



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE
LOJA**

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE MAGISTER EN ANÁLISIS BIOLÓGICO Y
DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

**Identificación de especies del género *Campylobacter* y *Arcobacter* en
población de Loja y Zamora Chinchipe**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Ambuludí Quichimbo, Diego René

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

Magíster.

Rosa Janneth Simaluiza Masabanda.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

Que el presente trabajo de titulación, denominado: “Identificación de especies del género *Campylobacter* y *Arcobacter* en población de Loja y Zamora Chinchipe”, realizado por Ambuludí Quichimbo Diego René, 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 Ambuludí Quichimbo Diego René declaro ser autor del presente trabajo de titulación: Identificación de especies del género *Campylobacter* y *Arcobacter* en población de Loja y Zamora Chinchipe, de la Maestría en Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio, siendo Rosa Janneth Simaluiza Masabanda directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de mi exclusiva responsabilidad.

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

f.....

Autor: Ambuludí Quichimbo Diego René
Cédula: 2100454509

DEDICATORIA

La presente Tesis está dedicada a Dios todo poderoso y a nuestro señor Jesucristo por la fuerza y voluntad que ha forjado en mí para empezar y terminar con éxito este reto planteado.

A mi esposa, Gina e hijos Christopher y Alice por mostrarme el apoyo incondicional durante estos 2 años de estudio.

A mis padres, Antonio e Itsmenia y mis hermanas Mariuxy y Lisbeth por sus consejos y apoyo que me han dado y quienes han sido una motivación para alcanzar este objetivo.

A familiares, que de alguna u otra manera estuvieron apoyándome con sus palabras de aliento y apoyo.

Finalmente, a esos verdaderos amigos y compañeros con los cuales compartimos en las aulas grandes momentos llenos de conocimientos, alegrías y tristezas.

AGRADECIMIENTO

Primero agradecer a Dios por todas las bendiciones brindadas y que hoy me permite gozar de un logro más en mi vida profesional.

A mi Esposa Gina e hijos Christopher y Alice por ser mi fuente de motivación e inspiración para poderme superar cada día más y así poder ofrecerles un mejor futuro.

A mis amados padres y hermanas por la ayuda incondicional que me brindaron y por las palabras motivadoras que me permitieron no decaer y pueda cumplir con éxito mis ideales.

A la Universidad Técnica Particular de Loja por ofrecer una formación de cuarto nivel que me permitió crecer como profesional fortaleciendo y generando nuevos conocimientos en el área de Laboratorio Clínico.

Agradezco a cada uno de los docentes que durante todo este tiempo compartieron sus enseñanzas y conocimientos.

A mi Directora de Tesis Mgtr. Janneth Simaluiza primero por permitirme ser parte de este proyecto y por el apoyo, orientación y corrección de la tesis de grado.

A los estudiantes de pregrado que realizan gestión productiva, por su ayuda desinteresada y contribución en el desarrollo de este trabajo investigativo.

A mis compañeros de Trabajo del “Hospital Julius Doepfner”, por su ayuda y apoyo que permitieron iniciar y terminar con éxito este nuevo reto profesional.

Finalmente, un agradecimiento a mis compañeros y amigos de clase, ya que gracias al compañerismo que existió en este tiempo de formación pudimos mostrar nuestra capacidad y conocimiento científico y culminar con éxito esta etapa de nuestra vida profesional.

INDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA.....	i
APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORÍA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 Género <i>Campylobacter</i>	6
1.1.1 Antecedentes históricos.....	6
1.1.2 Características morfológicas.....	7
1.1.3 Características bioquímicas.....	7
1.1.4 Condiciones de crecimiento.....	8
1.1.5 Epidemiología.....	9
1.1.6 Reservorios.....	10
1.1.7 Rutas de transmisión.....	11
1.1.8 Especies género <i>Campylobacter</i>	12
1.1.8.1 <i>Campylobacter jejuni</i>	12
1.1.8.2 <i>Campylobacter coli</i>	13
1.1.8.3 <i>Campylobacter fetus</i>	13
1.1.8.4 <i>Campylobacter lari</i>	14
1.1.8.5 <i>Campylobacter hyointestinalis subsp. hyointestinalis</i>	14
1.1.8.6 <i>Campylobacter upsaliensis</i>	14
1.1.9 Patogenia.....	14
1.1.9.1 Mecanismo de virulencia.....	15
1.2.9.2 Mecanismo de adherencia y ataque.....	15

