinos.
- Figura 10.** Medio de transporte selectivo para el aislamiento de especies de *Arcobacter*.
- Figura 11.** Método de aislamiento de especies de *Arcobacter* mediante técnica de filtrado.
- Figura 12.** Microscopía óptica (100X). Tinción de Hucker.
- Figura 13.** Pruebas bioquímicas.
- Figura 14.** Crecimiento en agar MacConkey.
- Figura 15.** Criotubos inoculados con una cepa de *Arcobacter* spp.
- Figura 16.** Caldo tioglicolato inoculado con una cepa de *Arcobacter* spp.
- Figura 17.** Determinación de actividad antimicrobiana.

RESUMEN

Arcobacter spp. es un patógeno emergente de carácter zoonótico, productor de enteritis en humanos. Su distribución en la naturaleza es muy amplia, reconociéndose como sus principales reservorios a porcinos, bovinos y algunas aves. Por ello, el objetivo de este estudio fue identificar la prevalencia de *Arcobacter* spp. en ganado porcino y bovino. La prevalencia de *Arcobacter* spp. en ganado porcino fue del 40% (20/50) y en ganado bovino del 62% (31/50). Mediante Multiplex-PCR se identificó en ganado porcino un 45.4% *A. thereius*, 36.3% *A. skirrowii*, 13.6% *A. butzleri* y 4.5% *A. cryaerophilus*; en ganado bovino se identificó un 72.2% *A. butzleri*, 16.6% *A. cryaerophilus* y 11.1% *A. skirrowii*. Los resultados de la actividad antimicrobiana de *Arcobacter* spp. en ganado porcino mostraron resistencia a ciprofloxacina 54.5% y ácido nalidíxico 50%, mientras que en ganado bovino las cepas mostraron resistencia a tetraciclina 69.4%, ácido nalidíxico 66.6% y ampicilina 66.6%. Estos resultados revelan una alta prevalencia de estas especies en estos reservorios animales, las cuales expresaron elevadas tasas de resistencia a antibióticos de uso común en la clínica humana.

Palabras clave: Multiplex-PCR, zoonótico, *Arcobacter*, susceptibilidad.

ABSTRACT

Arcobacter spp. is an emerging zoonotic pathogen, producing enteritis in humans. Its distribution in nature is very wide, recognizing as its main reservoirs porcine, cattle and some birds. Therefore, the objective of this study was to identify *Arcobacter* spp. prevalence in porcine and cattle. The prevalence of *Arcobacter* spp. in porcine was 40% (20/50) and in cattle 62% (31/50). By Multiplex-PCR in porcine were identified 45.4% *A. thereius*, 13.6% *A. butzleri* and 4.5% *A. cryaerophilus*; in cattle were identified 72.2% *A. butzleri*, 16.6% *A. cryaerophilus* and 11.1% *A. skirrowii*. The results of antimicrobial activity of *Arcobacter* spp. from porcine showed resistance to ciprofloxacin 54.5% and nalidixic acid 50%, while in bovines the strains showed resistance to tetracycline 69.4%, nalidixic acid 66.6% and ampicillin 66.6%. These results reveal a high prevalence of these species in our animal reservoirs, which expressed high rates of resistance to antibiotics commonly used in the human clinic.

Keywords: Multiplex-PCR, zoonotic, *Arcobacter*, susceptibility.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han identificado un gran número de enfermedades emergentes que afectan al ser humano cuyo origen es zoonótico. Es así, que las especies del género *Arcobacter* se consideran bacterias emergentes que producen infección en los seres humanos transmitidas por animales, agua o alimentos contaminados con materia fecal. Es por lo tanto de gran importancia para la salud pública su adecuado reconocimiento como patógeno emergente causante de diarrea en el ser humano (Collado y Figueras, 2011).

La gravedad del cuadro clínico en las infecciones por especies del género *Arcobacter* es muy variada, pueden manifestarse como diarreas crónicas y abundantes, hasta infecciones asintomáticas, pero que constituyen pérdidas económicas por bajas temporales. El género *Arcobacter* está conformado por bacterias gramnegativas, curvas no esporuladas, en forma de "S" cuando están en cultivos jóvenes y en forma esférica o cocoide en cultivos viejos. Tienen un tamaño que oscila entre las 0.2 y 0.9 μm de ancho, con un largo de entre 0.5 y 3.0 μm , presenta gran movilidad debido a la presencia de un flagelo polar simple (Vandamme y De Ley, 1991). La alta prevalencia de *Arcobacter* en el tracto intestinal y en las heces de animales de granja y productos cárnicos, determina que los alimentos contaminados y el contacto con animales portadores de la bacteria, son una de las principales rutas de transmisión (Calvo, Arias y Fernández, 2013; Patyal, Rathore, Mohan, Dhama y Kumar, 2011).

Diversas investigaciones han reportado como la especie más frecuentemente aislada a *A. butzleri*, seguida de *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* (Samie, Obi, Barrett, Powell y Guerrant, 2007). *A. butzleri* se caracteriza por producir una diarrea acuosa con dolor abdominal, náuseas y vómito la cual se diferencia de la diarrea sanguinolenta asociada a *Campylobacter jejuni*. No está bien definido el mecanismo por el cual esta bacteria produce la diarrea acuosa, pero se dice, que tiene la capacidad de adherirse al epitelio y causar una disfunción de la barrera epitelial induciendo cambios en las proteínas de uniones estrechas y también tiene la capacidad de producir apoptosis de las células del epitelio (Bücker, Troeger, Kleer, Fromm y Schulzke, 2009; Fernández, Flores y Inzunza, 2010).

En diversos estudios, se han evaluado muestras de heces diarreicas de humanos, ganado porcino, ganado bovino, aves de corral y muestras de alimentos como carne de pollo, carne de res, carne de cerdo y leche cruda, encontrándose que *A. butzleri* y *A. skirrowii* fueron las especies encontradas en todas las muestras (Mohan et al., 2014).

Se ha reportado, un 80-90% de las cepas aisladas de *A. butzleri* sensibles a las quinolonas y del 100% a la gentamicina y tetraciclina (Vandenberg et al., 2006). En los últimos años, se ha evidenciado un incremento en las tasas de resistencia, donde el 44.28% de cepas de *A. butzleri* fueron resistentes al ácido nalidíxico y el 12.85% resistentes a la enrofloxacin, además de un 2.85% de resistencia a la tetraciclina; los autores mencionan particularmente la resistencia a las quinolonas observada en su estudio, relacionándola al uso de estos antibióticos en la clínica veterinaria (Abay, Kayman, Hizlisoy y Aydin, 2012),

Es por tanto, importante considerar que en la ciudad de Loja, sobre todo en los alrededores, la realización de actividades agrícolas es una de las principales fuentes económicas, en las cuales se emplea como fertilizante las heces de animales de granja (aves de corral, cerdos y vacas). Por otro lado, también existe la crianza de estos animales (reconociéndose a muchos de ellos como reservorios naturales de estos microorganismos) que son destinados para el consumo de la población lojana. Se considera necesaria esta investigación en nuestro medio, siendo el principal objetivo de este trabajo conocer la distribución y dispersión ecológica de especies de *Arcobacter* aisladas a partir de heces de ganado porcino y bovino, usando métodos bacteriológicos y moleculares para su identificación. Además de contribuir con información científica que abra la puerta a la investigación de estos patógenos emergentes en el Ecuador.

**CAPÍTULO I:
MARCO TEÓRICO**

1.1. Taxonomía de la Familia *Campylobacteraceae*

Los microorganismos pertenecientes a la familia *Campylobacteraceae* fueron observados por primera vez en 1881 por el alemán Escherich, quien observó al microscopio microorganismos de forma curva, siendo estos encontrados en heces de niños con diarrea e incluyéndose en primera instancia dentro del género *Vibrio* (Butzler, 2004). En 1913 en Inglaterra, McFadyean y Stockman describieron a estos microorganismos que se encontraban implicados en casos de abortos e infertilidad en ovinos (Skirrow, 2006). En 1919, estos microorganismos fueron encontrados en abortos de bovinos por Smith y Taylor quienes lo nombraron como *Vibrio fetus* (Smith y Taylor, 1919).

Jones, Orcutt y Little en 1931, identificaron una bacteria en muestras diarreicas de terneros, a la cual denominaron *Vibrio jejuni* y luego en 1948 Doyle denominó a una bacteria similar aislada del intestino de los cerdos como *Vibrio coli* (Son, 2005; Torralbo, 2013).

Sebald y Verón en 1963, propusieron el género *Campylobacter*, que significa “germen curvo” para agrupar a estas bacterias que compartían características morfológicas con el género *Vibrio*, pero que presentaban diferencias importantes como su composición de bases de nucleótidos, metabolismo no fermentativo y requerimientos de una atmosfera de microaerofilia (Silva et al., 2011). A partir de estos años se empezaron a describir otras especies como *Campylobacter nitrofigilis* y *Campylobacter cryaerophilus*, ésta última, capaz de crecer en presencia de oxígeno a 30°C (Neill, Campbell, O'Brien, Weatherup y Ellis, 1985).

En 1991, se aislaron un grupo de bacterias aerotolerantes de humanos y animales con diarrea, sin embargo éstas presentaban diferencias en cuanto a *C. cryaerophilus*, por lo que se propuso una especie nueva, *C. butzleri* (Kiehlbauch, Plikaytis, Swaminathan, Cameron y Wachsmuth, 1991). Tras un estudio por inmunotipificación e hibridación de ADN-ARNr se propuso la formación de un nuevo género llamado *Arcobacter*, el cual agrupaba a estos microorganismos aerotolerantes similares a *Campylobacter* (Vandamme et al., 1991).

En la actualidad la familia *Campylobacteraceae* está conformada por los géneros *Campylobacter*, *Arcobacter* y *Sulfurospirillum*. Son bacilos gramnegativos curvos, que poseen uno o dos flagelos que los hacen altamente móviles, además son capaces de crecer en microaerobiosis, anaerobiosis o aerobiosis en rangos de temperaturas desde los 25°C a 42°C. Son de transmisión zoonótica con una amplia distribución en la

naturaleza, reconociéndose como reservorios naturales una gran variedad de aves y mamíferos (Lastovica, On y Zhang, 2014; Vandamme, Gevers y Debruyne, 2008).

1.2. Género *Arcobacter*

Este género fue propuesto en el año 1991 por Vandamme y colaboradores, un grupo de bacterias consideradas inicialmente como *Campylobacter* fueron reclasificadas debido a determinadas diferencias con este género, como su capacidad para desarrollarse a temperaturas de entre 15°C a 30°C, de crecer en aerobiosis, así como necesitar condiciones de microaerofilia para su aislamiento primario, además inmunoensayos y análisis moleculares permitieron afianzar el surgimiento de un nuevo género dentro de la familia *Campylobacteraceae*, conocido hasta la actualidad como *Arcobacter* (figura 1) (Collado y Figueras, 2011; Vandamme y De Ley, 1991).

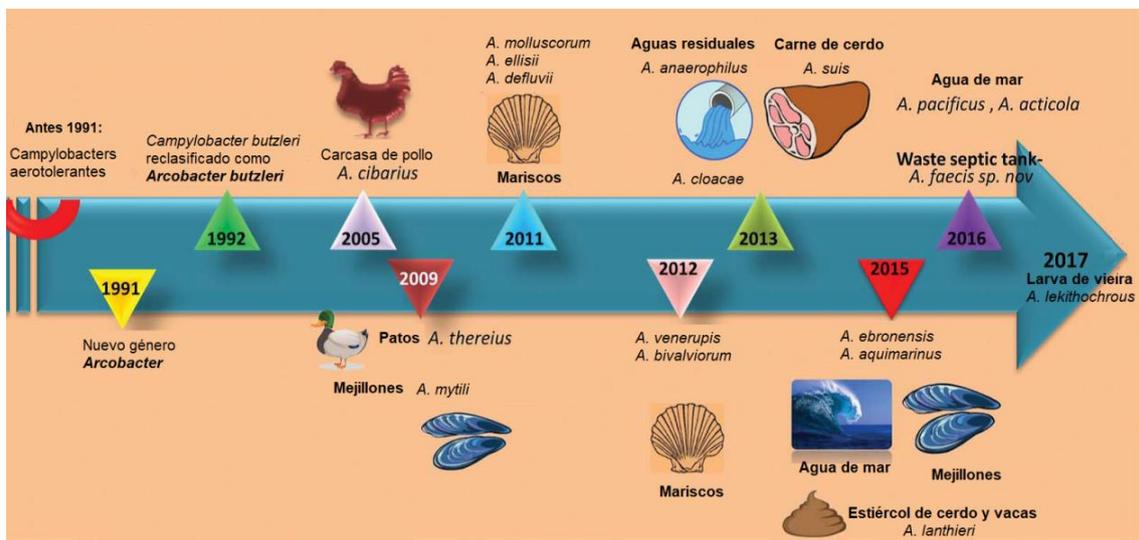


Figura 1. Eje cronológico de la identificación de especies de *Arcobacter*.

Fuente: Tomado y modificado de Ramees et al., (2017)

Elaboración: Autor.

La especie *Campylobacter butzleri* fue reclasificada como *Arcobacter butzleri* y dentro del género se incluyeron otras especies como: *A. cryaerophilus*, *A. nitrofigilis* y *A. skirrowii* (Vandamme et al., 1992).

Hasta el momento el género cuenta con 25 especies, muchas de las cuales han sido recientemente reclasificadas y/o descubiertas (tabla 1). Es un género particular, en el cual se incluyen especies capaces de adaptarse a ambientes extremos; en él se encuentran especies fijadoras de nitrógeno asociadas a plantas marinas, así como una especie (*A. halophilus*) aislada de un ambiente hipersalino. Muchas otras especies se han aislado a partir de heces de animales y humanos con diarrea, así como de alimentos y agua contaminada. Del género las especies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*,

A. skirrowii y *A. cibarius* son consideradas principalmente como patógenos emergentes productores de diarrea que son transmitidos por alimentos (Collado y Figueras, 2011; Vandamme et al., 1991).

Tabla 1. Especies del género *Arcobacter*.

N°	Especie	Origen primer aislamiento	Referencias
1	<i>A. nitrofigilis</i>	Raíces de <i>Spartina alterniflora</i>	(McClung, Patriquin y David, 1983)
2	<i>A. cryaerophilus</i>	Feto bovino abortado	(Neill et al., 1985)
3	<i>A. butzleri</i>	Heces humanas	(Kiehlbauch et al., 1991)
4	<i>A. skirrowii</i>	Heces de ovejas	(Vandamme et al., 1992)
5	<i>Candidatus Arcobacter sulfidicus</i>	Agua de mar costera	(Wirsen et al., 2002)
6	<i>A. cibarius</i>	Carne de pollo	(Houf, Zutter, Verbeke, Hoof y Vandamme, 2003)
7	<i>A. halophilus</i>	Lago hipersalino	(Donachie, Bowman, On y Alam, 2005)
8	<i>A. mytili</i>	Mejillones	(Collado, Cleenwerck, Van Trappen, De Vos y Figueras, 2009)
9	<i>A. thereius</i>	Aborto porcino	(Houf et al., 2009)
10	<i>A. marinus</i>	Agua de mar, algas marinas y estrella de mar	(Kim, Hwang y Cho, 2010)
11	<i>A. trophiarium</i>	Heces de cerdo	(De Smet, De Zutter y Houf, 2011b)
12	<i>A. defluvii</i>	Aguas residuales	(Collado, Levican, Perez y Figueras, 2011)
13	<i>A. molluscorum</i>	Mariscos	(Figueras et al., 2011a)
14	<i>A. ellisii</i>	Mariscos	(Figueras, Levican, Collado, Inza y Yustes, 2011b)
15	<i>A. venerupis</i>	Mariscos	(Levican et al., 2012)
16	<i>A. bivalviorum</i>	Mariscos	(Levican et al., 2012)
17	<i>A. cloacae</i>	Aguas residuales	(Levican, Collado y Figueras, 2013)
18	<i>A. suis</i>	Carne de cerdo	(Levican et al., 2013)
19	<i>A. anaerophilus</i>	Sedimento estuarino	(Sasi Jyothsna, Rahul, Ramaprasad, Sasikala y Ramana, 2013)
20	<i>A. ebronensis</i>	Mejillones	(Levican, Rubio-Arcos, Martínez-Murcia, Collado y Figueras, 2015)
21	<i>A. aquimarinus</i>	Agua de mar	(Levican et al., 2015)
22	<i>A. lanthieri</i>	Estiércol de bovinos y cerdos	(Whiteduck-Léveillé et al., 2015)
23	<i>A. pacificus</i>	Agua de mar	(Zhang, Yu, Wang, Yu y Zhang, 2016)
24	<i>A. acticola</i>	Agua de mar	(Park, Jung, Kim y Yoon, 2016)
25	<i>A. lekithochrous</i>	Larvas de vieira (<i>Pecten maximus</i>) y tanques de agua de mar.	(Diéguez, Balboa, Magnesen y Romalde, 2017)

Fuente: Tomado y modificado de (Ramees et al., 2017).

Elaboración: Autor.

1.2.1. Morfología y crecimiento.

El género *Arcobacter* está formado por bacilos gramnegativos, curvos en forma de “S” itálica, su tamaño oscila entre 0.2 a 0.9 µm de ancho por 1 a 3 µm de largo. Este género se caracteriza por poseer una alta motilidad conferida por la presencia de un

flagelo polar en uno de sus extremos. *Arcobacter* es capaz de crecer en aerobiosis y/o anaerobiosis en un amplio rango de temperaturas que van desde los 15 °C a los 37°C, además estas bacterias en cultivos viejos tienden a perder su forma helicoidal típica y adquieren una forma esférica o cocoide (Vandamme et al., 2008).

1.2.2. Características bioquímicas.

En medio de cultivo sólido el género *Arcobacter* forma colonias que carecen de pigmentación, además son quimioorganótrofas y utilizan una gran variedad de fuentes de carbono como ácidos orgánicos y aminoácidos, pero que a diferencia de muchas otras bacterias éstas no fermentan los carbohidratos (Calvo et al., 2013). Son microorganismos que por lo general producen reacciones de oxidasa y catalasa positivas; en el test de hidrólisis del acetato indoxil y reducción de nitratos también manifiestan positividad, mientras que en pruebas de hidrólisis del hipurato, producción de H₂S en agar hierro triple azúcar (TSI) y prueba de ureasa tienden a ser negativas, a excepción de las especies *A. nitrofigilis*, *A. venerupis*, *A. defluvii* y *A. ebronensis* que son ureasa positiva (Levicán et al., 2015). Por otro lado, las especies de este género toleran un amplio rango de pH que van de 5.5 a 9.5, siendo el pH óptimo para un mejor desarrollo el de 6.8 a 8.0 (Neill, Ellis y O'Brien, 1979).

Debido a que las especies de *Arcobacter* se pueden confundir fácilmente con especies de *Campylobacter*, se realizan pruebas bioquímicas como la fermentación o la oxidación de hidratos de carbono, que pueden ser negativos o variables, sin embargo la mayor diferencia es la baja temperatura y condiciones aeróbicas a las cuales crecen las especies del género *Arcobacter* (Collado y Figueras, 2011).

1.2.3. Principales especies patógenas para el ser humano.

De todas las especies de *Arcobacter* estudiadas, *A. butzleri* es la especie mejor caracterizada y más prevalente, siendo aislada a partir de casos de diarrea en humanos y animales; se ha asociado a cuadros más severos como bacteriemias, septicemias, apendicitis, cirrosis hepática y enteritis (Collado y Figueras, 2011; Engberg, On, Harrington y Gerner-Smidt, 2000; Figueras et al., 2014). Además, se ha encontrado en heces de cerdos, caballos, vacas, avestruces y tortugas, de igual manera en abortos bovinos y porcinos. Esta especie puede hallarse en alimentos, especialmente en productos cárnicos y fuentes de agua (Vandamme et al., 2008; Yan et al., 2000).

A. skirrowii, ha sido aislada de fluidos de los órganos reproductores de toros, de abortos bovinos, ovinos y porcinos, así como de heces diarreicas de ovejas y en cadáveres de aves de corral. Además, esta especie se ha encontrado en casos de diarrea en adultos mayores y en casos de gastroenteritis en adultos y niños (Patyal et al., 2011; Vandamme et al., 2008).

En cuanto a *A. thereius*, esta especie se ha asociado a casos de abortos porcinos, demostrándose que tiene la capacidad de diseminarse por todo el feto y causarle la muerte al afectar importantes órganos como el hígado y los riñones. Esta especie también ha sido aislada a partir de cloacas de patos y en la actualidad no se cuenta con suficiente información (Houf, et al., 2009).

A. cibarius, fue aislada por primera vez durante un estudio donde se evaluó la contaminación por *Arcobacter* en canales de aves de corral. También, ha sido aislada a partir de heces porcinas, ovinas y de abortos porcinos, ovinos y bovinos (Vandamme et al., 2008). Esta especie se aisló en humanos en un paciente que presentaba diarrea crónica, sin embargo no se ha podido confirmar si esta especie fue la causante del cuadro infeccioso (Houf, Lindenburt, Lauwers, Breynaert y Wybo, 2004b).

Finalmente, *A. cryaerophilus*, junto con *A. butzleri* y *A. skirrowii*, tienden a ser las especies más prevalentes de *Arcobacter*, y se ha aislado cepas de casos de bacteriemia y diarrea en humanos, así como en pacientes inmunosuprimidos y personas asintomáticas. También se ha encontrado contaminando carcasas de pollos, cerdos y patos, y se ha asociado a casos de abortos de ganado porcino, ovino y bovino. Además, se ha aislado de muestras fecales de cerdos, caballos, ganado bovino y en casos de mastitis en vacas (Houf y Stephan, 2007; Vandamme et al., 2008).

1.2.4. Reservorios y vías de transmisión.

Las vías de transmisión de las especies de *Arcobacter* son múltiples y de gran complejidad debido a la capacidad de estas bacterias para adaptarse a una gran diversidad de ecosistemas, las rutas mejor descritas son la orofecal y el contacto directo con animales infectados o portadores, así como el consumo de alimentos y fuentes de agua contaminadas (Banting y Figueras, 2017; Ferreira, Queiroz, Oleastro y Domingues, 2015).

Algunas especies del género han sido aisladas a partir de muestras de humanos y de animales, encontrándose principalmente colonizando el tracto intestinal, en órganos reproductivos y en fetos abortados de animales (Vandamme et al., 2008).

Se reconocen como reservorios principales de estas especies a los animales de granja, tales como las aves de corral destinadas para el consumo humano, estudios han reportado con frecuencia el aislamiento de *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* a partir de estos animales, especialmente de la carne y de las carcasas (Banting y Figueras, 2017).

Actualmente numerosos estudios han reconocido a animales de compañía, tales como perros y gatos, como otro reservorio de *Arcobacter* que representa un importante riesgo de adquisición de las bacterias por su cercanía con el ser humano (Goni et al., 2017).

Son varios los estudios que se han realizado en alimentos cárnicos donde se ha encontrado una prevalencia significativa en carne de cerdo, carne de res y carne de pollo, siendo *A. butzleri* la especie más prevalente en pollos con un 83%, en bovinos 16% y porcinos 14% (Ferreira, Fraqueza, Queiroz, Domingues y Oleastro, 2013). La contaminación de productos cárnicos se puede dar por contaminación cruzada de las carnes con heces de los animales durante el faenado (Collado y Figueras, 2011).

Una importante investigación realizada en moluscos bivalvos, se encontró una prevalencia de 40.5%, siendo la especie más prevalente *A. butzleri*, seguida de *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii*, lo que indica que estos mariscos son una posible fuente de transmisión de tipo alimentaria, debiéndose esto en gran medida a que son consumidos cocinados o crudos (Collado, Jara, Vásquez y Telsaint, 2014).

Por otro lado, *A. butzleri* también ha sido aislado a partir de muestras vegetales como lechugas frescas, alimentos considerados como vehículos de diversos patógenos por ser consumidos directamente sin cocción (González y Ferrús, 2011). Además, se ha encontrado que cepas de *A. butzleri* tienen la capacidad de formar biopelículas sobre distintas superficies y de esta manera favorecer su transmisión por alimentos (Ferreira et al., 2013).

Otra posible fuente de contaminación es el agua, la cual actúa como vehículo de estas bacterias. Según algunos reportes, se ha encontrado *A. butzleri* y *A. skirrowii* en muestras de agua potable y muestras de agua de manantiales (Ertas, Dogruer, Gonulalan, Guner y Ulger, 2010). Esto se debe en gran medida a que en el suelo se realiza las deposiciones de los animales, que luego son arrastradas por las lluvias a

fuentes de agua como ríos, acuíferos, etc. conduciendo a una posible fuente de infección para el ser humano (Hsu y Lee, 2015). En la figura 2, se describen las vías de transmisión por las cuales las especies de *Arcobacter* pueden llegar a infectar al ser humano, así como los mecanismos de patogenicidad por los cuales ocasionan un cuadro diarreico.

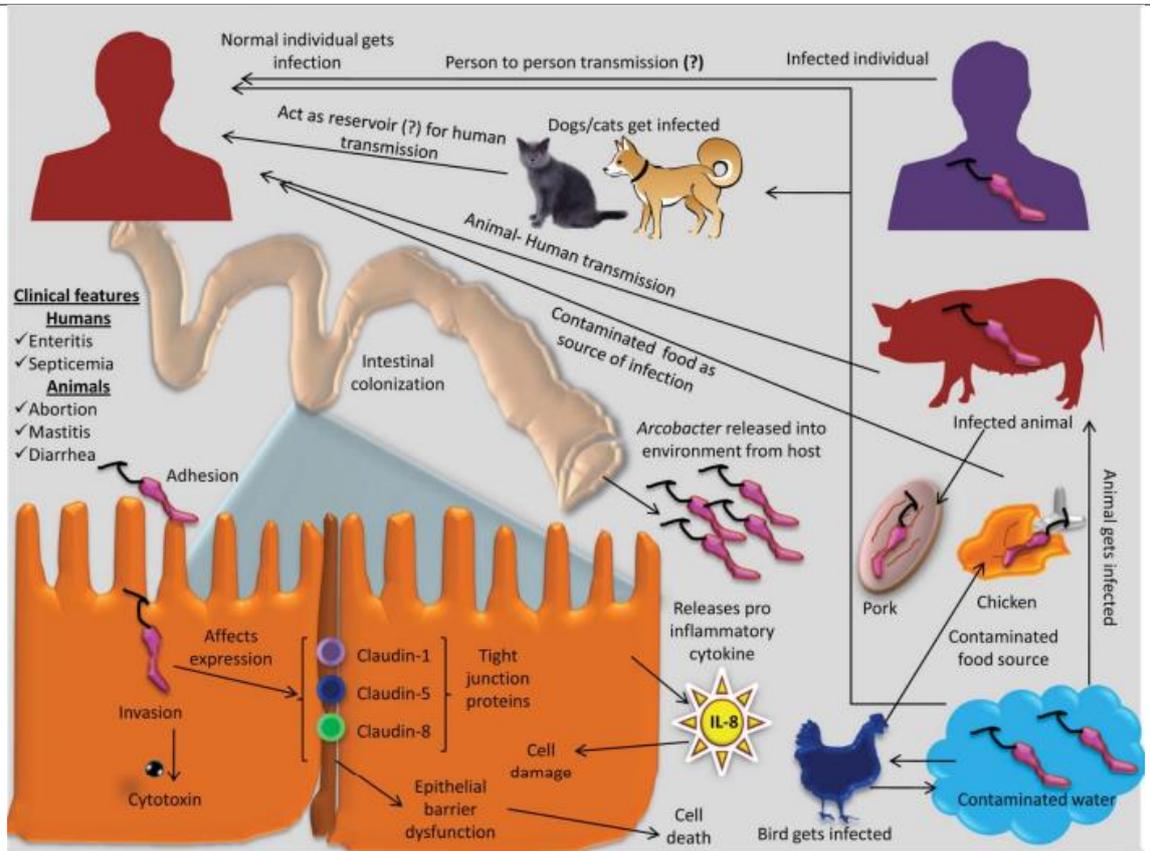


Figura 2. Vías de transmisión y mecanismos de patogenicidad de *Arcobacter* spp. Las bacterias ingresan y colonizan el tracto digestivo, donde puede darse la liberación de citotoxinas que pueden inducir la muerte celular; desregulación de la expresión de proteínas de uniones estrechas tipo Claudina; liberación de citoquinas proinflamatorias; dando como resultado la disfunción de la barrera epitelial y ocasionando una diarrea acuosa. *Arcobacter* es expulsado al medio ambiente a través de las heces, por lo cual puede dispersarse a través de múltiples vehículos hasta infectar nuevos individuos.

Fuente: Ramees et al., (2017).

Elaboración: Autor.

1.2.5. *Arcobacter* en ganado porcino.

El ganado porcino hasta el momento parece ser el reservorio por excelencia de especies de *Arcobacter*, se han aislado nuevas especies del género a partir de heces de cerdos clínicamente sanos, así como de la carne y de aguas residuales de los corrales (Banting y Figueras, 2017; Ho et al., 2006; Levican et al., 2013).

Por otro lado, se ha asociado la presencia de estas bacterias a varias afecciones como abortos, desordenes reproductivos y diarrea en porcinos (Ho et al., 2006; Snelling,

Matsuda, Moore y Dooley, 2006). Estudios han reportado como tasas de prevalencia de *Arcobacter* predominantes aquellas procedentes de heces de porcinos en relación al resto de fuentes analizadas (Patyal et al., 2011). Se ha observado que las tasas de prevalencia de *Arcobacter* encontradas en cerdos antes de su procesado en mataderos son menores, con porcentajes del 43%, que las encontradas luego de su desvisceración, con porcentajes mayores al 95%, producto de la contaminación de la carne con la materia fecal (Van Driessche y Houf, 2007).

En el tracto gastrointestinal de estos animales se pueden encontrar colonizando una gran diversidad de especies de *Arcobacter*, hallándose *A. butzleri* y *A. cryaerophilus* en los aislamientos de todas las secciones gastrointestinales, en comparación con *A. cibarius*, *A. thereius* y *A. skirrowii*, las cuales parecían colonizar determinadas secciones, además de observar que el recto era la sección con mayor diversidad de especies y cepas de *Arcobacter* (Sarah De Smet, De Zutter y Houf, 2012; Inglis, Kalischuk, Busz y Kastelic, 2005). Este fenómeno puede deberse a que estas especies podrían estar adaptadas dependiendo de las condiciones microambientales tales como la tensión de oxígeno, pH, microflora, etc. que se den a lo largo del tracto intestinal, las cuales pueden variar sustancialmente (Inglis et al., 2005).

De todas estas especies, *A. butzleri* parece tener una capacidad de invasión y virulencia mayor al resto, ya que es capaz de atravesar la barrera intestinal e infectar otros órganos del animal (Wesley, Baetz y Larson, 1996), además existen cepas de *A. butzleri* lo suficientemente resistentes para colonizar, multiplicarse y reinfectar al ganado porcino, ya que son capaces de ser excretadas por un tiempo más prolongado en comparación a *A. skirrowii* y *A. cryaerophilus* (Wesley et al., 1996).

1.2.6. *Arcobacter* en ganado bovino.

El ganado bovino es uno de los principales reservorios de estas especies, siendo encontradas con mayor frecuencia *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* (Grove-White, Leatherbarrow, Cripps, Diggle y French, 2014; Van Driessche, Houf, Vangroenweghe, De Zutter y Van Hoof, 2005; Wesley et al., 2000).

Además, se ha observado que la co-colonización con más de una especie de *Arcobacter* es común en estos animales, evidenciándose en algunas investigaciones que las distintas especies presentes al parecer tienen mayor afinidad para colonizar determinadas secciones de tracto gastrointestinal (Inglis et al., 2005), señalando que la transmisión de las bacterias por contaminación cruzada es frecuente en granjas productoras de lácteos, por la presencia de factores tales como los alimentos de los

animales, proceso de ordeño, tanques almacenadores de leche, estaciones de lavado de los animales, etc. (Wesley et al., 2000; Yesilmen, Vural, Erkan y Yildirim, 2014). La transmisión de estas bacterias, al igual que ocurre en otros animales destinados para el consumo humano, también se da al momento de la desvisceración del animal; se han reportado frecuencias de aislamiento del 37% en carne de bovinos luego de la desvisceración siendo los lugares muestreados más contaminados, el pecho y la pierna del animal (De Smet, De Zutter, Van Hende y Houf, 2010).

Normalmente *Arcobacter* spp. coloniza el tracto intestinal de bovinos sin causarle enfermedad, no obstante en algunos casos pueden asociarse a casos de mastitis, diarrea, abortos, etc. (Ho et al., 2006; Snelling et al., 2006).

1.3. Infección por *Arcobacter*

1.3.1. Manifestaciones Clínicas.

La importancia clínica de las especies del género *Arcobacter* radica en que es una bacteria emergente de carácter zoonótico. Donde *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* y *A. thereius* han sido asociadas con enfermedades gastrointestinales, reconociéndose que la diarrea producida por *A. butzleri* tiende a ser acuosa y persistente con dolor abdominal en comparación con la diarrea mucosanguinolenta ocasionada por *Campylobacter jejuni* (Collado y Figueras, 2011). Sin embargo, el papel de estas bacterias no está bien establecido ya que la gravedad clínica de las infecciones por estas especies puede variar desde una diarrea crónica y abundante, a diarreas leves o incluso portadores asintomáticos (Calvo et al., 2013).

A. butzleri y *A. cryaerophilus* se conoce que pueden ser causantes de bacteriemias ya que se han podido aislar de la sangre de pacientes. La infección por *Arcobacter* a humanos afecta principalmente a pacientes con enfermedades crónicas, así como a niños y adultos mayores; también se ha demostrado que pueden ser agentes causales de diarrea del viajero, muy frecuentemente reportada en individuos estadounidenses y/o europeos que han visitado países en vías de desarrollo (Hsueh et al., 1997). De todas ellas *A. butzleri* tiende a ser la más prevalente, seguida por *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* (Samie et al., 2007).

En el caso de animales infectados con estas bacterias, a pesar de que en muchos de ellos está presente como comensal, puede ocasionar daños muy severos como abortos, mastitis y diarrea (Logan, Neill y Mackie, 1982), siendo *A. cryaerophilus* la especie aislada con mayor frecuencia en casos de abortos en animales (De Oliveira,

Baetz, Wesley y Harmon, 1997; On, Harrington y Atabay, 2003); por otro lado, *A. butzleri* se ha vinculado a casos de enteritis y diarrea en cerdos, ganado bovino y caballos, mientras que *A. skirrowii* se asocia más a la producción de diarrea y colitis hemorrágica en ovejas y ganado bovino (Ho et al., 2006a).

1.3.2. Patogenia.

Los mecanismos de patogenicidad y virulencia de las especies de *Arcobacter* aún son poco entendidas y se requiere de mayores estudios sobre este tema. A pesar de ello, se cuenta con cierta información acerca de su capacidad de adhesión, invasión y citotoxicidad de diferentes líneas celulares. Se ha evidenciado que la toxicidad y adherencia son los mecanismos de patogenia expresados por estas bacterias con mayor frecuencia siendo la especies mejor estudiadas *A. butzleri* y *A. cryaerophilus* (Carbone et al., 2003; Ho et al., 2007; Johnson y Murano, 2002; Villarruel-López et al., 2003).

El mecanismo por el cual *Arcobacter* produce diarrea (figura 3) se explica por una disminución en la expresión de proteínas de uniones estrechas llamadas claudinas tipo 1, 5 y 8, dando como resultado una disfunción de la barrera epitelial y muerte por apoptosis de estas células (Bücker et al., 2009). Además, un importante factor de patogenia reconocido en otros géneros (*Campylobacter*, *Helicobacter*) también se expresa en estas bacterias, siendo la estimulación de la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-8) (Ho et al., 2007).

Se ha observado en modelos murinos que la infección por *A. butzleri*, dependiendo de la cepa y del tiempo de incubación, puede inducir una respuesta inmunitaria tanto a nivel del tracto intestinal como a nivel sistémico al ser secretadas diversas interleucinas (IL) por los linfocitos Th 17, implicadas en procesos de regulación de la respuesta inmune durante la arcobacteriosis, ocasionando que los animales no muestren sintomatología, lo que hace pensar que es esta una de las razones por las cuales muchas especies animales pasan a ser portadoras asintomáticas de estas bacterias (Gözl et al., 2015; Heimesaat et al., 2015).

Se han trabajado con cepas de *A. butzleri* en cultivos de células humanas (HT-29/B6) y células epiteliales porcinas (IPEC-J2) y se ha observado una alta tasa de adhesión, invasión y citotoxicidad en las células humanas lo que podría estar implicado en la diarrea ocasionada en humanos, por otro lado, se ha encontrado que las células porcinas son menos susceptibles a *A. butzleri* (Karadas et al., 2016).

También se ha reportado la producción de enterotoxinas por parte de algunas cepas de *Arcobacter* las cuales inducían la formación de vacuolas en cultivos *in vitro* (Villarruel-López et al., 2003).

Cabe mencionar, que se han realizado estudios en los cuales se ha demostrado la expresión de diversos genes posiblemente implicados en la regulación de mecanismos de virulencia de *Arcobacter*. Los genes *cadF* y *cj1349* codifican proteínas de la membrana externa facilitando el contacto directo célula-célula del tracto intestinal por mecanismos de adherencia a fibronectina; el gen *ciaB* participa en procesos de invasión celular; el gen *pldA* codifica la fosfolipasa A de la membrana externa, cuya función es la de hidrolizar puentes acil éster; *tlyA* es un gen implicado en la expresión de hemolisinas; *hecA* es un gen relacionado con la expresión de hemaglutininas (Doudah et al., 2012).

La expresión de estos genes por parte de cepas de *Arcobacter* se la ha considerado como relevante y de interés para futuras investigaciones debido a que estos genes también son expresados por otras bacterias patógenas mejor estudiadas, demostrándose su papel en procesos de adhesión (*cadF*, *HecA* y *cj1349*), invasión (*ciaB*) y lisis de eritrocitos (*tlyA* y *pldA*) (Flanagan, Neal-McKinney, Dhillon, Miller y Konkell, 2009; Ruiz, 2008). No obstante, existen estudios en los cuales las características fenotípicas de invasión y adherencia de *A. butzleri* no mostraron tener relación con la expresión de estos genes de virulencia (Karadas et al., 2013; Levican, Alkeskas et al., 2013).