1.1.10 Manifestaciones clínicas.....	16
1.1.10.1 Síndrome de Guillain-Barré (GBS).....	16
1.1.10.2 Síndrome de Miller Fisher (SMF).....	17
1.1.10.3 Bacteriemia y Septicemia.....	17
1.1.10.4 Artritis reactiva.....	18
1.1.11 Actividad antimicrobiana.....	19
1.2 Género <i>Arcobacter</i>	21
1.2.4 Condiciones de crecimiento.....	22
1.2.5 Epidemiología.....	23
1.2.6 Reservorios.....	23
1.2.7 Rutas de transmisión.....	24
1.2.7.1 Transmisión por alimentos.....	24
1.2.7.2 Transmisión por agua.....	25
1.2.8 Especies género <i>Arcobacter</i>	25
1.2.8.1 <i>Arcobacter butzleri</i>	26
1.2.8.2 <i>Arcobacter skirrowi</i>	27
1.2.8.3 <i>Arcobacter cryaerophilus</i>	27
1.2.8.4 <i>Arcobacter thetelus</i>	28
1.2.8.5 <i>Arcobacter cibarius</i>	28
1.2.9 Patogenia	28
1.2.9.1 Mecanismo de virulencia.....	29
1.2.9.2 Mecanismo de adherencia y ataque.....	29
1.2.10 Manifestaciones clínicas.....	30
1.2.11 Actividad antimicrobiana.....	31
CAPITULO II. MÉTODOS.....	33
2.1 Muestreo.....	34
2.2 Aislamiento.....	34
2.2.1 <i>Campylobacter</i>	34
2.2.2 <i>Arcobacter</i>	35
2.3 Identificación fenotípica.....	36
2.3.1 <i>Campylobacter</i>	36
2.3.2 <i>Arcobacter</i>	36
2.4 Identificación genotípica.....	36
2.4.1 Extracción de ADN.....	36

2.4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR-Múltiplex.....	37
2.4.2.1 <i>Campylobacter</i>	37
2.4.2.2 <i>Arcobacter</i>	37
2.5 Determinación de la actividad antimicrobiana.....	38
CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
3.1 Identificación de <i>Campylobacter</i> en población de Loja y Zamora Chinchipe.....	41
3.2 Especies del género <i>Campylobacter</i> en población de Loja y Zamora Chinchipe.....	43
3.3 Actividad antimicrobiana de 5 antibióticos frente a especies de <i>Campylobacter</i>	45
3.4 Identificación de <i>Arcobacter</i> en población de Loja y Zamora Chinchipe.....	49
3.5 Especies del género <i>Arcobacter</i> en población de Loja y Zamora Chinchipe.....	51
3.6 Actividad antimicrobiana de 5 antibióticos frente a especies de <i>Arcobacter</i>	53
CONCLUSIONES.....	57
RECOMENDACIONES.....	58
BIBLIOGRAFÍA.....	59
ANEXOS.....	67
a. Protocolos de identificación de <i>Campylobacter</i>	68
Anexo 1. Preparación de medios de cultivo.....	68
Anexo 2. PCR- Múltiplex para identificación de especies de <i>Campylobacter</i>	69
b. Protocolos de identificación de <i>Arcobacter</i>	71
Anexo 3. Preparación de medios de cultivo.....	71
Anexo 4. PCR- Múltiplex para identificación de especies de <i>Arcobacter</i>	74
c. Protocolos de identificación de <i>Campylobacter</i> y <i>Arcobacter</i>	76
Anexo 5. Preparación de caldo de Tioglicolato.....	76
Anexo 6. Medio de cultivo para evaluar la actividad antimicrobiana.....	77
Anexo 7. Pruebas fenotípicas y bioquímicas.....	78
Anexo 8. Criopreservación de cepas.....	79
Anexo 9. Protocolo de extracción de ADN genómico de bacterias gram negativas.....	70
Anexo 10. Electroforesis en Gel de Agarosa.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características morfológicas de <i>Campylobacter</i>	7
Figura 2. <i>Arcobacter butzleri</i> . Colonias en agar sangre.....	27
Figura 3. Mecanismos de virulencia descritos para <i>Arcobacter</i>	30
Figura 4. Procesamiento de muestras fecales.....	34
Figura 5. Inoculación en caldo de enriquecimiento.....	35
Figura 6. Filtración pasiva.....	36
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % para especies de <i>Campylobacter</i>	43
Figura 8. Actividad antimicrobiana de 5 antibióticos frente a especies de <i>Campylobacter</i> ...	46
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 2,0 % para especies de <i>Arcobacter</i>	51
Figura 10. Actividad antimicrobiana de 5 antibióticos frente a especies de <i>Arcobacter</i>	54
Figura 11. Agar sangre modificado sin antibióticos.....	71
Figura 12. Medios de Agar MacConkey.....	73
Figura 13. Caldo de Tioglicolato.....	76
Figura 14. Crioconservación. Cepas de <i>Campylobacter</i> (A), cepas de <i>Arcobacter</i> (B).....	79
Figura 15. Kit de extracción Wizard® Genomic DNA Purification.....	82
Figura 16. Electroforesis en gel de Agarosa.....	84

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Identificación fenotípica de especies del género <i>Campylobacter</i>	8
Tabla 2. Especies del género <i>Campylobacter</i>	12
Tabla 3. Características bioquímicas de especies del género <i>Arcobacter</i>	22
Tabla 4. Descripción de especies de <i>Arcobacter</i>	26
Tabla 5. Condiciones para el Aislamiento de <i>Campylobacter</i> y <i>Arcobacter</i>	35
Tabla 6. Secuencias de primers de la PCR-Múltiplex utilizadas en la identificación de.....	37
género y especies de <i>Campylobacter</i>	37
Tabla 7. Secuencias de primers de la PCR-Múltiplex utilizadas en la identificación de.....	38
género y especies de <i>Arcobacter</i>	38
Tabla 8. Puntos de corte según el SFM y EUCAST 2017.....	38
Tabla 9. Prevalencia de <i>Campylobacter</i> en población de Loja y Zamora Chinchipe.....	41
Tabla 10. Prevalencia de especies de <i>Campylobacter</i> en población pediátrica y.....	44
geriátrica de Loja y Zamora Chinchipe.....	44
Tabla 11. Prevalencia de <i>Arcobacter</i> en población de Loja y Zamora Chinchipe.....	49
Tabla 12. Prevalencia de especies de <i>Arcobacter</i> en población pediátrica y geriátrica.....	52
de Loja y Zamora Chinchipe.....	52

RESUMEN

Los géneros *Campylobacter* y *Arcobacter* agrupan especies zoonóticas de las cuales *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Arcobacter butzleri* son las que se aíslan con mayor frecuencia.

Con la finalidad de identificar las especies del género *Campylobacter* y *Arcobacter* en población de Loja y Zamora Chinchipe se recolectó 110 muestras fecales de pacientes pediátricos y geriátricos y se identificó una prevalencia del 3,63 % (4/110) para *Campylobacter* y el 7,27 % (8/110) para *Arcobacter*.

De las especies aisladas de *Campylobacter* en la población de Loja, *C. jejuni* obtuvo el 33,3 % (1/3) y *C. coli* el 66,7 % (2/3), mientras que en Zamora Chinchipe *C. coli* comprendió el 100 % (1/1); en cuanto a *Arcobacter* se observó que *A. butzleri* fue la única especie aislada con una prevalencia del 100 % (8/8).

Además, se evaluó la actividad antimicrobiana, donde las especies de *Campylobacter* presentaron una resistencia del 100 % a la ciprofloxacina y tetraciclina, y las de *Arcobacter* una resistencia del 62 % a la gentamicina y ampicilina.

PALABRAS CLAVES: *Campylobacter*, *C. jejuni*, *C. coli*, *Arcobacter*, *A. butzleri*, antimicrobianos.

ABSTRACT

The genera *Campylobacter* and *Arcobacter* group zoonotic species of which *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Arcobacter butzleri* are the ones that are isolated most frequently.