A. cryaerophilus ha mostrado tener una alta capacidad de invasión celular en animales debido a su capacidad para invadir tanto el tejido intestinal porcino como la placenta pudiendo migrar hacia el feto y ocasionar su muerte; de igual manera que ocurre con otros géneros bacterianos, el proceso invasivo parece ser más eficaz gracias a la presencia de flagelos que aceleran o contribuyen a la colonización de los tejidos (Ho, Lipman, Van Der Graaf Van Bloois, Vanbergen y Gaastra, 2006b).

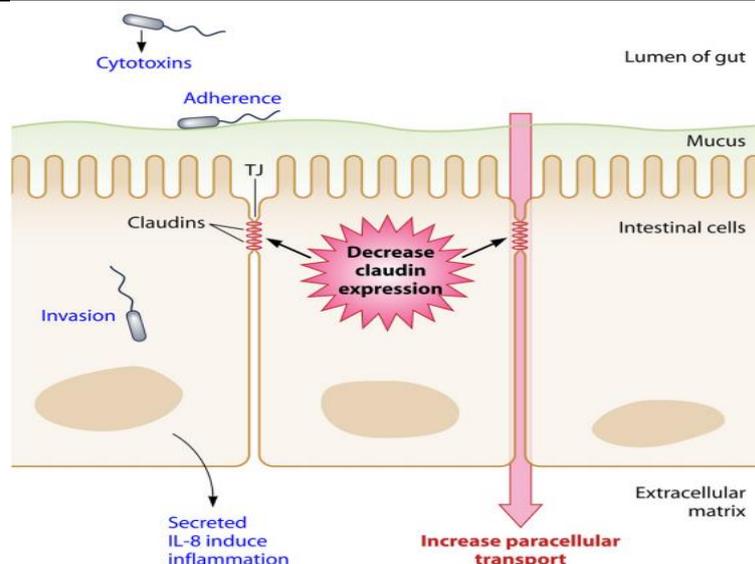


Figura 3. Mecanismos de patogenicidad descritos para *Arcobacter* en células del epitelio intestinal. Uniones estrechas (TJ).

Fuente: Tomado de (Collado y Figueras, 2011).

Elaboración: Autor

1.3.3. Epidemiología.

Los datos epidemiológicos con respecto a *Arcobacter* spp. aún no están bien establecidos ya que es un patógeno emergente, sin embargo se sabe que *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* y *A. thereius* son patógenos entéricos que habitan en el intestino de muchos animales, los cuales actúan como reservorios naturales de estas especies y es por ello que también son consideradas como especies de importancia en la clínica veterinaria (Fernández, Krause y Paz Villanueva, 2004).

Estudios en todo el mundo han reportado aislamientos de estas bacterias a partir de una gran diversidad de animales y otras fuentes, tales como, carnes de origen animal, vegetales y humanos (tabla 2).

Tabla 2. Prevalencia de especies de *Arcobacter*.

Especie	País	Origen	Prevalencia (%)	Referencias
<i>Arcobacter</i> spp.	Japón	Ganado	3.6	(Kabeya et al., 2003)
<i>Arcobacter</i> spp.	Bélgica	Cerdos	44	(Van Driessche, Houf, Van Hoof, De Zutter y Vandamme, 2003)
		Bovinos	39	
		Ovinos	16	
		Equinos	15	
<i>Arcobacter</i> spp.	Bélgica	Cerdos	16 – 85	(Van Driessche et al., 2004)
<i>Arcobacter</i> spp.	Estados Unidos	Bovinos	14.3	(Wesley et al., 2000)
<i>Arcobacter</i> spp.	Reino Unido	Ganado	40	(Merga et al., 2013)
		Ovejas	43	
<i>Arcobacter</i> spp.	Italia	Agua de granja	80	(Giacometti et al., 2015)
<i>A. butzleri</i>	Irán	Ganado	58	(Shirzad, Tabatabaei, Khoshbakht y Raeisi, 2016)
		Ovejas	55	

<i>Arcobacter</i> spp.	India	Cerdos	21	(Patyal et al., 2011)
		Pollos	15	
		Humanos	3	
<i>Arcobacter</i> spp.	México	Carne vaca	28.8	(Villarruel-López et al., 2003)
		Carne de cerdo	51.1	
		Pollos	40	
<i>A. butzleri</i>	Chile	Aves y mamíferos	17.3	(Fernández, Vera y Villanueva, 2007)
<i>Arcobacter</i> spp.	Perú	Humanos	2	(Zerpa et al., 2014)
		Bovinos	25	
		Porcinos	29.2	
		Mariscos	22-24	

Elaboración: Autor

1.4. Diagnóstico clínico

1.4.1. Aislamiento.

El aislamiento de especies de *Arcobacter* se basa en el empleo de métodos de filtración así como el uso de medios selectivos. Normalmente se han utilizado medios de cultivo destinados al aislamiento de *Campylobacter*, sin embargo ya se han desarrollado caldos de enriquecimiento y agares selectivos para *Arcobacter* permitiendo obtener mayores porcentajes de aislamiento. Por otro lado, existen mezclas antibióticas específicas para su aislamiento, permitiendo eliminar la flora microbiana acompañante (Houf, Devriese, De Zutter, Van Hoof y Vandamme, 2001; Vandamme et al., 2008). A nivel de Ecuador y de forma general en Latinoamérica no se cuenta en el sistema de salud pública con protocolos ni metodologías para la búsqueda rutinaria de *Arcobacter*, lo que implica que no exista una inversión en el desarrollo de pruebas rápidas para la detección de estos microorganismos en el laboratorio clínico.

1.4.2. Identificación fenotípica.

Arcobacter presenta una relativa inactividad metabólica que dificulta el uso de pruebas fenotípicas, es por ello que no se realiza de forma rutinaria ya que implica un método laborioso con dificultades de reproductibilidad (Collado y Figueras, 2011). Sin embargo, hay que tener presente que las especies de *Arcobacter* se caracterizan por ser bacilos gramnegativos curvos, con capacidad de crecer en agar sangre, agar MacConkey, caldo cerebro corazón y en medio de triptosa soja, además son oxidasa y catalasa positivas, en la tabla 3 se describen ciertas pruebas según sus características de crecimiento y actividad bioquímica de cinco especies del género que contribuyen a una primera y rápida diferenciación (Bayas, 2016).

Tabla 3. Características bioquímicas y de crecimiento de especies de *Arcobacter*.

Pruebas	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cibarius</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. skirrowii</i>	<i>A. thereius</i>
Condiciones de crecimiento					
2 % NaCl	V	-	V	+	+
4 % NaCl	-	-	-	+	-
1 % glicina	-	-	-	+	+
MacConkey	+	+	V	-	V
Actividad bioquímica					
Actividad catalasa	V	V	+	+	+
Actividad ureasa	-	-	-	-	-
Reducción de Nitratos	+	-	+	+	+
Hidrólisis del indoxil acetato	+	+	+	+	+
Alfa hemólisis	-	-	-	+	V

Datos tomados de: *A. butzleri* (On, 1996), *A. cibarius* (Houf et al., 2005), *A. cryaerophilus* (On, 1996), *A. skirrowii* (On, 1996), *A. thereius* (Houf et al., 2009). Nomenclatura: (+) positivo; (-) negativo; (V): variable.

Fuente: (Lastovica et al., 2014).

Elaboración: Autor.

1.4.3. Identificación molecular.

Debido a la dificultad de encontrar un medio de enriquecimiento apropiado, su lento tiempo de crecimiento, así como la pérdida de cepas por condiciones de estrés, son los principales problemas que se presentan al momento de realizar la detección de estos microorganismos usando medios de cultivo, además puede haber identificaciones erróneas en caso de especies que comparten características morfológicas y de crecimiento similares (Bayas, 2016).

Es por ello que, en los últimos años se han desarrollado un gran número de técnicas moleculares con la finalidad de mejorar la sensibilidad y reducir así el tiempo que conlleva el aislamiento usando medios de cultivo (Collado y Figueras, 2011). Uno de los métodos más usados es el descrito por Houf, Tuteneel, De Zutter, Van Hoof y Vandamme, (2000) quienes desarrollaron una Multiplex-PCR para el gen 16S ARNr de las especies *A. butzleri* y *A. skirrowii* y del gen 23S ARNr de la especie *A. cryaerophilus*.

También, se propuso la Multiplex-PCR para los genes 23S ARNr y *gyrA*, con la capacidad de identificar las 5 especies más prevalentes en humanos y en animales

como es: *A. butzleri*, *A. skirrowii*, *A. cryaerophilus*, *A. cibarius* y *A. thereius* (Doudah, De Zutter, Vandamme y Houf, 2010).

1.5. Tratamiento

Para las infecciones ocasionadas por especies del género *Arcobacter* los antibióticos usados con mayor frecuencia son las fluoroquinolonas que son eficaces para *A. butzleri* y *A. cryaerophilus* (Fera et al., 2003). Otros antimicrobianos usados con frecuencia además de las fluoroquinolonas son las tetraciclinas que se ha mostrado presentan una buena eficiencia frente a estas bacterias (Houf et al., 2004a), Por otra, se debe tener en cuenta que por lo general la enteritis causada por *Arcobacter* suele ser autolimitada sin la necesidad de requerir un tratamiento antimicrobiano (Collado y Figueras, 2011).

1.6. Resistencia bacteriana

En la actualidad no hay criterios establecidos para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana para especies del género *Arcobacter*. Los criterios que se usan para la interpretación de los resultados obtenidos son los definidos por el “Clinical Laboratory and Standards Institute” (CLSI) o el “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST) para *C. jejuni* y *C. coli*.

En un estudio realizado por Abay et al., (2012), se empleó la técnica de difusión en disco para 13 agentes antimicrobianos, donde se encontró que todas las cepas aisladas eran susceptibles a la gentamicina, sin embargo encontraron resistencia a tres o más agentes antimicrobianos y que las cepas de *A. butzleri* aisladas presentaban resistencia a amoxicilina + ácido clavulánico en un 20%, ácido nalidíxico en un 44.28% y ampicilina en un 78.57%.

Un estudio en el cual se evaluó la concentración mínima inhibitoria (CMI) mostró que todas las cepas de *A. butzleri* presentaban sensibilidad a la gentamicina y resistencia del 55.8 % a la ciprofloxacina y del 97.7% a ampicilina, amoxicilina, vancomicina, trimetoprim, piperacilina y cefoperazona (Ferreira et al., 2013).

En un estudio donde se determinó los patrones de susceptibilidad de 50 cepas de *A. butzleri* usando el método de E-test, se ha encontrado sensibilidad de todas las cepas a gentamicina y tetraciclina, así también resistencia del 2% a la eritromicina y del 2% a la ciprofloxacina, además el 90 al 98% de cepas resistentes a la ampicilina y al cloranfenicol (Otth, Wilson, Cancino y Fernández, 2004).

1.6.1. Mecanismos de resistencia.

Las quinolonas son antimicrobianos de amplio espectro a las cuales se han registrado un importante incremento en las tasas de resistencia, estos antibióticos tienen como blanco interferir en la síntesis del ADN, este antibiótico penetra en la pared celular a través de porinas, inhibiendo directamente a dos enzimas, la ADN girasa y la topoisomerasa IV, las cuales son necesarias para realizar el superenrollamiento del ADN, con lo que conduce a la muerte celular por fragmentación cromosómica (Álvarez, Garza y Vázquez, 2015).

Los mecanismos de resistencia a las quinolonas se deben a mutaciones cromosómicas en las regiones determinantes de resistencia a quinolonas (QRDR) de la ADN girasa (*gyrA* y *gyrB*) y topoisomerasa IV (*parC* y *parE*). Las mutaciones en el gen *gyrA* que codifica para la subunidad A de la ADN girasa se encuentra con mayor frecuencia involucrado en la resistencia a estos antimicrobianos en bacterias gramnegativas (Aldred, Kerns y Osheroff, 2014; Álvarez et al., 2015). La Resistencia está dada por la presencia de una mutación en la posición 85 (Thr a Ile) de la proteína GyrA que permite el desarrollo de cepas resistentes a las quinolonas (Abdelbaqi et al., (2007).

1.7. Técnicas moleculares de identificación *Arcobacter* spp.

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

La reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica molecular de reacción *in vitro*, de gran utilidad y especificidad para copiar varias veces una secuencia específica de ADN mediante la catálisis que es llevada a cabo por la enzima ADN-polimerasa. Además, para llevarse a cabo una PCR es necesaria la participación de cebadores o primers (oligonucleótidos de ADN mono-catenario de 15 a 30 nucleótidos) que se unen a una secuencia específica del ADN, permitiendo la amplificación de un gen o parte de uno (Costa, 2004; Tamay de Dios, Ibarra y Velasquillo, 2013).

La PCR se lleva a cabo en tres pasos: desnaturalización, que permite la separación de las dos hebras de ADN; hibridación, en la cual los primers se alinean al extremo 3' del ADN y se forma un complejo templado-primer; Extensión, aquí la Taq polimerasa actúa sobre el complejo agregado dNTPs complementarios para crear cadenas de ADN de la secuencia deseada (Tamay de Dios et al., 2013).

La PCR es una técnica ampliamente usada en el campo microbiológico para la identificación de microorganismos a partir de ADN purificado, así también para la

detección directa de las muestras, sin embargo, esta técnica presenta ciertos inconvenientes como es la presencia de sustancias que inhiban la función enzimática dando como resultado falsos negativos, otro de los inconvenientes es que debido a la alta sensibilidad del método, existe el riesgo de contaminación cruzada entre muestras y producir falsos positivos (Costa, 2004).

1.7.2. Multiplex-PCR.

Este es uno de los métodos más comúnmente usados en la actualidad y fue desarrollado por Houf et al., (2000), donde se diseñaron cinco cebadores dirigidos a los genes ARNr 16S y 23S para la identificación de *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii*.

Utilizando los genes *gyrA* y 16S ARNr, ha permitido identificar 4 especies: *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* y *A. cibarius*, sin embargo aunque el método es específico y rápido el tamaño del fragmento generado son muy similares lo que dificulta la identificación de todas las especies (Pentimalli, Pegels, García, Martín, y González, 2009).

La técnica más empleada para la identificación de especies es la Multiplex-PCR con cinco primers dirigidos hacia el gen 23S ARNr para *A. butzleri*, *A. skirrowii*, *A. thereius* y *A. cibarius*, y 2 primers dirigidos hacia el gen *gyrA* para *A. cryaerophilus*, siendo una herramienta útil y precisa para la identificación a nivel de especie de estos patógenos emergentes, además, el tamaño de los fragmentos generados difieren significativamente el uno del otro lo que hace fácil su interpretación (Doudah et al., 2010) (tabla 4).

Tabla 4. Primers utilizados en la identificación de especies de *Arcobacter* mediante Multiplex-PCR.

Especie	Gen	Tamaño del producto (pb)
<i>A. butzleri</i>	23S ARNr	2061
<i>A. thereius</i>	23S ARNr	1590
<i>A. cibarius</i>	23S ARNr	1125
<i>A. cryaerophilus</i>	<i>GyrasA</i>	395
<i>A. skirrowii</i>	23S ARNr	198

Especies de *Arcobacter* con su gen y tamaño del producto de PCR.

Fuente: (Doudah et al., 2010).

Elaboración: Autor.

1.7.3. PCR en Tiempo Real.

La PCR en Tiempo Real, es una variante de la PCR convencional, la cual solventa el problema de la cuantificación, permitiendo detectar en tiempo real la amplificación de un genoma de interés. Por lo general, se emplean sondas complementarias a una parte intermedia del ADN que se desea amplificar, la sonda que se emplee tiene adherida una molécula fluorescente y una molécula inhibitoria de la fluorescencia o *quencher*, de modo que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del *quencher* y emite fluorescencia, la cual es cuantificada durante cada ciclo de la PCR y será proporcional a la cantidad de ADN amplificado. Esta cuantificación es dada por la comparación con una curva patrón bajo las mismas condiciones (Cultek, 2016).

Se ha empleado esta técnica por su alta sensibilidad y especificidad en la detección directa de especies de *Arcobacter*, a partir de muestras fecales así como de alimentos (De Boer et al., 2013; Ramees et al., 2014).

1.7.4. Espectrometría de masas (MALDI-TOF MS).

Esta técnica se basa en el uso de un Espectrómetro de masas de desorción láser asistida por la matriz por tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS, por sus siglas en inglés), es empleada como una técnica rápida para la identificación de rutina de hongos y bacterias patógenas mediante su perfil proteico al identificarse la molécula mediante la medición de su masa en relación a su carga, así como la de los fragmentos generados a partir de ella (Anhalt y Fenselau, 1975; Seng et al., 2009). Por lo general, el reconocimiento de un microorganismo mediante el uso de MALDI-TOF MS implica la recuperación de una colonia pura, el cual dará siempre el mismo espectro de masas recogido en una base de datos para comparaciones y finalmente el reporte de los resultados. No obstante, una de sus principales desventajas es que el poder discriminatorio puede ser limitado si los perfiles proteicos son muy similares entre microorganismos diferentes, especialmente si no se cuenta con bases de datos amplias (Sauer y Kliem, 2010).

La implementación de este equipo en un laboratorio clínico no requiere de infraestructura especial, pero si de una conexión a internet, así como entrenamiento del personal y conocimiento en espectrometría de masas (Sauer y Kliem, 2010).

A partir del 2008, se ha observado un importante incremento de publicaciones y reportes en el uso de esta técnica en el estudio de bacterias gramnegativas no

fermentadoras aisladas de muestras clínicas humanas (Mellmann et al., 2008). Debe tenerse en cuenta que la aplicabilidad de MALDI-TOF MS es dependiente del número de cepas incluidas en las bases de datos, por lo que si ésta es de mayor alcance la capacidad de identificación de la técnica mejora (Anhalt y Fenselau, 1975; Van Veen, Claas y Kuijper, 2010).

Se ha observado que en el estudio de bacterias fastidiosas o bacilos curvos gramnegativos, como *Campylobacter*, *Arcobacter* y *Helicobacter* las tasas de identificación superan el 94% de eficacia. Por lo que se espera que en futuro, sea empleada no solo con fines taxonómicos, sino también en la detección de determinantes de resistencia bacteriana y factores de patogenicidad (He, Li, Lu, Stratton y Tang, 2010; Van Veen et al., 2010).

1.7.5. Electroforesis en gel de campo pulsatil (EGCP).

Esta técnica permite la separación de fragmentos de ADN de alto peso molecular, los cuales migran a través de una matriz de agarosa concentrada, bajo la influencia de dos campos eléctricos, los cuales no son uniformes en intensidad, sino que cambian alternamente en forma de pulsos (Nassonova, 2008). Las moléculas de ADN de mayor tamaño tenderán a moverse a través de los poros del gel orientándose y quedando atrapadas más tempranamente, mientras que los fragmentos más pequeños continuarán avanzando por el gel (Southern, Anand, Brown y Fletcher, 1987).

Esta técnica se la ha empleado en el monitoreo e investigación epidemiológica bacteriana, particularmente de brotes de origen alimentario, así como en la detección temprana de estos por incremento en la incidencia de algún subtipo implicado en el brote, también en detección de transmisión cruzada, identificación de vías de transmisión y subtipificación bacteriana para estudios de diversidad y evolución genética (Galvão, Chiarini, Destro, Ferreira y Nero, 2012; Krawczyk, Kur, Stojowska-Swedrzyńska y Śpibida, 2016). La EGCP es altamente discriminatoria y se han llevado a cabo un gran número de estudios de bacterias patógenas de gran incidencia a nivel mundial, como lo es *Campylobacter* spp., bacterias muy relacionadas a *Arcobacter* spp. (Behringer, Miller y Oyarzabal, 2011). En el estudio de estas últimas, esta técnica se la ha empleado con fines de estudio de su distribución y diversidad genética de cepas de *Arcobacter* spp. procedentes de origen aviar y de muestras ambientales (Ferreira et al., 2013).

1.7.6. Hibridación fluorescente *in situ* (FISH).

Con el fin de incrementar la eficiencia en los métodos de detección bacteriana, en los recientes años se ha empleado la hibridación con sondas de ARNr, sin necesidad de cultivar las bacterias (Amann, Ludwig y Schleifer, 1995). La hibridación fluorescente *in situ* o FISH por sus siglas en inglés, junto con sondas de oligonucleótidos de ARNr ha sido empleada en la detección e identificación de diferentes microorganismos, incluyendo especies de *Campylobacter* (Moreno et al., 2001).

FISH, es una técnica de rápida detección con la ventaja, a diferencia de la PCR, de que no contiene sustancias inhibitorias de la reacción, también puede ser utilizada conjuntamente con técnicas de PCR (Hernandez, Alonso, Fayos, Amoros y Owen, 1995). Por otra parte, se ha observado que la amplificación directa por PCR en estudio de *Campylobacter* ha generado ciertas dificultades por la presencia de bajos recuentos de células bacterianas en muestras ambientales (Giesendorf et al., 1993), lo que hace necesario procesos de preenriquecimiento y subsecuente purificación del ADN bacteriano para llevar a cabo la PCR (Van Camp et al., 1993). Es así que, algunas investigaciones han empleado esta técnica como complementaria a la PCR directa sobre las muestras, en la detección tanto de *Campylobacter* como de *Arcobacter* (Moreno et al., 2003).

CAPÍTULO II: METODOLOGÍA

2.1. Lugar de muestreo y Población de estudio

El muestreo se realizó en los alrededores de la ciudad de Loja durante los meses de febrero-abril del 2017. Se recolectaron 50 muestras de materia fecal de ganado porcino y bovino (deposiciones recientes). La época de muestreo correspondió a meses de pocas lluvias con temperaturas de entre 18°C a 23°C.

Las condiciones físicas y ambientales en las cuales se encontraban los animales fueron las siguientes: A) porcinos: se tomaron en cuenta todos los rangos de edad (adultos y lechones); todos los animales se encontraban en recintos cerrados (corrales y chancheras) cuya alimentación era a base de balanceado y restos alimenticios; los adultos muestreados permanecían en grupos de 1-3 individuos, mientras que los lechones eran criados en un mismo corral; parte de los cerdos estaban destinados para el consumo humano y otros para la reproducción; no se contó con mayor información sobre las condiciones de crianza de los animales. B) bovinos: se tomaron en cuenta todos los rangos de edad (adultos y terneros); todos los animales se encontraban en recintos al aire libre cuya alimentación era a base de pasto de la zona; parte de la recolección de las muestras se realizó a grupos de 5-8 individuos, mientras que otras fueron recolectadas de animales que se encontraban solos; gran parte de los animales se encontraban habitando conjuntamente tanto con animales domésticos como silvestres; la mayoría de los bovinos muestreados estaban destinados a la producción de leche; no se contó con mayor información sobre las condiciones de crianza de los animales.

Las muestras fueron recolectadas mediante hisopado de las heces y se inocularon en medio de transporte suplementado con mezcla antibiótica de Houf *et al.*, (2001) modificada, enriquecido con extracto de levadura al 1% y sangre al 5% (Anexo 1), las cuales se analizaron en el laboratorio de Microbiología Clínica de la Sección de Genética Humana, Microbiología y Bioquímica Clínica de la Universidad Técnica Particular de Loja.

2.2. Identificación fenotípica de *Arcobacter*

2.2.1. Siembra y Aislamiento.

Las muestras sembradas en el medio de transporte fueron incubadas a 30°C durante 72 horas en aerobiosis. Pasado este tiempo, las muestras fueron filtradas empleándose un filtro de 0.45µm de tamaño de poro, en agar sangre enriquecido con extracto de levadura (Anexo 2), incubándose por 48 a 72 horas a 30°C en aerobiosis.

2.2.2. Identificación morfológica.

Se consideraron como colonias sospechosas aquellas que pasaron el filtro y presentaban características típicas del género, colonias pequeñas grisáceas, brillantes, de bordes lisos y con olor característico. De éstas se tomaron colonias aisladas para la realización de la tinción de Gram modificada y tinción de Hucker, considerándose como supuestos *Arcobacter* la presencia de bacilos curvos en forma de “S” itálica, gramnegativos en la tinción de Gram y de color morado y más gruesos para una mejor visualización con la tinción de Hucker (Anexo 3). Se emplearon cepas puras donadas por la Universidad Austral de Chile pertenecientes a la Colección de Bacterias del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Ghent (Ghent, Bélgica), por sus siglas en inglés (BCCM/LMG) como controles positivos de *A. butzleri* (LMG 10828) *A. cryaerophilus* (LMG 9904) y *A. skirrowii* (LMG 6621).

2.2.3. Identificación mediante pruebas bioquímicas.

A las muestras presuntivas para *Arcobacter* se realizó las pruebas de oxidasa y catalasa, para las cuales son positivas. Finalmente se empleó como prueba el cultivo de las cepas en agar MacConkey para la identificación presuntiva de *A. butzleri*, siendo ésta la especie que mejor se desarrolla sobre este medio de cultivo, el resto de especies pueden presentar crecimiento variable (Anexo 4).

Las cepas fueron sembradas en caldo tioglicolato enriquecido con extracto de levadura por 48 horas (Anexo 5). Las cepas consideradas positivas se criopreservaron a -80°C en glicerol y en dimetil sulfóxido (DMSO) al 10% (Anexo 6).

2.3. Identificación molecular

2.3.1. Extracción de ADN.

De los cultivos puros de las cepas aisladas y de los controles positivos, se realizó la extracción del ADN genómico mediante el uso del kit de Purificación de ADN Genómico Wizard® (Promega) (Anexo 7). El ADN obtenido fue conservado a -8°C.

2.3.2. Multiplex-PCR.

La identificación molecular de especies se realizó mediante PCR según la metodología descrita por Doudah *et al.*, (2010). Se trabajó con un volumen final de reacción de 25µl (Anexo 8). Se empleó 5µl de ADN, 5X Green GoTaq Buffer, 10 mM dNTPs, 25mM MgCl₂, 5U/µl GoTaq Flexi ADNPólimerasa (Promega). Para la identificación a

nivel de especie se amplificaron fragmentos del gen 23S ARNr y del gen *Gyrasa A*, para ello se usaron cebadores a una concentración de 5µM (Invitrogen™) detallados en la tabla 5.

Tabla 5. Identificación de especies de *Arcobacter*.

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

Fuente: (Doudah et al., 2010).
Elaboración: Autor.

La amplificación de los genes se realizó mediante una Multiplex-PCR touchdown, disminuyendo 0.5 °C cada 2 ciclos (tabla 6). Los amplicones generados fueron detectados en un gel de agarosa Ultrapura (Invitrogen™) al 2%, con condiciones de corrida de 120 V, 60 minutos, 300 mA; usándose un marcador de peso molecular de 100pb (Promega) (Anexo 9). Las bandas se visualizaron en un transiluminador UV Enduro™ GDSTOUCH Labnet.

Tabla 6. Condiciones de la Multiplex-PCR touchdown.

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

Fuente: Autor.
Elaboración: Autor.

2.4. Actividad antimicrobiana

2.4.1. Método de Difusión en Disco.

Para la técnica de difusión en disco se probaron 6 antibióticos: Eritromicina (E-15µg); Gentamicina (GM-10µg); Ciprofloxacina (CIP-5µg); Ácido nalidíxico (NA-30µg); Ampicilina (AM-10µg); Tetraciclina (TE-30µg) (Anexo 10).

Se preparó una suspensión en suero fisiológico hasta una turbidez de 0.5 en la escala de McFarland. Posteriormente con un hisopo estéril, se realizó la siembra sobre placas de agar Müller Hinton enriquecido con extracto de levadura al 1% y sangre al 5%.

La interpretación de los resultados se llevó a cabo en base a las recomendaciones del Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad según el SFM y EUCAST, (2017) siguiendo los puntos de corte para *Campylobacter* spp. y enterobacterias ya que, en la actualidad, no se han desarrollado puntos de corte estandarizados para la evaluación de la susceptibilidad de especies de *Arcobacter* (tabla 7). Para ello se midieron los diámetros de cada halo formado alrededor del antibiótico usando un calibrador milimetrado universal.

Tabla 7. Criterios de interpretación de susceptibilidad antimicrobiana.

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

S: sensible; R: resistente.

Fuente: SFM y EUCAST, (2017).

Elaboración: Autor.

Los datos generados durante este estudio fueron analizados mediante estadística descriptiva.

**CAPÍTULO III:
RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

RESULTADOS

3.1. Prevalencia de *Arcobacter* spp. en ganado porcino

En base a las características morfológicas y a los resultados de las pruebas bioquímicas, el 40% (20/50) correspondieron a muestras positivas para *Arcobacter* spp. (tabla 8).

	Nº	%
Muestras positivas	20	40
Muestras negativas	30	60
Total	50	100

Fuente: Autor.
Elaboración: Autor.

3.2. Identificación de especies de *Arcobacter* en ganado porcino

Se confirmó que todas las cepas de estudio pertenecían a especies del género *Arcobacter*. Del total de especies detectadas, el 45.45% (10/22) fueron identificadas como *A. thereius*, el 36.36% (8/22) como *A. skirrowii*, el 13.64% (3/22) como *A. butzleri* y el 4.55% (1/22) se identificó como *A. cryaerophilus* (tabla 9). Además, se encontró que dos de las muestras positivas tenían una co-colonización, pudiéndose identificar dos especies, una de ellas contenía *A. thereius* + *A. butzleri* y la otra poseía *A. thereius* + *A. skirrowii*.

Fuente de las cepas	Especies	Nº	%
Porcinos	<i>A. thereius</i>	10	45.45
	<i>A. skirrowii</i>	8	36.36
	<i>A. butzleri</i>	3	13.64
	<i>A. cryaerophilus</i>	1	4.55
	Total	22	100

Fuente: Autor.
Elaboración: Autor.

En la figura 4, se muestra la amplificación de los fragmentos esperados para la identificación de *A. butzleri*, *A. thereius*, *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* mediante Multiplex-PCR de acuerdo a los descrito por Doudah et al., (2010).

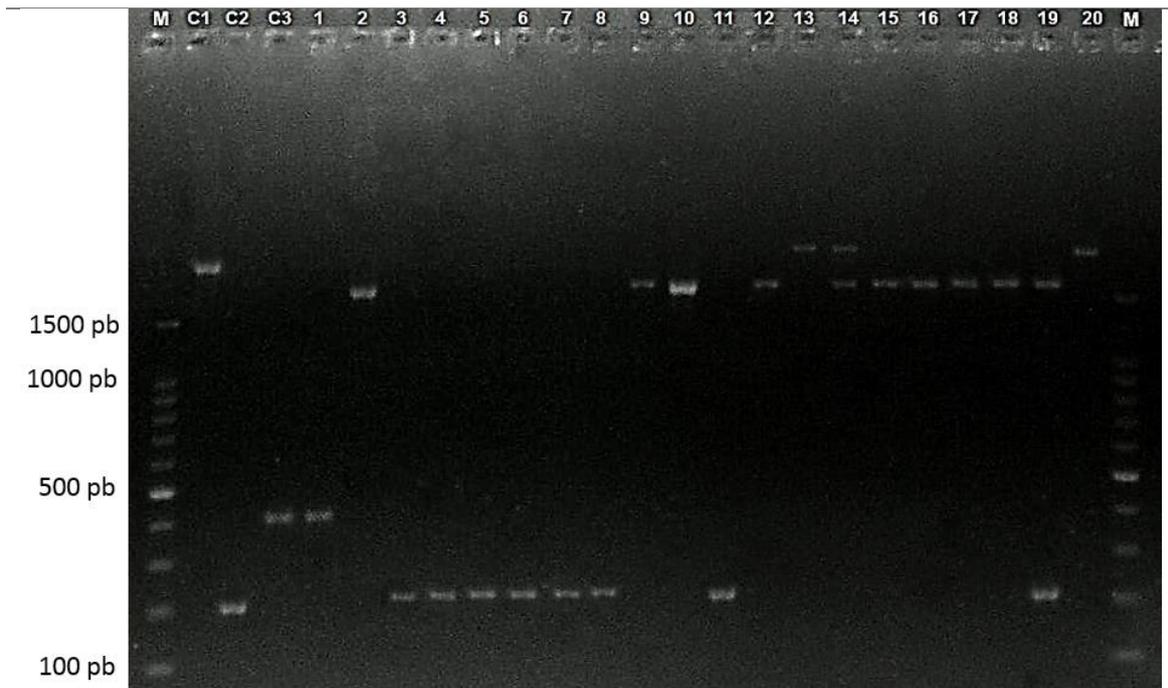


Figura 4. Identificación molecular de especies de *Arcobacter* mediante múltiplex-PCR en porcinos. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, a la izquierda se muestran las bandas de los controles positivos empleados, C1: *A. butzleri* (2061 pb); C2: *A. skirrowii* (198 pb); C3: *A. cryaerophilus* (395 pb); los carriles (1-20) corresponden a las muestras. M: marcador de peso molecular de 100pb. Muestras 14 y 19 se observa una co-colonización por dos especies.

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

3.3. Actividad antimicrobiana de 6 antibióticos frente a *Arcobacter* spp. en ganado porcino

Como se observa en la figura 5, la frecuencia más alta de resistencia para *Arcobacter* spp. fue observada para ciprofloxacina 54.55%, ácido nalidíxico 50%, ampicilina 27.27% y tetraciclina 27.27%, mientras que para gentamicina y eritromicina los porcentajes de resistencia fueron del 9.09% y 4.54% respectivamente. Además, se encontraron perfiles de multirresistencia (resistencia a 3 o más antibióticos) en el 27.27% (6/22), de las cuales 2 mostraron resistencia a ciprofloxacina, tetraciclina y ácido nalidíxico, 1 presentó resistencia a gentamicina, ciprofloxacina, tetraciclina y ácido nalidíxico, 1 mostró resistencia a gentamicina, ampicilina, tetraciclina y ácido nalidíxico, 1 mostró resistencia a ciprofloxacina, ampicilina y ácido nalidíxico y 1 mostró resistencia a ciprofloxacina, ampicilina, tetraciclina y ácido nalidíxico.

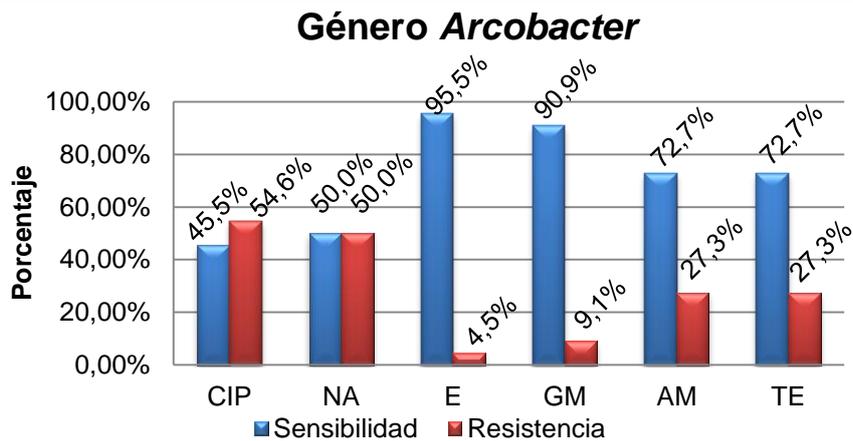


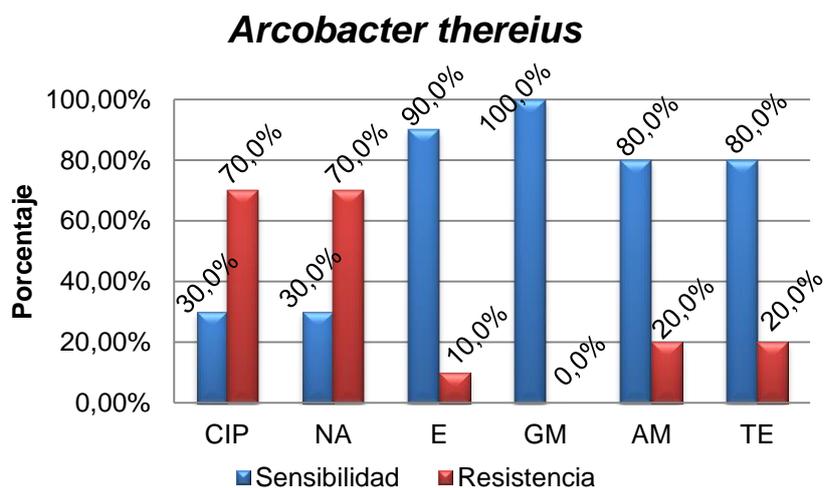
Figura 5. Actividad antimicrobiana del género *Arcobacter* en porcinos.

Fuente: Autor.

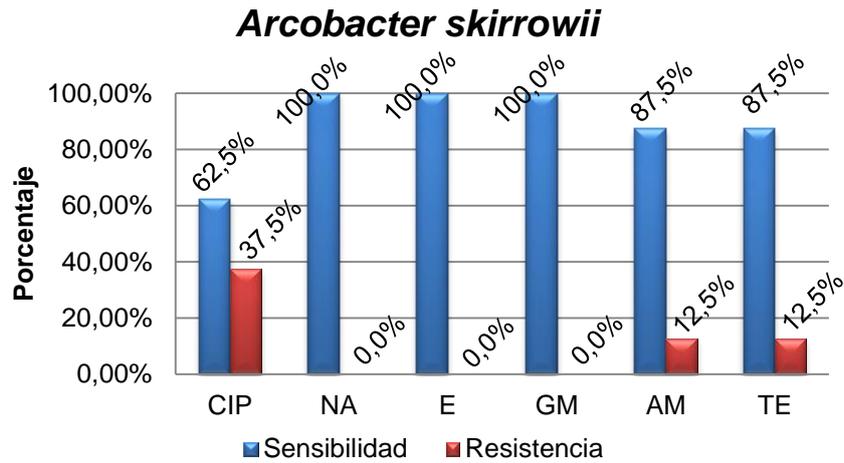
Elaboración: Autor.

De las 4 especies de *Arcobacter* aisladas a partir de muestras fecales de porcinos (figura 6), el grupo de *A. thereius* mostró mayor resistencia a ciprofloxacina y ácido nalidíxico con un 70%, siendo menor para la tetraciclina y ampicilina con un 20% y eritromicina con un 10%. En el grupo de *A. skirrowii* se obtuvo resistencia a ciprofloxacina con un 37.50%, a ampicilina y tetraciclina con un 12.50%. Cepas de *A. butzleri* mostraron resistencia al ácido nalidíxico y a la ampicilina en un 100% y frecuencias de resistencia a la ciprofloxacina, gentamicina y tetraciclina del 33.33%. Finalmente, la única cepa aislada de *A. cryaerophilus* fue resistente a la ciprofloxacina, ácido nalidíxico, gentamicina y tetraciclina.