In order to identify the species of the *Campylobacter* and *Arcobacter* genus in the population of Loja and Zamora Chinchipe, 110 fecal samples from pediatric and geriatric patients were collected and a prevalence of 3.63% (4/110) for *Campylobacter* and 7 was identified. 27% (8/110) for *Arcobacter*.

Of the species isolated from *Campylobacter* in the population of Loja, *C. jejuni* obtained 33.3% (1/3) and *C. coli* 66.7% (2/3), while in Zamora Chinchipe *C. coli* 100% (1/1); as for *Arcobacter*, it was observed that *A. butzleri* was the only isolated species with a prevalence of 100% (8/8).

In addition, the antimicrobial activity was evaluated, where *Campylobacter* species showed a 100% resistance to ciprofloxacin and tetracycline, and those of *Arcobacter* a resistance of 62% to gentamicin and ampicillin.

KEYWORDS: *Campylobacter*, *C. jejuni*, *C. coli*, *Arcobacter*, *A. butzleri*, antimicrobials.

INTRODUCCIÓN

En las últimas tres décadas, se han identificado gran número de enfermedades emergentes que afectan al ser humano, la mayoría de las cuales son de origen infeccioso e incluyen enfermedades bacterianas, virales, parasitarias, entre otras (Calvo, Arias y Fernández, 2013).

Los géneros *Campylobacter* y *Arcobacter* agrupan especies zoonóticas siendo *Campylobacter jejuni* y *Arcobacter butzleri* las más frecuentemente aisladas de reservorios animales, del hombre y de ambientes acuáticos (Fernández, 2012).

Campylobacteraceae es uno de los dos taxa principales dentro de la subdivisión epsilon de las Proteobacterias (Miller y Parker, 2011), la familia Campylobacteraceae incluye actualmente cuatro géneros, *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Sulfurospirillum* y *Thioturbo* (Fernández, Ochoa y Simaluiza, 2016). Los géneros y especies más bien caracterizados dentro de Campylobacteraceae son el género *Campylobacter* y la especie *Campylobacter jejuni*, esta posición de prominencia es merecida ya que *Campylobacter* (principalmente *C. jejuni*) es la principal causa de gastroenteritis bacteriana transmitida por los alimentos en el mundo desarrollado (Miller y Parker, 2011).

La familia Campylobacteraceae está en permanente expansión y dentro del género *Campylobacter* incluye 27 especies y 11 subespecies (Fernández, 2015) y el género *Arcobacter* comprende 25 especies (Ramees et al., 2017).

Las campylobacterias se han aislado, por ejemplo, de carne de res, cerdo, cordero, mariscos y leche cruda, pero el consumo de aves sigue fuertemente asociado con *Campylobacter* (Miller y Parker, 2011). Campilobacteriosis, es considerable: cada año las padecen cerca de 1 de cada 10 personas y son causa de la pérdida de 33 millones de años de vida saludable. *Campylobacter* es una de las cuatro principales causas mundiales de enfermedad diarreica. La elevada incidencia de diarrea por *Campylobacter*, su duración y sus posibles complicaciones le confieren gran importancia desde el punto de vista socioeconómico. En los países en desarrollo, las infecciones por *Campylobacter* son especialmente frecuentes en menores de 2 años, en los que a veces son mortales (OMS, 2016).

Arcobacter spp. se distinguen de *Campylobacter spp.* por su capacidad para crecer en una gama más amplia de ambientes, *Arcobacter spp.* puede crecer aeróbicamente, a diferencia de *Campylobacter*, que esta restringido a los ambientes microaeróbicos y/o anaeróbicos. *Arcobacter* puede crecer a temperatura ambiente entre 18 a 25 ° C, mientras que *Campylobacter* generalmente crece óptimamente sólo o por encima de 37 ° C (Miller y Parker, 2011).

Los reservorios naturales del género *Arcobacter* son el tracto intestinal de humanos y animales, órganos reproductores de animales, depósitos de agua, alcantarillado y plantas de ambiente salino. En la literatura médica se ha informado su aislamiento de heces de humanos y de diversos mamíferos y aves. *A. cryoaerophilus* ha sido aislado de pacientes con bacteriemia. Así mismo, *A. butzleri* ha sido encontrado en carne de ganado y en casos de adultos con diarrea crónica (Larrauri et al., 2014).