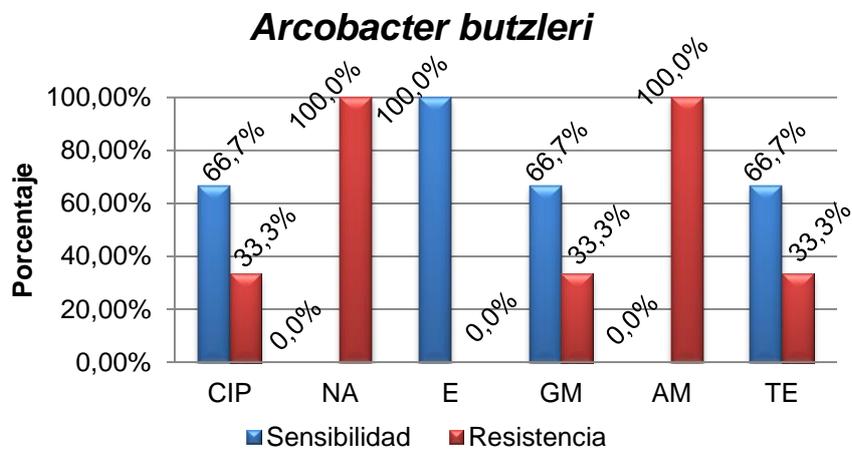
A



B



C



D

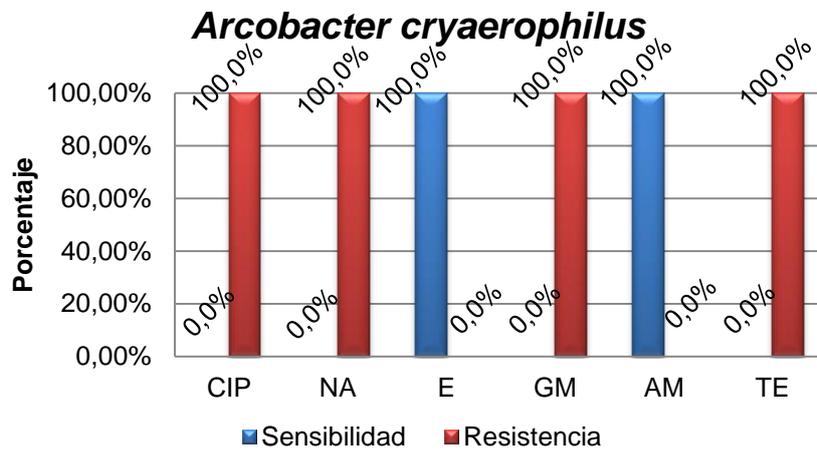


Figura 6. Actividad antimicrobiana de seis antibióticos frente a especies de *Arcobacter* identificadas en porcinos. A: *Arcobacter thereius*, B: *Arcobacter skirrowii*, C: *Arcobacter butzleri*, D: *Arcobacter cryaerophilus*.

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

3.4. Prevalencia de *Arcobacter* spp. en ganado bovino

De acuerdo a las características morfológicas y a los resultados de las pruebas bioquímicas, el 62% (31/50) de las muestras fueron positivas para *Arcobacter* spp. (tabla 10).

Tabla 10. Prevalencia de especies de *Arcobacter* en bovinos.

	Nº	%
Muestras positivas	31	62
Muestras negativas	19	38
Total	50	100

Fuente: Autor.
Elaboración: Autor.

3.5. Identificación de especies de *Arcobacter* en ganado bovino

Se confirmó que todas las cepas de estudio pertenecían a especies del género *Arcobacter* mediante la técnica Multiplex-PCR. Del total de especies detectadas, el 72.22% (26/36) se identificaron como *A. butzleri*, el 16.67% (6/36) como *A. cryaerophilus* y el 11.11% (4/36) como *A. skirrowii* (Tabla 11). Además, se encontró que 5 de las muestras presuntivas tenían una co-colonización por dos especies, tres de ellas contenían *A. butzleri* + *A. cryaerophilus* y las dos restantes contenían *A. butzleri* + *A. skirrowii*.

Tabla 11. Especies de *Arcobacter* identificadas mediante Multiplex-PCR.

Fuente de las cepas	Especies	Nº	%
Bovinos	<i>A. butzleri</i>	26	72.22
	<i>A. cryaerophilus</i>	6	16.67
	<i>A. skirrowii</i>	4	11.11
	Total	36	100

Fuente: Autor.
Elaboración: Autor.

En la figura 7, se muestra la amplificación de los fragmentos esperados para la identificación de *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* mediante Multiplex-PCR de acuerdo a los descrito por (Doudah et al., 2010).

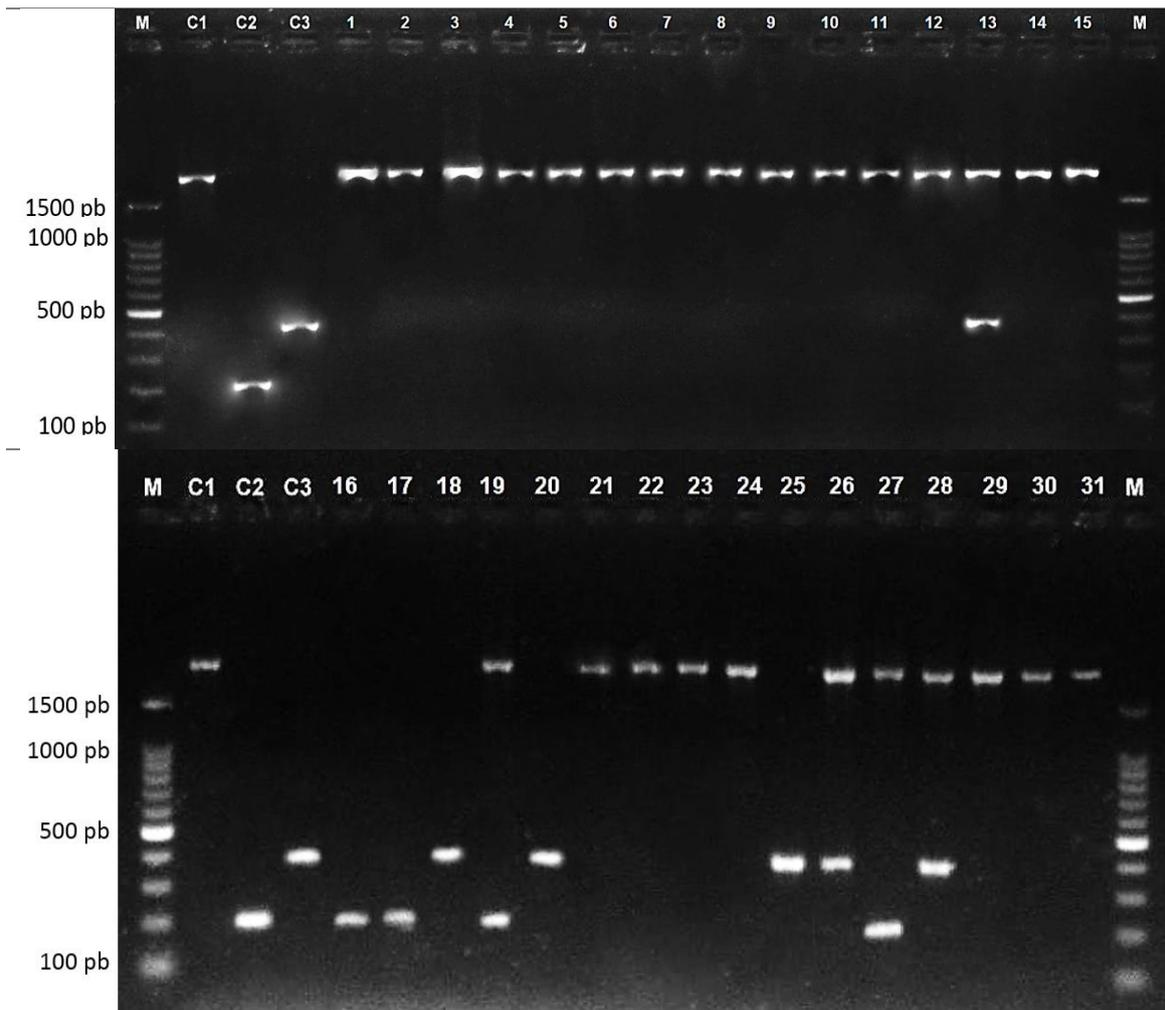


Figura 7. Identificación molecular de especies de *Arcobacter* mediante Multiplex-PCR en bovinos. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, a la izquierda se muestran las bandas de los controles positivos empleados, C1: *A. butzleri* (2061 pb); C2: *A. skirrowii* (198 pb); C3: *A. cryaerophilus* (395 pb); los carriles (1-15 y 16-31) corresponden a las muestras. M: marcador de peso molecular de 100pb. Muestras 13, 19, 26, 27 y 28 se observa una co-colonización por dos especies.

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

3.6. Actividad antimicrobiana de 6 antibióticos frente a *Arcobacter* spp. en ganado bovino

La frecuencia más alta de resistencia para *Arcobacter* spp. en aislamientos de ganado bovino (figura 8) fueron observadas para tetraciclina con un 69.44% y ácido nalidíxico y ampicilina con un 66.67%, mientras que para la eritromicina, ciprofloxacina y gentamicina los porcentajes de resistencia fueron del 25%, 11.11% y 2.78% respectivamente. Además, se encontraron perfiles de multirresistencia (resistencia a 3 o más antibióticos) con un 63.89% (23/36), de las cuales 11 mostraron resistencia a ampicilina, tetraciclina y ácido nalidíxico, 7 presentaron resistencia a eritromicina, ampicilina, tetraciclina y ácido nalidíxico, 3 mostró resistencia a ciprofloxacina,

ampicilina, tetraciclina y ácido nalidíxico y 2 cepas mostraron resistencia a 5 de los 6 antibióticos probados, una de ellas fue sensible a la ciprofloxacina, mientras que la otra lo fue a la gentamicina.

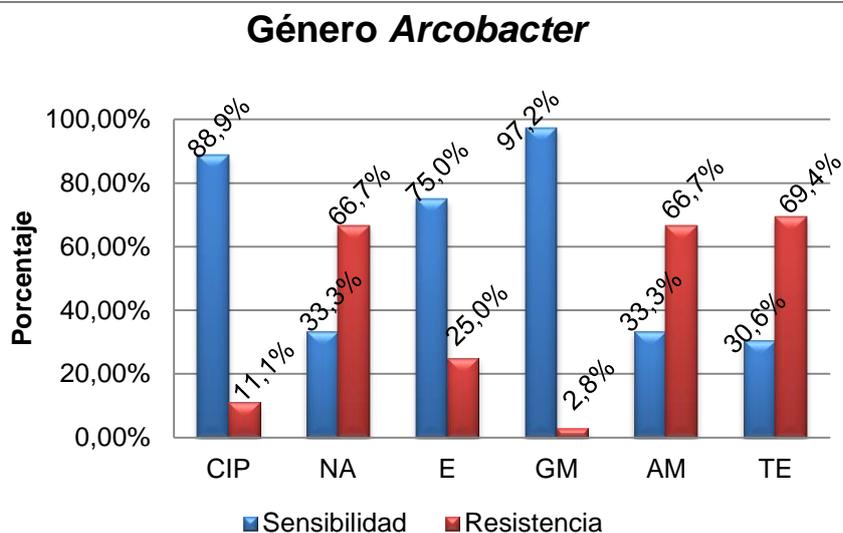


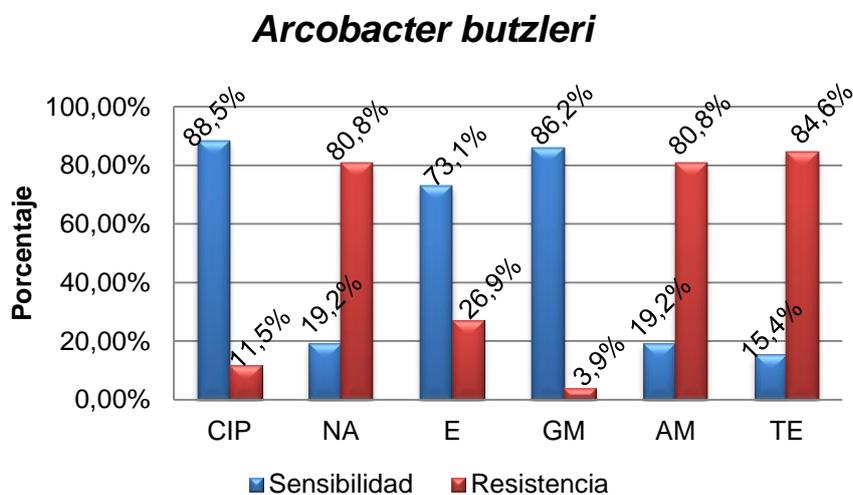
Figura 8. Actividad antimicrobiana del género *Arcobacter* en bovinos.

Fuente: Autor.

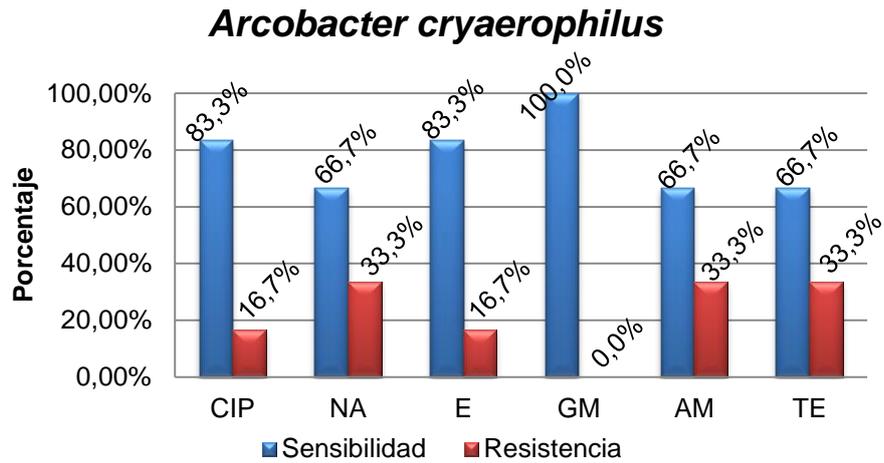
Elaboración: Autor.

De las 3 especies de *Arcobacter* aisladas a partir de muestras fecales de bovinos (figura 9), el grupo de *A. butzleri* mostró mayor resistencia a tetraciclina con un 84.62%, seguido del ácido nalidíxico y ampicilina con un 80.77%, siendo menor para eritromicina con un 26.92%, ciprofloxacina con un 11.54% y gentamicina con un 3.85%. En el grupo de *A. cryaerophilus* se obtuvo resistencia al ácido nalidíxico, ampicilina y tetraciclina en un 33.33% y una frecuencia de resistencia a ciprofloxacina y eritromicina del 16.67%. Cepas de *A. skirrowii* mostraron resistencia al ácido nalidíxico, eritromicina, ampicilina y tetraciclina en un 25%.

A



B



C

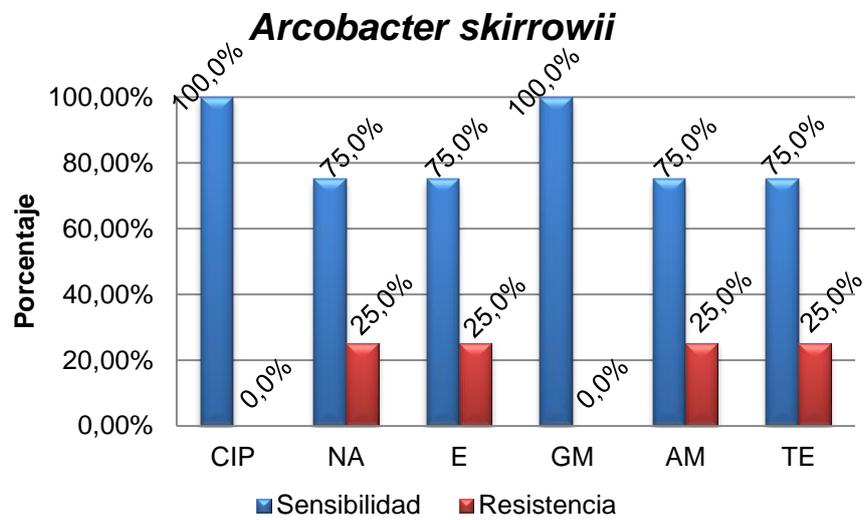


Figura 9. Actividad antimicrobiana de seis antibióticos frente a especies de *Arcobacter* identificadas en bovinos. A: *Arcobacter butzleri*, B: *Arcobacter cryaerophilus*, C: *Arcobacter skirrowii*.

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

DISCUSIÓN

En los últimos años *Arcobacter* spp. ha sido reconocido como un patógeno emergente de carácter zoonótico en todo el mundo, según la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF), estas bacterias representan un serio problema para el sistema de salud pública, debido a que se transmiten principalmente por alimentos (Ramees et al., 2017).

A nivel de Latinoamérica, los reportes sobre especies de *Arcobacter* como agentes infecciosos en humanos y como comensal en animales, hoy en día son escasos (Zerpa et al., 2014). Sin embargo, en Europa existen datos que indican que *Arcobacter* spp. constituye el cuarto lugar en tasas de aislamientos entre los miembros de la familia *Campylobacteraceae* aisladas a partir de muestras fecales (Prouzet-Mauléon, Labadi, Bouges, Ménard y Mégraud, 2006; Olivier Vandenberg et al., 2004).

En el presente trabajo, se evaluó la presencia de especies de *Arcobacter* (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*, *A. thereius* y *A. cibarius*) en muestras fecales de ganado porcino y bovino, cuya prevalencia fue del 40% y del 62% respectivamente. La especie más frecuentemente detectada en muestras de porcinos fue *A. thereius* con un 45.45%, seguida de *A. skirrowii* con un 34.64%, *A. butzleri* en un 13.64% y *A. cryaerophilus* en un 4.55%. Trabajos realizados en países latinoamericanos muestran resultados similares a los obtenidos en la presente investigación. Zerpa et al., (2014), reportaron una prevalencia de *Arcobacter* spp. del 29.2%, siendo *A. butzleri* la especie más frecuentemente aislada con un 26%, seguida de *A. skirrowii* con un 3.1%; datos más actuales realizados en Chile, muestran una prevalencia de *Arcobacter* spp. en heces de cerdos del 59.5%, aislándose como especie más prevalente *A. butzleri* (40.7%), seguida de *A. cryaerophilus* (9.6%) (Fernández, Villanueva, Mansilla, Gonzalez y Latif, 2015); por otro lado, en muestras de carne de cerdo Villarruel-López et al., (2003), reporta una prevalencia de *Arcobacter* spp. del 51.1%, con porcentajes mayores al 80% de aislamientos de *A. butzleri*, detectándose en menores proporciones *A. skirrowii* y *A. cryaerophilus*.