En animales, los arcobacterios han sido implicados en abortos, mastitis y trastornos gastrointestinales, pero también han sido recuperados de animales asintomáticos. A pesar de ello, la incidencia de las especies de *Arcobacter* es probablemente subestimada, debido principalmente a las limitaciones en los métodos actuales de detección e identificación. La Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas de los Alimentos (ICMSF) la clasificó como un serio peligro para la salud humana (Miller y Parker, 2011).

La distribución de *Arcobacter* en seres humanos es actualmente desconocida debido a la naturaleza emergente de informar. Sin embargo, probablemente tendrá una distribución más amplia que *Campylobacter* debido a su capacidad de sobrevivir y posiblemente replicarse en agua. Hasta ahora los casos humanos han sido reportados desde cuatro continentes, lo que sugiere una amplia distribución. La información derivada del cultivo de heces humanas de pacientes con diarrea indica una prevalencia de *Arcobacter* entre 0,1% y 1,25%, mientras que en estudios que detectaron estas bacterias en heces por PCR los resultados fueron mucho más altos, desde 0,4% hasta 56,7% (Banting y Figueras, 2017).

Si bien es cierto las infecciones por los géneros *Campylobacter* y *Acobacter* ya han sido descritas como zoonosis; sin embargo, los reportes de estos géneros principalmente *Arcobacter* todavía son escasos.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio es identificar las especies del género *Campylobacter* y *Arcobacter* en población de Loja y Zamora Chinchipe, enfocados en niños menores de 5 años y adultos mayores con y sin diarrea ya que esta población estadísticamente es más susceptible a padecer estas enteropatías.

Además, que por los últimos estudios taxonómicos y una mayor comprensión de sus vías de transmisión y mecanismos de patogenicidad generan el interés epidemiológico y de salud pública de obtener datos estadísticos que permitan conocer la incidencia de infecciones causadas por estos dos géneros.

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

1.1 Género *Campylobacter*.

1.1.1 Antecedentes históricos.

Las primeras observaciones de bacterias semejantes a *Campylobacter* documentadas fueron realizadas por Theodor Escherich, en 1886, a partir de material fecal de niños con diarrea, realizando observaciones semejantes en gatos jóvenes que también presentaban diarrea, Escherich le dio la denominación de *Vibrio Felinus*. Los primeros aislamientos de *Campylobacter* fueron realizados en el área de la microbiología veterinaria, 1909 y 1913. Más tarde, en 1918, Mac Fadyean y Stockmann y posteriormente Smith, establecieron la participación de una bacteria microaerofilia en el aborto del ganado bovino y ovino, la cual presentaba morfología similar a las especies del género *Vibrio* (Fernández et al., 2016).

El género *Campylobacter* fue propuesto en 1963, por Sebald y Veron para un grupo de especies con características diferentes de las bacterias conocidas como género *Vibrio* (Gomes, 2013). Ellos estudiaron la composición citosina/guanina del ADN de estas bacterias y determinaron que es muy diferente a las especies de *Vibrio* (Fernández et al., 2016).

Campylobacter, a principio se llamó *Vibrio fetus*, pero en las décadas siguientes se encontraron organismos similares en el género *Vibrio* como *Vibrio jejuni*, *Vibrio coli*, *Vibrio sputorum*, *Vibrio bubulus* y *Vibrio fecalis* (Ley, 2017). En 1972 Dekeyser y Butzler aislaron por primera vez especies de *Campylobacter* de las heces de pacientes con diarrea aguda usando una técnica de filtración que permitía el pasaje de estas bacterias curvas de pequeño diámetro a través de los poros de una membrana esterilizante (Fernández et al., 2016)

Y en 1973, Veron y Chatelain incluirían el género *Campylobacter* a nuevas especies teniendo como base sus características fenotípicas y estas se clasificaron en tres grupos: *Campylobacter* catalasa positivos e H₂S negativos (*Campylobacter fetus* subsp. *fetus* e *Campylobacter fetus* subsp. *Venerealis*); *Campylobacter* catalasa positivos e H₂S positivos (*Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni*) y *Campylobacter* catalasa negativos (*Campylobacter sputorum* subsp. *bubulus* e *Campylobacter sputorum* subsp. *sputorum*) (Gomes, 2013)

En 1980, estas diferentes especies se listaron en el "Approved Lists of Bacterial Nombres ", después de eso, muchos cambios ocurrieron en el género *Campylobacter*, incluyendo descripción de nuevas especies y evidentes similitudes con otros géneros como *Arcobacter* y *Helicobacter* (Gomes, 2013)

Finalmente, en 1992, los extensos estudios taxonómicos realizados por Peter Vandamme en la Universidad de Gante (Bélgica), sobre las diferentes bacterias curvas descritas hasta ese

momento, llevan a la creación de la Familia Campylobacteraceae, la cual incluye actualmente cuatro géneros, *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Sulfurospirillum* y *Thioturbo* (Fernández et al., 2016).

1.1.2 Características morfológicas.

Campylobacter spp. son bacilos curvados, en forma de S o espirales de 0,2 a 0,9 μm de ancho y de 0,5 a 5 μm de longitud. Las especies ocasionales, tales como *C. hominis*, forman barras rectas. Las especies de *Campylobacter* son bacilos gramnegativos, que no forman esporas, que pueden formar cuerpos esféricos o cocóides en cultivos antiguos o expuestas al aire durante periodos prolongados. Los organismos suelen ser movibles por medio de un solo flagelo polar desembragado en uno o ambos extremos, pero algunos pueden carecer de flagelos (Howell, Hazen y Brandt, 2015).



Figura 1. Características morfológicas de *Campylobacter*.

Fuente: (Fernández, 2015).

Elaborado por: El autor.

1.1.3 Características bioquímicas.

Las pruebas bioquímicas pueden utilizarse para diferenciar especies de *Campylobacter* de géneros relacionados e identificar organismos a nivel de especie. Las pruebas bioquímicas pertinentes utilizadas para diferenciar entre los miembros del género *Campylobacter* comienzan con el crecimiento con o sin suplementación de H_2 , prueba de acetato de indoxilo, prueba de hipurato, crecimiento en agar MacConkey, prueba de aril sulfatasa, y la producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S). Además, la detección de actividad de L-alanina aminopeptidasa

que puede diferenciar entre las especies *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Arcobacter* y otras bacterias gram-negativas. Sin embargo, la capacidad de diferenciar entre *C. jejuni* y *C. coli* sería la más relevante en el contexto clínico. La única prueba bioquímica que distingue entre estas dos especies es la prueba de hidrólisis del hipurato. Los aislamientos de *C. jejuni* tienen la capacidad de hidrolizar el hipurato, mientras que los aislados de *C. coli* producen un resultado negativo (Kaakoush, Castaño, Hazel y Ming, 2015)

Tabla 1. Identificación fenotípica de especies del género *Campylobacter*.

PRUEBA	<i>C. fetus ssp. fetus</i>	<i>C. hyointestinalis</i>	<i>C. jejuni ssp. jejuni</i>	<i>C. jejuni ssp. doylei</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>C. concisus</i>	<i>C. helveticus</i>	<i>C. mucosalis</i>
Catalasa	+	+	+	V	+	+	d/-	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reducción de NO ₃	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
H ₂ S	-	+	+/-	-	-	+	-	+	-	V
Requerimiento H ₂	-	V	-	-	-	-	-	+	-	+
Hidrólisis de hipurato	-	-	+	V	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de indoxilacetato	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-
Crecimiento a 25 °C	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento a 30 °C	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento a 37 °C	+	+	+	+	+	+	+	+		+
Crecimiento a 42 °C	-	V	+	-	+	+	V	V	+	+
Sensible a Ac. nalidíxico	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R
Sensible a cefalotina	S	S	R	S	R	R	V	R	S	S

d=reacción débil; V=variable; R=resistente; S=sensible (Reducción del selenito: *C. helveticus* +: *C. upsaliensis*)

Fuente: (Fernández et al., 2016).

Elaborado por: El autor.