Por otro lado, estudios en Bélgica indicaron una tasa de aislamiento de especies de *Arcobacter* del 43.9% y 59.85% (Van Driessche et al., 2004, 2003). De Smet et al., (2011a), aportan un dato interesante al ser el primer estudio en el cual se pudo identificar *A. thereius* a partir de muestras fecales de cerdos. La frecuencia de aislamiento de *Arcobacter* spp. fue del 76.67%, identificándose 4 especies (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* y *A. thereius*), interesantemente, *A. thereius* fue la

especie más prevalente en dos de las granjas muestreadas (granja A: 17.73% y granja B: 30.46%), mientras que *A. butzleri* lo fue en las otras dos granjas (granja C: 16.54% y granja D: 72.63%). Estos últimos datos sobre la prevalencia de *A. thereius*, son importantes ya que solo se contaba con información de Houf et al., (2009), al ser aislada por primera vez a partir de hígados y riñones de abortos espontáneos de porcinos, constituyendo el presente estudio el segundo trabajo en el cual se ha podido identificar esta especie en muestras fecales de cerdos, y representa el primer estudio de *Arcobacter* a nivel de Ecuador. La prevalencia de esta especie, es muy probable que haya pasado desapercibida en investigaciones anteriores debido a que es reciente su descubrimiento y por ende no ha sido incluida como una especie de interés en numerosos trabajos.

Estudios realizados en la India muestran prevalencias del 12% al 25.33% de *Arcobacter* spp., siendo la especie más prevalente *A. butzleri*, seguida de otras especies como *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* (Mohan et al., 2014; Patyal et al., 2011). En Japón, Kabeya et al., (2003), aislaron a partir de heces de cerdos *Arcobacter* spp. (10%) y de hisopados vaginales de cerdas aislaron *Arcobacter* spp. (13.3%), siendo nuevamente *A. butzleri* la especie más común, seguida de *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii*.

Cabe mencionar, que la co-colonización por más de una especie de *Arcobacter* en un mismo individuo en muestras fecales de cerdos está bien documentada, observándose por lo general, la presencia de dos o tres especies simultáneamente (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii*) (Fernández et al., 2015; Ho et al., 2006b; Kabeya et al., 2003; Patyal et al., 2011; Van Driessche et al., 2003). Recientemente, se ha reportado una co-colonización de *A. thereius* con otras tres especies de *Arcobacter*, dato importante ya que en este trabajo se encontró la presencia de co-colonizaciones entre *A. thereius* + *A. butzleri* y *A. thereius* + *A. skirrowii* (De Smet et al., 2011a).

La elevada prevalencia de *Arcobacter* spp. y la gran variedad de especies encontradas colonizando estos animales, manifiesta que existen múltiples vías de transmisión, algunas de las cuales han podido ser descritas por ciertos autores. Ho et al., (2006b), realizaron un estudio en muestras rectales de cerdas preñadas y sin preñar, en el cual se encontró una prevalencia del 42% de especies de *Arcobacter*. Los autores, pudieron confirmar la transmisión vertical (congénita) por vía transplacental, al detectar con mayor frecuencia *A. cryaerophilus* en el líquido amniótico de las madres y en los recién nacidos, además de sugerir que esta especie es más invasiva en el hospedero que el resto de especies del género. En cuanto a la transmisión horizontal, ésta se

evidenció en los lechones a las 3 semanas de nacidos, por una mayor prevalencia de *A. skirrowii* y *A. butzleri*, adquiridas por contaminación fecal de la madre u otros cerdos infectados. El fenómeno de intermitencia de detección de dichas especies fue común, muy probablemente debido a la reinfección de las cerdas y lechones (Ho et al., 2006b; Hume et al., 2001). Se sugiere que la presencia de anticuerpos contra *Arcobacter* spp. en el calostro, interviene en el proceso de colonización e infección por parte de las bacterias adquiridas congénitamente en los lechones durante los primeros días de nacidos; los niveles de anticuerpos tienden a disminuir a las pocas semanas paulatinamente, mientras el sistema inmunológico de los lechones aún está en etapa de desarrollo, por lo que son susceptibles de reinfectarse por otras especies de *Arcobacter* (Ho et al., 2006b).

En este trabajo también se identificó en muestras fecales de bovinos, una prevalencia de *Arcobacter* spp. del 62%, con mayor frecuencia de *A. butzleri* correspondiendo al 72.22%, seguida de *A. cryaerophilus* con un 16.67% y *A. skirrowii* con un 11.11%. A nivel de Latinoamérica, se han reportado algunos datos de prevalencia de *Arcobacter* spp. en heces de bovinos. Fernández et al., (2007) en Chile reportan una prevalencia del 17.3% de *A. butzleri* aislada de diferentes animales, constituyendo el 25% únicamente de muestras fecales procedentes de bovinos. Datos más actuales en Perú y Chile, muestran tasas de frecuencia de aislamiento de *Arcobacter* del 25% al 37%, encontrándose *A. butzleri* en porcentajes mayores al 20%, seguido de *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* en menores porcentajes (Fernández et al., 2015; Zerpa et al., 2014).

La alta prevalencia de *Arcobacter* spp. observada en los tractos intestinales y muestras fecales en los animales de granja y en productos cárnicos, apoya la hipótesis de que los alimentos constituyen una de las principales vías de transmisión (Patyal et al., 2011). Por este motivo, se han realizado algunos estudios en alimentos de origen bovino tales como carnes y productos lácteos, encontrándose prevalencias de *Arcobacter* spp. del 29% al 56%, siendo la especie más prevalente *A. butzleri*, además de evidenciarse la presencia de una gran diversidad de especies de este género (Córdoba, Redondo, Castro y Arias, 2017; Villarruel-López et al., 2003; Yesilmen et al., 2014).

Datos europeos sobre la prevalencia de *Arcobacter* spp. muestran porcentajes del 36% en Turquía (Yesilmen et al., 2014), del 39.2% en Bélgica (Van Driessche et al., 2003) y del 41.7% en España (Vilar et al., 2010) en muestras fecales de bovinos. En años posteriores Van Driessche et al., (2005), obtuvieron frecuencias de *Arcobacter*

según las edades de los bovinos, mostrando los siguientes resultados; un 15% en vacas lecheras, un 11% en bovinos jóvenes y un 27.13% en terneros, siendo estos porcentajes menores a los obtenidos por los mismos autores anteriormente, además *A. cryaerophilus* fue la especie más prevalente, seguido de *A. skirrowii* y *A. butzleri*. Otros trabajos en los cuales se han tenido en cuenta las edades de los animales, se ha observado que no existen diferencias significativas entre estos grupos y la infección por estos patógenos (Shah et al., 2012). Existen estudios en países orientales en los cuales se han obtenido frecuencias de aislamientos de *Arcobacter* spp. del 7% en Malaysia (Shah et al., 2012), un 10% en la India (Mohan et al., 2014) y un 12% en Irán (Shirzad et al., 2016), siendo *A. butzleri* la especie más prevalente. Un estudio realizado en Japón, identificaron *A. butzleri* en un 83.33% y *A. cryaerophilus* en un 16.64% de las muestras positivas (Kabeya et al., 2003). Estos datos son comparables a los obtenidos en este trabajo, donde se encontró *A. butzleri* en un 72.22% y *A. cryaerophilus* en un 16.67% de las muestras positivas.

La co-colonización con varias especies de *Arcobacter* en muestras de bovinos se ha encontrado con frecuencia en diversas investigaciones, hallándose la presencia de 2 o más especies en un mismo individuo, con porcentajes del 26 al 50% (Shah et al., 2012; Van Driessche et al., 2005), donde la mayoría reporta co-colonizaciones entre *A. butzleri* y *A. cryaerophilus* (Aydin, Gümüşsoy, Atabay, Iça y Abay, 2007; Fernandez et al., 2015; Serraino et al., 2013; Shirzad et al., 2016). En este estudio la presencia de co-colonización representó el 16.1% del total de muestras positivas, encontrándose *A. butzleri* + *A. cryaerophilus* (9.67%) y *A. butzleri* + *A. skirrowii* (6.45%).

Es importante mencionar, que estudios han demostrado que las tasas de aislamiento de las diferentes especies de *Arcobacter* independientemente del reservorio, puede variar considerablemente según la metodología de aislamiento empleada; se ha observado que el cultivo directo de las heces permite identificar co-colonizaciones, mientras que el empleo de métodos de enriquecimiento disminuyen la probabilidad de encontrar co-colonizaciones, pero es posible obtener frecuencias de aislamiento probablemente más reales, quizás explicado por el hecho de que el desarrollo de una de las especies se vea más favorecido (Van Driessche et al., 2005).

Según datos reportados por algunos autores, la prevalencia de especies de *Arcobacter* en heces de cerdos y bovinos tiende a ser más baja que la prevalencia de especies de *Campylobacter* aisladas de este mismo tipo de muestras (Fernández et al., 2015; Fernández, 2011; Fernández et al., 2007). En este estudio, los datos de prevalencia de *Arcobacter* spp. correspondieron al 40% en heces de cerdos y al 62% en heces de

bovinos, siendo mayores a los reportados por Chamba, (2016), en su estudio sobre la prevalencia de *Campylobacter* spp. en muestras fecales de porcinos y bovinos con un 15% y 27% respectivamente. Por otro lado, Serraino et al., (2013), también evidenciaron que *Arcobacter* spp. fue más prevalente que especies de *Campylobacter*, con un 57.1% y un 35.7% respectivamente, aisladas a partir de muestras tomadas en granjas productoras de lácteos.

Por todo lo expuesto, es evidente que los bovinos son de gran importancia como portadores sanos de especies de *Arcobacter*, permitiendo asegurar que se trata de un reservorio natural (Ramees et al., 2017).

Los resultados obtenidos del test de susceptibilidad mediante difusión en disco, mostraron que todas las especies aisladas tanto de ganado porcino como bovino, presentaron resistencia al menos a uno de los seis antibióticos probados. Cabe destacar, que no se cuenta con tests de susceptibilidad estandarizados para *Arcobacter* spp., por lo que se han empleado pruebas como E-test, dilución en agar, difusión en disco o microdilución en caldo, aportando algunos datos sobre los perfiles de susceptibilidad de algunas cepas de *A. butzleri* (Fera et al., 2008; Otth et al., 2004; Olivier Vandenberg et al., 2004).

En el presente estudio, se halló una resistencia mayor al 50% para ciprofloxacina y ácido nalidíxico en ganado porcino, se observó un 27.33% de resistencia a tetraciclina y porcentajes menores al 10% a gentamicina y eritromicina, sorprendentemente se registró un 73% de sensibilidad a ampicilina. Por otro lado, en cepas procedentes de ganado bovino se observó una mayor frecuencia de resistencia a la tetraciclina, al ácido nalidíxico y ampicilina mayores al 60%; también se observó un porcentaje de resistencia considerable a eritromicina del 25%, siendo los antibióticos que mostraron mayores tasas de sensibilidad la ciprofloxacina y gentamicina con un 88.89% y 92.22% respectivamente. En estudios realizados en el 2014, se encontraron que las cepas de *Arcobacter* spp. presentaban sensibilidad a la mayoría de los antibióticos probados en este estudio: gentamicina, ciprofloxacina, eritromicina y tetraciclina, pero evidenciándose mayores tasas de resistencia a ampicilina con un 60.6% y al ácido nalidíxico con un 22.5% (Mohan et al., 2014; Rahimi, 2014). Para el año 2016, se han reportado tasas de resistencia a eritromicina y ciprofloxacina mayores al 20% y a ampicilina un 91%; la gentamicina y tetraciclina continuaron siendo los antibióticos que mostraron mayor eficacia contra las especies de *Arcobacter* (Van den Abeele, Vogelaers, Vanlaere y Houf, 2016). Córdoba et al., (2017), encontraron que todas las cepas presentaban resistencia a ampicilina, ácido nalidíxico y ciprofloxacina.

Con estos antecedentes, se puede observar que las tasas de resistencia de estos antibióticos de uso común tanto en clínica veterinaria como humana, han ido en aumento especialmente para la ciprofloxacina, ampicilina y ácido nalidíxico, pero que además se han detectado indicios de resistencia a antibióticos como la tetraciclina, gentamicina y eritromicina considerados como primera línea en el tratamiento de múltiples infecciones, incluidas las causadas por miembros de la familia *Campylobacteraceae*. Las diferencias observadas en los perfiles de susceptibilidad entre las cepas aisladas de ganado porcino y bovino, podrían explicarse debido a la frecuencia del uso de estos antimicrobianos en la clínica veterinaria ya sea para el tratamiento de infecciones o como profilaxis (Rahimi, 2014).

En la presente investigación se observó tasas de resistencia del 80% al 100% de cepas de *A. butzleri* a ampicilina y ácido nalidíxico tanto en ganado porcino como en bovino, con tasas menores de resistencia a ciprofloxacina, gentamicina y eritromicina, además de ver una clara diferencia entre las frecuencias de resistencia a tetraciclina entre *A. butzleri* aislado de porcinos y bovinos, con porcentajes del 33.33% y 84.62% respectivamente. Algunos de estos resultados también han sido reportados por autores, donde se ha encontrado sensibilidad del 87% a ciprofloxacina y del 100% a eritromicina y gentamicina (Serraino et al., 2013; Van den Abeele et al., 2016). Se han reportado numerosos estudios de cepas de *A. butzleri* donde se ha encontrado la presencia de resistencia del 58% al 100% a ampicilina, 22% a ácido nalidíxico, 100% a tetraciclina y tasas de sensibilidad del 98% a eritromicina y ciprofloxacina (Rahimi, 2014; Yesilmen et al., 2014).

Para *A. cryaerophilus* se han reportados tasas de resistencia mayores al 80% a ampicilina, 51% a ciprofloxacina y del 40% a ácido nalidíxico (Rahimi, 2014; Serraino et al., 2013; Van den Abeele et al., 2016). También se ha reportado sensibilidad del 100% a tetraciclina, eritromicina, gentamicina y ciprofloxacina (Shirzad et al., 2016). Que en comparación a los datos obtenidos en la presente investigación se han encontrado tasas de resistencia del 33.33% a ácido nalidíxico, ampicilina y, tetraciclina y del 16.67% a ciprofloxacina y eritromicina en ganado bovino.

Para *A. skirrowii* se han reportado tasas de resistencia del 100% a ampicilina y del 50% a eritromicina, encontrándose además sensibilidad del 100% a tetraciclina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina y gentamicina (Rahimi, 2014; Yesilmen et al., 2014). En comparación con los datos obtenidos en esta investigación, se observaron mayores tasas de resistencia a ácido nalidíxico, eritromicina, ampicilina y tetraciclina (25%) en ganados bovinos, mientras que en porcinos se registró un 37.5% de resistencia a

ciprofloxacina, recalando que todas las cepas de *A. skirrowii* presentaban sensibilidad a la gentamicina.

Todos estos resultados indican un claro aumento en las tasas de resistencia en cepas procedentes de ganado porcino y bovino en nuestro medio. Se ha sugerido que la Arcobacteriosis en humanos y animales se ha subestimado en el pasado, las características propias de estas bacterias las hacen aptas para adaptarse a ambientes adversos, como su tolerancia a altas concentraciones salinas, su desarrollo a bajas temperaturas, en ambientes secos y su capacidad para adherirse a diversas superficies formando biopelículas (Cervenka, 2007; Ferreira et al., 2013), permiten incrementar sus rutas de transmisión y supervivencia. Es por ello que, cada vez son más numerosos los trabajos enfocados en el estudio de estos patógenos emergentes, debido a que en los últimos años se han observado frecuencias de prevalencia e incidencia significativamente elevadas, especialmente a partir de alimentos de origen animal y durante los procesos de producción de alimentos (Calvo et al., 2013), e incluso considerándolos como indicadores de contaminación fecal (Fernandez et al., 2015).

En países en vías de desarrollo, donde los sistemas de salud pública aún tienen grandes falencias y en determinadas zonas se cuenta con una sanitización y medidas higiénicas precarias, además de estar continuamente en contacto con reservorios naturales, la importancia de estos microorganismos es mayor, especialmente al no conocerse en su totalidad el potencial patogénico que tienen y sus muchas rutas de transmisión (Banting y Figueras, 2017; Calvo et al., 2013), además de no contar con datos epidemiológicos y susceptibilidad como es el caso de Ecuador.

Es por ello necesario que los profesionales de la salud tanto en la clínica humana como veterinaria, posean conocimientos sobre estos microorganismos emergentes, así como sus vías y fuentes de contaminación para evitar la diseminación de estas bacterias. Así como la implementación de métodos y protocolos de aislamiento e identificación eficientes para permitir una mejor identificación de estos patógenos, participando el uso racional de antimicrobianos a fin de evitar la aparición de cepas multiresistentes a los grupos de antibióticos más empleados en la clínica humana.

Por tanto, los datos presentados en este trabajo están de acuerdo a la bibliografía disponible y se ha podido observar el carácter zoonótico de estas especies, las cuales son capaces de colonizar un amplio rango de reservorios.

CONCLUSIONES

- ✓ La prevalencia de *Arcobacter* spp. en ganado porcino fue del 40% (20/50). La prevalencia de *Arcobacter* spp. en ganado bovino fue del 62% (31/50).
- ✓ Las especies de *Arcobacter* identificadas en ganado porcino correspondieron a: *A. thereius* con un 45.45% (10/22), *A. skirrowii* con un 36.36% (8/22), *A. butzleri* con un 13.64% (3/22) y *A. cryaerophilus* en un 4.55% (1/22).
- ✓ Las especies de *Arcobacter* identificadas en ganado bovino correspondieron a: *A. butzleri* en un 72.22% (26/36), *A. cryaerophilus* en un 16.67% (6/36) y *A. skirrowii* en un 11.11% (4/36).
- ✓ Se encontró co-colonización en el 10% de la muestras positivas pertenecientes a ganado porcino entre *A. thereius* + *A. skirrowii* y *A. thereius* + *A. butzleri* y del 16.12% en ganado bovino entre *A. butzleri* + *A. cryaerophilus* y *A. butzleri* + *A. skirrowii*.
- ✓ La resistencia de *Arcobacter* spp. en ganado porcino correspondió a más del 50% a ciprofloxacina y ácido nalidíxico, así como un 27.27% a ampicilina y tetraciclina. Encontrándose que *A. thereius* presentó mayor resistencia a ciprofloxacina y ácido nalidíxico con un 70%, seguida de *A. butzleri* con un 100% de resistencia a ácido nalidíxico y ampicilina.
- ✓ La resistencia de *Arcobacter* spp. en ganado bovino correspondió a más del 65% a tetraciclina, ácido nalidíxico y ampicilina, así como un 25% a eritromicina. Encontrándose que *A. butzleri* presenta más del 80% de resistencia a tetraciclina, ácido nalidíxico y ampicilina, seguido de *A. cryaerophilus* con un 33.33% de resistencia a ácido nalidíxico, ampicilina y tetraciclina, por último, *A. skirrowii* presentó resistencia menor al 25% a ácido nalidíxico, eritromicina, ampicilina y tetraciclina.
- ✓ El ganado porcino y bovino son un importante reservorio que pueden actuar como fuente principal para la transmisión de especies de *Arcobacter*. La presencia de multirresistencia, hace evidente el uso de antibióticos de manera desmedida en la industria ganadera, pudiendo afectar a la eficacia de los tratamientos así como encarecer el costo a nivel de salud pública y del paciente.

RECOMENDACIONES

- ✓ Investigar otras potenciales fuentes animales y ambientales que representen un riesgo de transmisión para el ser humano.
- ✓ Estudiar las principales vías de transmisión de estos patógenos en nuestro país, así como conocer si existe una relación epidemiológica entre las cepas aisladas de diferentes fuentes.
- ✓ Emplear métodos de aislamiento directo y de enriquecimiento conjuntamente, con el fin de incrementar su poder de sensibilidad y especificidad en la investigación de *Arcobacter*.
- ✓ Realizar estudios para conocer los mecanismos de resistencia que presentan estas bacterias hacia los antimicrobianos de primera línea.
- ✓ Trabajar con una mayor población de estudio, con el fin de obtener datos representativos que permitan en futuras investigaciones la realización de perfiles epidemiológicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abay, S., Kayman, T., Hizlisoy, H., y Aydin, F. (2012). In vitro Antibacterial Susceptibility of *Arcobacter butzleri* Isolated from Different Sources. *J. Vet. Med. Sci*, 74(5), 613–616. <https://doi.org/10.1292/jvms.11-0487>
- Abdelbaqi, K., Ménard, A., Prouzet-Mauleon, V., Bringaud, F., Lehours, P., y Mégraud, F. (2007). Nucleotide sequence of the *gyrA* gene of *Arcobacter* species and characterization of human ciprofloxacin-resistant clinical isolates. *FEMS Immunology y Medical Microbiology*, 49(3), 337–345. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00208.x>
- Aldred, K. J., Kerns, R. J., y Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53(10), 1565–74. <https://doi.org/10.1021/bi5000564>
- Álvarez, D., Garza, G., y Vázquez, R. (2015). Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Rev Chilena Infectol*, 32(5), 499–504. Retrieved from <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v32n5/art02.pdf>
- Amann, R. I., Ludwig, W., y Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59(1), 143–69. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.09.009>
- Anhalt, J. P., y Fenselau, C. (1975). Identification of Bacteria using Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 47(2), 219–225. <https://doi.org/10.1021/ac60352a007>
- Aydin, F., Gümüşsoy, K. S., Atabay, H. I., Iça, T., y Abay, S. (2007). Prevalence and distribution of *Arcobacter* species in various sources in Turkey and molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 103(1), 27–35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03240.x>
- Banting, G., y Figueras, M. J. (2017). *Arcobacter*. *Global Water Pathogen Project*. Retrieved from <http://www.unesco.org/openaccess/terms-use-ccbysa-en>
- 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*. Universidad Politécnica de Valencia. 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>
- Behringer, M., Miller, W. G., y Oyarzabal, O. A. (2011). Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from live broilers and retail broiler meat by *flaA*-RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 84(2), 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.11.016>
- Bücker, R., Troeger, H., Kleer, J., Fromm, M., y Schulzke, J. (2009). *Arcobacter butzleri* Induces Barrier Dysfunction in Intestinal HT-29/B6 Cells. *The Journal of Infectious Diseases*, 200(5), 756–764. <https://doi.org/10.1086/600868>
- Butzler, J.-P. (2004). *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10(10), 868–76. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00983.x>
- Calvo, G., Arias, M. L., y Fernández, H. (2013). *Arcobacter*: un patógeno emergente de

- origen alimentario. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 63(2), 164–172.
- Carbone, M., Maugeri, T. L., Giannone, M., Gugliandolo, C., Midiri, A., y 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)
- Cervenka, L. (2007). Survival and Inactivation of *Arcobacter* spp., a Current Status and Future Prospect. *Critical Reviews in Microbiology*, 33(2), 101–108. <https://doi.org/10.1080/10408410701364497>
- Chamba, A. (2016). *Especies de Campylobacter resistentes a fluoroquinolonas aisladas de ganado porcino y bovino en la provincia de Loja*. UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA.
- Collado, L., Cleenwerck, I., Van Trappen, S., De Vos, P., y 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., y Figueras, M. J. (2011). Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 174–192. <https://doi.org/10.1128/CMR.00034-10>
- Collado, L., Jara, R., Vásquez, N., y 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>
- Collado, L., Levican, A., Perez, J., y Figueras, M. J. (2011). *Arcobacter defluvii* sp. nov., isolated from sewage samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(9), 2155–2161. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.025668-0>
- Córdoba, O., Redondo, M., Castro, E., y Arias, M. L. (2017). *Arcobacter* Isolation from Minced Beef Samples in Costa Rica. *Journal of Food Protection*, 80(5), 775–778. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-493>
- Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 22(5), 299–305. <https://doi.org/10.1157/13059826>
- Cultek. (2016). PCR en Tiempo Real, 1–6. Retrieved from <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-Q-PCR-Introduccion.pdf>
- De Boer, R. F., Ott, A., Güren, P., Van Zanten, E., Van Belkum, A., y Kooistra-Smid, A. M. D. (2013). Detection of *Campylobacter* species and *Arcobacter butzleri* in stool samples by use of real-time multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(1), 253–259. <https://doi.org/10.1128/JCM.01716-12>
- De Oliveira, S. J., Baetz, A. L., Wesley, I. V., y Harmon, K. M. (1997). Classification of *Arcobacter* species isolated from aborted pig fetuses and sows with reproductive problems in Brazil. *Veterinary Microbiology*, 57(4), 347–354. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(97\)00106-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(97)00106-5)
- De Smet, S., De Zutter, L., Debruyne, L., Vangroenweghe, F., Vandamme, P., y Houf, K. (2011). *Arcobacter* population dynamics in pigs on farrow-to-finish farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1732–1738. <https://doi.org/10.1128/AEM.02409-10>

- De Smet, S., De Zutter, L., y Houf, K. (2011). Small ruminants as carriers of the emerging foodborne pathogen *Arcobacter* on small and medium farms. *Small Ruminant Research*, 97(1–3), 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.02.004>
- De Smet, S., De Zutter, L., y Houf, K. (2012). Spatial Distribution of the Emerging Foodborne Pathogen *Arcobacter* in the Gastrointestinal Tract of Pigs. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(12), 1097–1103. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1184>
- De Smet, S., De Zutter, L., Van Hende, J., y Houf, K. (2010). *Arcobacter* contamination on pre- and post-chilled bovine carcasses and in minced beef at retail. *Journal of Applied Microbiology*, 108(1), 299–305. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04430.x>
- Diéguez, A. L., Balboa, S., Magnesen, T., y Romalde, J. L. (2017). *Arcobacter* lekithochrous sp. nov., isolated from a molluscan hatchery. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1327–1332. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001809>
- Donachie, S. P., Bowman, J. P., On, S. L. W., y Alam, M. (2005). *Arcobacter* halophilus sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(3), 1271–1277. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.63581-0>
- Doudidah, L., De Zutter, L., Baré, J., De Vos, P., Vandamme, P., Vandenberg, O., ... Houf, K. (2012). Occurrence of putative virulence genes in *Arcobacter* species isolated from humans and animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), 735–741. <https://doi.org/10.1128/JCM.05872-11>
- Doudidah, L., De Zutter, L., Vandamme, P., y 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. W., Harrington, C. S., y 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), 286–291. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10618103>
- Ertas, N., Dogruer, Y., Gonulalan, Z., Guner, A., y Ulger, I. (2010). Prevalence of *arcobacter* species in drinking water, spring water, and raw milk as determined by multiplex PCR. *Journal of Food Protection*, 73(11), 2099–2102. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.11.2099>
- Fera, M. T., Maugeri, T. L., Giannone, M., Gugliandolo, C., La Camera, E., Blandino, G., y Carbone, M. (2003). In vitro susceptibility of *Arcobacter* butzleri and *Arcobacter* cryaerophilus to different antimicrobial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21(5), 488–91. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(03\)00004-9](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(03)00004-9)
- Fera, M. T., Maugeri, T. L., Gugliandolo, C., La Camera, E., Lentini, V., Favaloro, A., ... Carbone, M. (2008). Induction and resuscitation of viable nonculturable *Arcobacter* butzleri cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(10), 3266–8. <https://doi.org/10.1128/AEM.00059-08>
- Fernández, H. (2011). *Campylobacter* y campylobacteriosis: una mirada desde

América del sur. *Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Publica*, 28(1), 121–127. <https://doi.org/10.1590/S1726-46342011000100019>

Fernández, H., Flores, S., y Inzunza, F. (2010). *Arcobacter butzleri* Strains Isolated from Different Sources Display Adhesive Capacity to Epithelial Cells In Vitro*, 38(3), 287–291. Retrieved from <http://www.ufrgs.br/actavet/38-3/911.pdf>

Fernández, H., Krause, S., y 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>

Fernández, H., Vera, F., y Villanueva, M. P. (2007). Especies de *Arcobacter* y *Campylobacter* en aves y mamíferos del sur de Chile. *Arch. Med. Vet*, 39(2), 163–166. Retrieved from <http://mingaonline.uach.cl/pdf/amv/v39n2/art11.pdf>

Fernandez, H., Villanueva, M. P., Mansilla, I., Gonzalez, M., y Latif, F. (2015). *Arcobacter butzleri* and *A. cryaerophilus* in human, animals and food sources, in southern Chile. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 145–147. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120140095>

Ferreira, S., Fraqueza, M. J., Queiroz, J. A., Domingues, F. C., y Oleastro, M. (2013). Genetic diversity, antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Arcobacter butzleri* isolated from poultry and environment from a Portuguese slaughterhouse. *International Journal of Food Microbiology*, 162(1), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.003>

Ferreira, S., Queiroz, J. A., Oleastro, M., y Domingues, F. C. (2015). Insights in the pathogenesis and resistance of *Arcobacter*: A review. *Critical Reviews in Microbiology*, 42(3), 1–20. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.954523>

Figueras, M. J., Collado, L., Levican, A., Perez, J., Solsona, M. J., y Yustes, C. (2011). *Arcobacter molluscorum* sp. nov., a new species isolated from shellfish. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(2), 105–109. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.10.001>

Figueras, M. J., Levican, A., Collado, L., Inza, M. I., y 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. J., Levican, A., Pujol, I., Ballester, F., Quilez, M. J. R., y Gomez-Bertomeu, F. (2014). A severe case of persistent diarrhoea associated with *arcobacter cryaerophilus* but attributed to *campylobacter* sp. and a review of the clinical incidence of *Arcobacter* spp. *New Microbes and New Infections*, 2(2), 31–37. <https://doi.org/10.1002/2052-2975.35>

Flanagan, R. C., Neal-McKinney, J. M., Dhillon, A. S., Miller, W. G., y Konkel, M. E. (2009). Examination of *Campylobacter jejuni* putative adhesins leads to the identification of a new protein, designated FlpA, required for chicken colonization. *Infection and Immunity*, 77(6), 2399–2407. <https://doi.org/10.1128/IAI.01266-08>

Galvão, N. N., Chiarini, E., Destro, M. T., de Aguiar Ferreira, M., y Nero, L. A. (2012). PFGE characterisation and adhesion ability of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from bovine carcasses and beef processing facilities. *Meat Science*, 92(4), 635–643. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.06.011>

Giacometti, F., Lucchi, A., Di Francesco, A., Delogu, M., Grilli, E., Guarniero, I., ...

- Serraino, A. (2015). *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii* circulation in a dairy farm and sources of milk contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(15), 5055–5063. <https://doi.org/10.1128/AEM.01035-15>
- Giesendorf, B. A. J., Van Belkum, A., Koeken, A., Stegeman, H., Henkens, M. H. C., Van der Plas, J., ... Quint, W. G. V. (1993). Development of species-specific DNA probes for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* by polymerase chain reaction fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(6), 1541–1546. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8314996>
- Gölz, G., Karadas, G., Alutis, M. E., Fischer, A., Köhl, A. A., Breithaupt, A., ... Heimesaat, M. M. (2015). *Arcobacter butzleri* Induce Colonic, Extra-Intestinal and Systemic Inflammatory Responses in Gnotobiotic IL-10 Deficient Mice in a Strain-Dependent Manner. *PLOS ONE*, 10(9), e0139402. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139402>
- Goni, M. D., Muhammad, I. J., Goje, M., Bitrus, A. A., Jajere, S. M., Adam, B. M., y Abbas, M. A. (2017). Occurrence of emerging *Arcobacter* in dogs and cats and its public health implications: A Review. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 5(9), 362–370. <https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2017/5.9.362.370>
- González, A., y Ferrús, M. A. (2011). Study of *Arcobacter* spp. contamination in fresh lettuces detected by different cultural and molecular methods. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 311–314. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.018>
- Grove-White, D. H., Leatherbarrow, A. J. H., Cripps, P. J., Diggle, P. J., y French, N. P. (2014). Temporal and farm-management-associated variation in faecal pat prevalence of *Arcobacter* spp. in ruminants. *Epidemiology and Infection*, 142(4), 861–870. <https://doi.org/Doi.10.1017/S095026881300160x>
- He, Y., Li, H., Lu, X., Stratton, C. W., y Tang, Y. W. (2010). Mass spectrometry biotyper system identifies enteric bacterial pathogens directly from colonies grown on selective stool culture media. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(11), 3888–3892. <https://doi.org/10.1128/JCM.01290-10>
- Heimesaat, M. M., Karadas, G., Alutis, M., Fischer, A., Köhl, A. A., Breithaupt, A., ... Gölz, G. (2015). Survey of small intestinal and systemic immune responses following murine *Arcobacter butzleri* infection. *Gut Pathogens*, 7(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s13099-015-0075-z>
- Hernandez, J., Alonso, J. L., Fayos, A., Amoros, I., y Owen, R. J. (1995). Development of a PCR assay combined with a short enrichment culture for detection of *Campylobacter jejuni* in estuarine surface waters. *FEMS Microbiol Lett*, 127(3), 201–206. <https://doi.org/037810979500062A> [pii]
- Ho, H. T. K., Lipman, L. J. A., y Gaastra, W. (2006, June 15). *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent! *Veterinary Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.03.004>
- Ho, H. T. K., Lipman, L. J. A., Hendriks, H. G. C. J. M., Tooten, P. C. J., Ultee, T., Gaastra, W., ... P., V. (2007). Interaction of *Arcobacter* spp. with human and porcine intestinal epithelial cells. *FEMS Immunology y Medical Microbiology*, 50(1), 51–58. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00230.x>
- Ho, T. K. H., Lipman, L. J. A., Van Der Graaf-Van Bloois, L., Van Bergen, M., y

- 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., y 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, y 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., Lindenburg, F., Lauwers, S., Breynaert, J., y Wybo, I. (2004). Isolation of *Arcobacter skirrowii* from a Patient with Chronic Diarrhea. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 42(4), 1851–1852. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1851-1852.2004>
- Houf, K., On, S. L. W., Coenye, T., Debruyne, L., De Smet, S., y Vandamme, P. (2009). *Arcobacter thereius* sp. nov., isolated from pigs and ducks. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(10), 2599–2604. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.006650-0>
- Houf, K., On, S. L. W., Coenye, T., Mast, J., Van Hoof, J., y Vandamme, P. (2005). *Arcobacter cibarius* sp. nov., isolated from broiler carcasses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(2), 713–717. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63103-0>
- Houf, K., y 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>
- Houf, K., Tutenel, A., De Zutter, L., Van Hoof, J., y Vandamme, P. (2000). Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*. *FEMS Microbiology Letters*, 193(1), 89–94. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(00\)00461-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00461-4)
- Houf, K., Zutter, L., Verbeke, B., Hoof, J. A. N. V. A. N., y Vandamme, P. (2003). Molecular Characterization of *Arcobacter* Isolates Collected in a. *Journal of Food Protection*, 66(3), 364–369. Retrieved from <http://foodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-66.3.364?code=fopr-site>
- Hsu, T.-T. D., y Lee, J. (2015). Global Distribution and Prevalence of *Arcobacter* in Food and Water. *Zoonoses and Public Health*, 62(8), 579–589. <https://doi.org/10.1111/zph.12215>
- Hsueh, P. R., Teng, L. J., Yang, P. C., Wang, S. K., Chang, S. C., Ho, S. W., ... Luh, K. T. (1997). Bacteremia caused by *Arcobacter cryaerophilus* 1B. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(2), 489–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9003624>
- Hume, M. E., Harvey, R. B., Stanker, L. H., Droleskey, R. E., Poole, T. L., y Zhang, H. B. (2001). Genotypic variation among *arcobacter* isolates from a farrow-to-finish swine facility. *Journal of Food Protection*, 64(5), 645–651. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11347994>

- Inglis, G. D., Kalischuk, L. D., Busz, H. W., y Kastelic, J. P. (2005). Colonization of cattle intestines by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter lanienae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5145–5153. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5145-5153.2005>
- Johnson, L. G., y Murano, E. A. (2002). Arcobacter Isolates from Various Sources. *Journal of Food Protection*, 65(11), 1789–1795. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.11.1789>
- Kabeya, H., Maruyama, S., Morita, Y., Kubo, M., Yamamoto, K., Arai, S., ... Mikami, T. (2003). Distribution of Arcobacter species among livestock in Japan. *Veterinary Microbiology*, 93(2), 153–158. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00312-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00312-7)
- Karadas, G., Bücken, R., Sharbati, S., Schulzke, J.-D., Alter, T., y Gözl, G. (2016). Arcobacter butzleri isolates exhibit pathogenic potential in intestinal epithelial cell models. *Journal of Applied Microbiology*, 120(1), 218–225. <https://doi.org/10.1111/jam.12979>
- Karadas, G., Sharbati, S., Hänel, I., Messelhäußer, U., Glocker, E., Alter, T., y Gözl, 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>
- Kiehlbauch, J. A., Brenner, D. J., Nicholson, M. A., Baker, C. N., Patton, C. M., Steigerwalt, A. G., y Wachsmuth, 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 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2007646>
- Kiehlbauch, J. A., Plikaytis, B. D., Swaminathan, B., Cameron, D. N., y Wachsmuth, I. K. (1991). Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal genes for species identification and subtyping of aerotolerant *Campylobacter* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(8), 1670–1676. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1684797>
- Kim, H. M., Hwang, C. Y., y Cho, B. C. (2010). *Arcobacter marinus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(3), 531–536. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.007740-0>
- Krawczyk, B., Kur, J., Stojowska-Swedrzyńska, K., y Śpibida, M. (2016, June). Principles and applications of ligation mediated PCR methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Acta Biochimica Polonica*. https://doi.org/10.18388/abp.2015_1192
- Lastovica, A., On, S., y Zhang, L. (2014). The Family Campylobacteraceae. In *The Prokaryotes: Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria* (4 th, pp. 1–413). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-39044-9>
- Levican, A., Alkeskas, A., Günter, C., Forsythe, S. J., y Figueras, M. J. (2013). Adherence to and invasion of human intestinal cells by Arcobacter species and their virulence genotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(16), 4951–4957. <https://doi.org/10.1128/AEM.01073-13>
- Levican, A., Collado, L., Aguilar, C., Yustes, C., Diéguez, A. L., Romalde, J. L., y Figueras, M. J. (2012). *Arcobacter bivalviorum* sp. nov. and *Arcobacter venerupis*