1.1.4 Condiciones de crecimiento.

Las especies de *Campylobacter* son relativamente exigentes en cuanto a nutrientes y requieren de medios de cultivo complejos para su crecimiento, rico en aminoácidos, de los cuales obtienen su energía pues son capaces de oxidar o fermentar hidratos de carbono. Aun cuando tienen metabolismo respiratorio, no crecen en aerobiosis siendo microaerófilos

estrictos, requiriendo concentraciones de oxígeno del 5 al 10 % para desarrollar. De las especies termófilas o termotolerantes de *Campylobacter*, es decir, aquellas que son capaces de crecer a 37 y a 42-43 °C se menciona a *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* y *C. upsaliensis*, además de que estas especies no son capaces de crecer a 15 °C (Fernández et al., 2016).

1.1.5 Epidemiología.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) los considera como los primeros agentes de diarrea en los países industrializados y los segundos o terceros en aquellos en vías de desarrollo, indicando que la verdadera incidencia de la gastroenteritis por *Campylobacter* y sus secuelas son poco conocidas en países de bajos ingresos (Fernández et al., 2016).

Hay evidencia que sugiere que ha habido un aumento en la incidencia global de Campylobacteriosis en la última década. El número de casos de Campylobacteriosis ha aumentado en América del Norte, Europa y Australia. A pesar de que los datos epidemiológicos de África, Asia y Medio Oriente aún están incompletos, estos datos indican que la infección por *Campylobacter* es endémica en estas regiones. Las diferencias en la incidencia y el número de casos reportados de diferentes países o regiones dentro del mismo país pueden variar sustancialmente.(Kaakoush et al., 2015).

Los datos de la Red de Vigilancia Activa de enfermedades transmitidas por los alimentos indican que, aunque la incidencia disminuyó a principios de los años 2000, la incidencia de los casos confirmados de 14.3 por 100.000 habitantes representó un aumento del 14% en 2008. La incidencia de la enfermedad se ha mantenido estable desde 2010-2012, con 13,8 casos por 100.000 habitantes en 2013. Las tasas más altas de infección se dan en niños menores de 5 años (24,08 por 100.000 habitantes en 2009). Es la causa más común de diarrea confirmada por laboratorio en los viajeros internacionales que regresan. En personas susceptibles, sólo 500 organismos *Campylobacter* pueden causar infección (Kimberlin, Brady, Jackson y Long, 2015).

Centers for Disease control and prevention (CDC) en el 2013 menciona que por año 1´300.000 personas son infectadas de *Campylobacter*, de estas 310.000 muestra droga resistencia, 13.000 son hospitalizados y 120 llegan a morir (Fernández, 2015).

A nivel poblacional, esto puede tener impactos en la epidemiología y en la evaluación del riesgo de Campylobacteriosis. En los países en desarrollo donde *Campylobacter* es endémica, la infección suele limitarse a los niños, y las tasas de enfermedad/infección disminuyen con la edad, lo que sugiere que la exposición en la vida temprana podría conducir al desarrollo de inmunidad protectora. Esto podría reflejar por qué las infecciones

asintomáticas de *Campylobacter* son comunes en los países en desarrollo, lo que también podría tener un impacto en la transmisión de infecciones por *Campylobacter* en estas regiones debido a la excreción asintomática. La excreción asintomática también se encuentra en los países desarrollados, con una serie de estudios que muestran que la mayoría de los casos son asintomáticos (Kaakoush et al., 2015).

1.1.6 Reservorios.

Las especies de *Campylobacter* son principalmente zoonóticas, con una variedad de animales implicados como reservorios para la infección humana. Además de los animales alimentarios, como aves de corral, ganado vacuno, ovejas y cerdos, las especies de *Campylobacter* pueden estar presentes en las mascotas domésticas (Howell et al., 2015).

Las aves de corral se reconocen como una fuente primaria de transmisión de especies de *Campylobacter* a seres humanos. Un factor importante que contribuye es la alta tasa de transporte de *Campylobacter* en pollos de engorde. Por lo tanto, las especies de *Campylobacter* se encuentran en abundancia en las granjas avícolas y su entorno, incluyendo el suelo, las fuentes de agua, el polvo, las superficies de construcción y el aire. Productos como leche no pasteurizada es otro factor de riesgo para la infección por *C. jejuni* y *C. coli*. (Kaakoush et al., 2015).