- sp. nov., new species isolated from shellfish. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(3), 133–138. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.01.002>
- Levicán, A., Collado, L., y 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>
- Levicán, A., Rubio-Arcos, S., Martínez-Murcia, A., Collado, L., y Figueras, M. J. (2015). *Arcobacter ebronensis* sp. nov. and *Arcobacter aquimarinus* sp. nov., two new species isolated from marine environment. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(1), 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.10.011>
- Logan, E. F., Neill, S. D., y Mackie, D. P. (1982). Mastitis in dairy cows associated with an aerotolerant campylobacter. *The Veterinary Record*, 110(10), 229–30. <https://doi.org/10.1136/VR.110.10.229>
- McClung, C. R., Patriquin, D. G., y David, R. E. (1983). *Campylobacter nitrofigilis* sp. nov., a Nitrogen-Fixing Bacterium Associated with Roots of *Spavtina alterniflora* Loisel. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33(3), 605–612. <https://doi.org/10.1099/00207713-33-3-605>
- Mellmann, A., Cloud, J., Maier, T., Keckevoet, U., Ramminger, I., Iwen, P., ... Harmsen, D. (2008). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(6), 1946–1954. <https://doi.org/10.1128/JCM.00157-08>
- Merga, J. Y., Williams, N. J., Miller, W. G., Leatherbarrow, A. J. H., Bennett, M., Hall, N., ... Winstanley, C. (2013). Exploring the Diversity of *Arcobacter butzleri* from Cattle in the UK Using MLST and Whole Genome Sequencing. *PLoS ONE*, 8(2), e55240. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055240>
- 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>
- Moreno, Y., Botella, S., Alonso, J. L., Alonso, L., Ferrús, M. a, Hernández, M., y Hernández, J. (2003). Specific Detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* Strains in Water and Sewage by PCR and Fluorescent In Situ Hybridization Specific Detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* Strains in Water and Sewage by PCR and Fluorescent In Situ Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 1181–1186. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.1181>
- Moreno, Y., Hernández, M., Ferrús, M. A., Alonso, J. L., Botella, S., Montes, R., y Hernández, J. (2001). Direct detection of thermotolerant campylobacters in chicken products by PCR and in situ hybridization. *Research in Microbiology*, 152(6), 577–582. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01232-3](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01232-3)
- Nassonova, E. S. (2008, December 23). Pulsed field gel electrophoresis: Theory, instruments and applications. *Tsitologiya*. <https://doi.org/10.1134/S1990519X08060011>
- Neill, S. D., Campbell, J. N., O'Brien, J. J., Weatherup, S. T. C., y Ellis, W. A. (1985). Taxonomic Position of *Campylobacter cvyaevophila* sp. nov. *International Journal*

of *Systematic Bacteriology*, 35(3), 342–356. <https://doi.org/10.1099/00207713-35-3-342>

- Neill, S. D., Ellis, W. A., y O'Brien, J. J. (1979). Designation of aerotolerant Campylobacter-like organisms from porcine and bovine abortions to the genus Campylobacter. *Res Vet Sci*, 27(2), 180–186. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/523802>
- On. (1996, July). Identification methods for campylobacters, helicobacters, and related organisms. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology (ASM). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8809468>
- On, S. L. W., Harrington, C. S., y Atabay, H. I. (2003). Differentiation of Arcobacter species by numerical analysis of AFLP profiles and description of a novel Arcobacter from pig abortions and turkey faeces. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), 1096–1105. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02100.x>
- Oth, L., Wilson, M., Cancino, R., y Fernández, H. (2004). In vitro susceptibility of Arcobacter butzleri to six antimicrobial drugs. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 36(2), 207–210. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2004000200012>
- Park, S., Jung, Y. T., Kim, S., y Yoon, J. H. (2016). Arcobacter acticola sp. nov., isolated from seawater on the East Sea in South Korea. *Journal of Microbiology*, 54(10), 655–659. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-6268-4>
- Patyal, A., Rathore, R. S., Mohan, H. V., Dhama, K., y 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>
- Pentimalli, D., Pegels, N., García, T., Martín, R., y González, I. (2009). Specific PCR detection of Arcobacter butzleri, Arcobacter cryaerophilus, Arcobacter skirrowii, and Arcobacter cibarius in chicken meat. *Journal of Food Protection*, 72(7), 1491–1495. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19681276>
- Prouzet-Mauléon, V., Labadi, L., Bouges, N., Ménard, A., y Mégraud, F. (2006). Arcobacter butzleri: Underestimated Enteropathogen. *Emerging Infectious Diseases*, 12(2), 307–309. <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. P., Dhama, K., Karthik, K., Rathore, R. S., Kumar, A., Saminathan, M., ... Singh, R. K. (2017). Arcobacter: an emerging food-borne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control – a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, 37(1), 136–161. <https://doi.org/10.1080/01652176.2017.1323355>
- Ramees, T. P., Rathore, R. S., Bagalkot, P. S., Kumar, G. V. P. P. S. R., Mohan, H. V., Anoopraj, R., ... Dhama, K. (2014). Real-time PCR detection of Arcobacter butzleri and Arcobacter cryaerophilus in chicken meat samples. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 8(4), 3165–3169.
- 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>

- Samie, A., Obi, C. L., Barrett, L. J., Powell, S. M., y 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>
- Sasi Jyothsna, T. S., Rahul, K., Ramaprasad, E. V. V., Sasikala, C., y Ramana, C. V. (2013). *Arcobacter anaerophilus* sp. nov., isolated from an estuarine sediment and emended description of the genus *Arcobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART 12), 4619–4625. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.054155-0>
- Sauer, S., y Kliem, M. (2010, January 1). Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2243>
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P., Rolain, J. M., y Raoult, D. (2009). Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*, 49(4), 543–551. <https://doi.org/10.1086/600885>
- Serraino, A., Florio, D., Giacometti, F., Piva, S., Mion, D., y Zanoni, R. G. (2013). Presence of *Campylobacter* and *Arcobacter* species in in-line milk filters of farms authorized to produce and sell raw milk and of a water buffalo dairy farm in Italy. *Journal of Dairy Science*, 96(5), 2801–2807. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6249>
- SFM, y EUCAST. (2017). Comité de l'antibiogramme 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., y Jafri, N. (2012). 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>
- Shirzad, H., Tabatabaei, M., Khoshbakht, R., y Raeisi, M. (2016). Occurrence and antimicrobial resistance of emergent *Arcobacter* spp. isolated from cattle and sheep in Iran. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 44, 37–40. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2015.12.002>
- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P. A., y Teixeira, P. (2011). *Campylobacter* spp. as a Foodborne Pathogen: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 2, 200. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00200>
- 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>
- Smith, T., y Taylor, M. S. (1919). SOME MORPHOLOGICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERS OF THE SPIRILLA (*VIBRIO FETUS*, N. SP.) ASSOCIATED WITH DISEASE OF THE FETAL MEMBRANES IN CATTLE. *The Journal of Experimental Medicine*, 30(4), 299–311. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19868360>
- Snelling, W. J., Matsuda, M., Moore, J. E., y Dooley, J. S. G. (2006, January). Under

the microscope: *Arcobacter*. *Letters in Applied Microbiology*.
<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 broiler carcasses during processing*. University of Georgia. Retrieved from https://getd.libs.uga.edu/pdfs/son_insook_200512_phd.pdf
- Southern, E. M., Anand, R., Brown, W. R. A., y Fletcher, D. S. (1987). A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 15(15), 5925–5943. <https://doi.org/10.1093/nar/15.15.5925>
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación En Discapacidad*, 2(2), 70–78. <https://doi.org/10.1157/13059826>
- Torrallbo, A. (2013). *Campylobacter spp. en granjas y matadero de broilers y en perros domésticos en Andalucía: estudio microbiológico, epidemiológico y de sensibilidad antimicrobiana*. Retrieved from <http://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/11089>
- Van Camp, G., Fierens, H., Vandamme, P., Goossens, H., Huyghebaert, A., y De Wachter, R. (1993). Identification of Enteropathogenic *Campylobacter* Species by Oligonucleotide Probes and Polymerase Chain Reaction Based on 16S rRNA Genes. *Systematic and Applied Microbiology*, 16(1), 30–36. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80248-1](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80248-1)
- Van den Abeele, A. M., Vogelaers, D., Vanlaere, E., y Houf, K. (2016). Antimicrobial susceptibility testing of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* strains isolated from Belgian patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(5), 1241–1244. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv483>
- Van Driessche, E., y Houf, K. (2007). Characterization of the *Arcobacter* contamination on Belgian pork carcasses and raw retail pork. *International Journal of Food Microbiology*, 118(1), 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.05.006>
- Van Driessche, E., Houf, K., Van Hoof, J., De Zutter, L., y Vandamme, P. (2003). Isolation of *Arcobacter* species from animal feces. *FEMS Microbiology Letters*, 229(2), 243–248. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00840-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00840-1)
- Van Driessche, E., Houf, K., Vangroenweghe, F., De Zutter, L., y Van Hoof, J. (2005). Prevalence, enumeration and strain variation of *Arcobacter* species in the faeces of healthy cattle in Belgium. *Veterinary Microbiology*, 105(2), 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.11.002>
- Van Driessche, E., Houf, K., Vangroenweghe, F., Nollet, N., De Zutter, L., Vandamme, P., y Van Hoof, J. (2004). Occurrence and strain diversity of *Arcobacter* species isolated from healthy Belgian pigs. *Research in Microbiology*, 155(8), 662–666. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.04.011>
- Van Veen, S. Q., Claas, E. C. J., y Kuijper, E. J. (2010). High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(3), 900–907. <https://doi.org/10.1128/JCM.02071-09>
- Vandamme, P., y De Ley, J. (1991). Proposal for a New Family, *Campylobacteraceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(3), 451–455.

<https://doi.org/10.1099/00207713-41-3-451>

- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., y 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.
- Vandamme, P., Gevers, D., y Debruyne, L. (2008). Taxonomy of the Family *Campylobacteraceae*. In *Campylobacter, Third Edition* (pp. 3–25). <https://doi.org/10.1128/9781555815554.ch1>
- Vandamme, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Mels, L., Hoste, B., Dewettinck, D., ... Hommez, J. (1992). Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(3), 344–356. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-3-344>
- Vandenberg, O., Dediste, A., Houf, K., Ibekwem, 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., y 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>
- Vilar, M. J., García Peña, F. J., Pérez, I., Diéguez, F. J., Sanjuán, M. L., Rodríguez-Otero, J. L., y Yus, E. (2010). Presence of *Listeria*, *Arcobacter*, and *Campylobacter* spp. in dairy farms in Spain. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 123(1–2), 58–62. <https://doi.org/10.2376/0005-9366-123-58>
- 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), 1374–1378. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.8.1374>
- 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), 1374–1378. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.8.1374>
- Wesley, I. V, Baetz, A. L., y Larson, D. J. (1996). Infection of cesarean-derived colostrum-deprived 1-day-old piglets with *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii*. *Infection and Immunity*, 64(6), 2295–2299. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8675340>
- Wesley, I. V, Wells, S. J., Harmon, K. M., Green, A., Schroeder-Tucker, L., Glover, M., y Siddique, I. (2000). Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in dairy cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1994–2000. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.1994-2000.2000>
- Whiteduck-Léveillé, K., Whiteduck-Léveillé, J., Cloutier, M., Tambong, J. T., Xu, R., Topp, E., ... Khan, I. U. H. (2015). *Arcobacter lanthieri* sp. Nov., isolated from pig and dairy cattle manure. *International Journal of Systematic and Evolutionary*

Microbiology, 65(8), 2709–2716. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.000318>

- Wirsen, C. O., Sievert, S. M., Cavanaugh, C. M., Molyneaux, S. J., Ahmad, A., Taylor, L. T., ... Taylor, C. D. (2002). Characterization of an autotrophic sulfide-oxidizing marine *Arcobacter* sp. that produces filamentous sulfur. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 316–325. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.1.316-325.2002>
- Yan, J. J., Ko, W. C., Huang, A. H., Chen, H. M., Jin, Y. T., y Wu, J. J. (2000). *Arcobacter butzleri* bacteremia in a patient with liver cirrhosis. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi*, 99(2), 166–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10770033>
- Yesilmen, S., Vural, A., Erkan, M. E., y Yildirim, I. H. (2014). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Arcobacter* species in cow milk, water buffalo milk and fresh village cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 11–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.006>
- Zerpa, R., Alarcón Villaverde, J. O., Lezama Vigo, P. E., Gabriel, L. P., Dioses, A. R., Valencia Ramírez, A. M., ... León, M. J. A. (2014). Identificación de *Arcobacter* en heces de niños y adultos con/sin diarrea y en reservorios animales. *An Fac Med*, 75(2), 185–187. Retrieved from <http://www.scielo.org.pe/pdf/afm/v75n2/a17v75n2.pdf>
- Zhang, Z., Yu, C., Wang, X., Yu, S., y Zhang, X. H. (2016). *Arcobacter pacificus* sp. nov., isolated from seawater of the south pacific Gyre. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(2), 542–547. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000751>

ANEXOS

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
Trimetoprim	64 mg

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 el 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 10. Medio de transporte selectivo para el aislamiento de especies de *Arcobacter*.

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

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 technical N°2.
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 el 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.

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. Crecimiento de colonias sospechosas tras 72 horas de incubación a 30 °C.
Fuente: Autor.
Elaboración: Autor.

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.

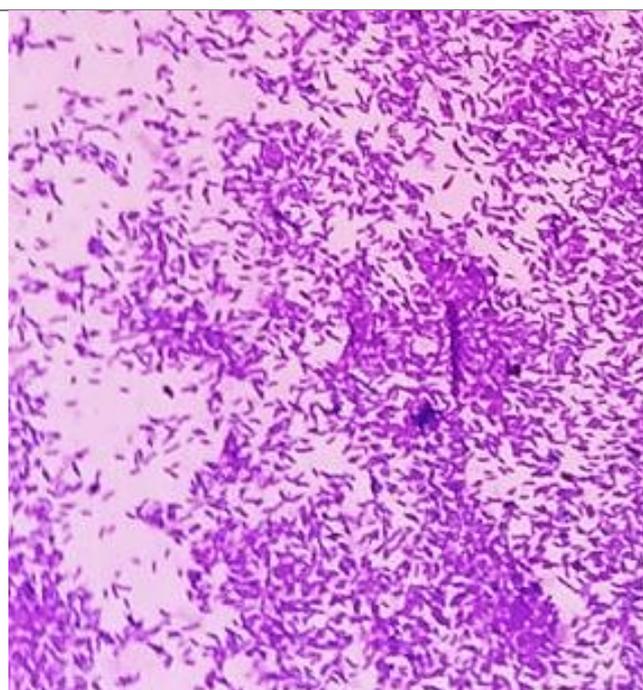


Figura 12. Microscopía óptica (100X). Tinción de Hucker. Se puede apreciar la morfología característica curva de *Arcobacter* spp.
Fuente: Autor.
Elaboración: Autor.

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.



Figura 13. Pruebas bioquímicas. Prueba de oxidasa (izquierda) y catalasa (derecha) positivas.
Fuente: Autor.
Elaboración: Autor.

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.

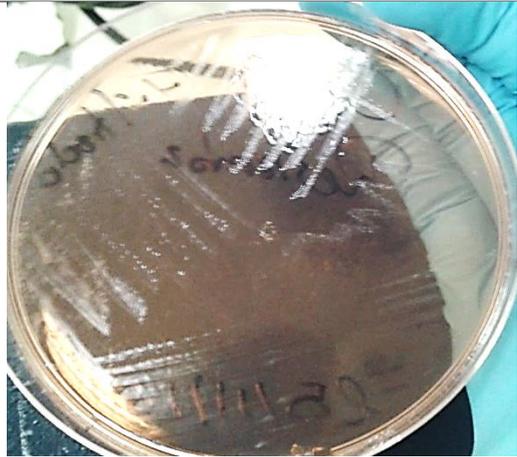


Figura 14. Crecimiento en agar MacConkey.

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.

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 caldo tioglicolato.
2. Pesar 1 g de extracto de levadura.
3. Pesar 0.1 g de agar technical N°2.
4. Medir en una probeta 100 ml de agua destilada.
5. Colocar en un frasco con tapa el medio de tioglicolato, el extracto de levadura e ir añadiendo conjuntamente poco a poco el agua.
6. Mezclar todo hasta su completa homogenización.
7. Esterilizar el medio en el autoclave a 121°C y 1.5 atm de presión por 20 minutos.
8. Enfriar y dispensar aproximadamente entre 7 ml a 8 ml en tubos Corning de 15 ml con tapa rosca estériles.
9. 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 15. Criotubos inoculados con una cepa de *Arcobacter* spp.

Fuente: Autor.
Elaboración: Autor.

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 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

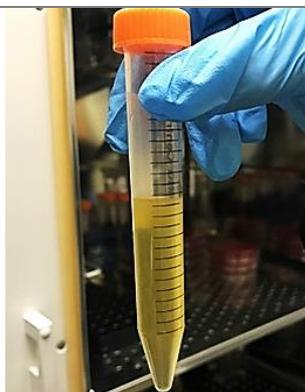


Figura 16. Caldo tioglicolato inoculado con una cepa de *Arcobacter* spp.

Fuente: Autor.
Elaboración: Autor.

ANEXO 7: Extracción de ADN Genómico de Bacterias gramnegativas

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 gramnegativas y grampositivas. Este 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 µl 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
- dNTPs
- MgCl₂
- TaqPolimerasa
- Agua destilada estéril
- Primers

MATERIALES Y EQUIPOS

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

PROCEDIMIENTO

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

Multiplex-PCR				
Componentes	1X (μl)	Concentración	Concentración final	
H ₂ O	9.375			
Buffer Green	5	5 X	1 X	
dNTPs	0.5	10 mM	200 μM	
MgCl ₂	1.5	25 mM	1.5 mM	
Primers	ArcoF	0.5	100 μM	5 μM
	ButR	0.5	100 μM	5 μM
	TherR	0.5	100 μM	5 μM
	CibR	0.5	100 μM	5 μM
	SkiR	0.5	100 μM	5 μM
	GyrasF	0.5	100 μM	5 μM
	GyrasR	0.5	100 μM	5 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.	27
Desnaturalización	95	45 seg.	
Anillamiento	56	45 seg.	
Extensión	72	2 min	1
Extensión final	72	10 min	

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 1X, 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
Ciprofloxacina	5	26	26
Ácido nalidíxico	30	19	14
Ampicilina	10	14	14
Tetraciclina	30	30	30

1. Tomar con un hisopo estéril dos 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 Hinton, enriquecido con extracto de levadura y sangre al 5%.
4. Colocar los discos de antibióticos e incubar a 30°C por 48 horas.

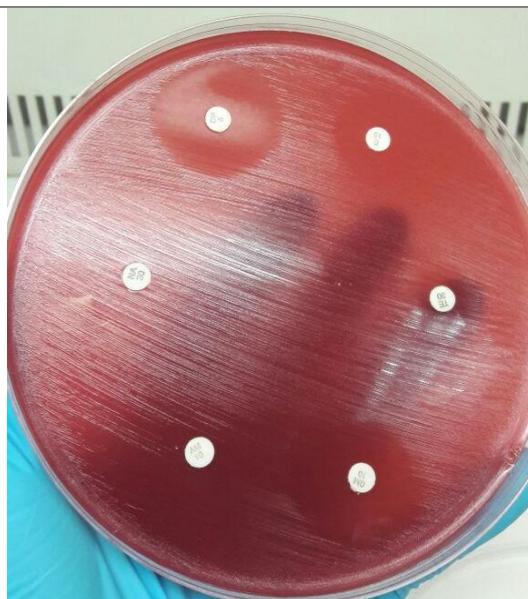


Figura 17. Determinación de actividad antimicrobiana.

Fuente: Autor.

Elaboración: Autor.