Los animales salvajes son depósitos potenciales de especies de *Campylobacter*. Entre todas las especies hospederas estudiadas, es más probable que las aves silvestres porten más especies de *Campylobacter* (Kaakoush et al., 2015). Así mismo los insectos han sido investigados como reservorios de especies de *Campylobacter*, y se ha sugerido que las moscas desempeñan un papel en la transmisión de especies de *Campylobacter* a pollos de engorde (Kaakoush et al., 2015).

Además, el escarabajo *Alphitobius diaperinus* o conocido como lombriz de harina puede actuar como un reservorio de *C. jejuni*. En un estudio, se informó que *C. jejuni* sobrevive en el exterior del escarabajo durante 12 h y en el interior de las larvas durante 72 h, y que podría verse en las heces de las larvas durante 12 h después de la exposición. En este estudio, el 90% de las aves que consumieron un solo adulto o escarabajo larval se convirtió en *C. jejuni* positivo, mientras que el 100% de los que consumieron 10 adultos o larvas se volvieron positivos, un hallazgo que sugiere que los escarabajos son capaces de transmitir bacterias viables a pollos (Kaakoush et al., 2015).

Por el contrario, Skov y sus colegas encontraron que los escarabajos de basura, comúnmente presentes en los gallineros, no desempeñan un papel importante como reservorios de

especies de *Campylobacter*. Por lo que es posible que sólo especies específicas de escarabajos sean portadoras de especies de *Campylobacter* (Kaakoush et al., 2015).

Los estudios también han sugerido que los eucariotas microbianos pueden ser un reservorio no invertebrado de especies de *Campylobacter* en el medio ambiente. Por ejemplo, en un estudio de Axelsson-Olsson y colegas, se encontró que *C. jejuni* sobrevivió más tiempo cuando fue cocultivado con el protozoario *Acanthamoeba polyphaga* que cuando se cultivó solo. Microscópicamente, se encontró que *C. jejuni* se agregaba en vacuolas dentro de las amebas, y dado que en los sistemas de agua potable de aves de corral en las granjas se encuentra una diversidad de organismos eucariotas microbianos (73,5% de levaduras y hongos y 26,5% de protozoos), no es sorprendente que los eucariotas infectados con *Campylobacter* puedan jugar un papel en la transmisión de este organismo a los pollos (Kaakoush et al., 2015).

1.1.7 Rutas de transmisión.

La mayoría de las especies de *Campylobacter* son sensibles a la alimentación y al agua (Pitkanen & Hanninen, 2015). El agua es un vehículo eficaz de transmisión de especies de *Campylobacter* a seres humanos y animales, y el agua contaminada ha sido responsable de varios brotes en diferentes países. El consumo de agua no desinfectada es un factor de riesgo principal y varios estudios han evaluado la prevalencia de especies de *Campylobacter* en diferentes fuentes de agua. Además, los individuos que utilizan pozos privados en lugar de los sistemas municipales de agua superficial como fuente de agua potable corren mayor riesgo de desarrollar campilobacteriosis que otras enfermedades entéricas reportables (Kaakoush et al., 2015).

En el caso de que se produzca un cambio en la calidad de vida de los animales, contaminación fecal de la cadena de alimentos y el medio ambiente puede producir transmisiones de *Campylobacter* a la alimentación humana. En el caso de que se produzca un cambio en la calidad final del producto la contaminación es más alta y aumenta la probabilidad de que los seres humanos puedan ser infectados por vía fecal-oral. El contacto directo con los animales también es una ruta de transmisión. De persona a persona la transmisión es infrecuente y sólo se ha descrito en los jóvenes (Pitkanen y Hanninen, 2015)

La leche no pasteurizada procedente de ganado lechero también ha sido implicada en varios brotes de Campilobacteriosis. El número de brotes en Estados Unidos asociados con leche no pasteurizada aumentó de 30 en 2007 a 2009 a 51 en 2010 a 2012. La leche no pasteurizada también puede servir como fuente de varias otras especies de *Campylobacter*, incluyendo *C.*

hyointestinalis subsp. *hyointestinalis*, *C. fetus* subsp. *fetus*, *C. concisus* y *C. ureolithus*. Los análisis genómicos indican que la presencia de especies de *Campylobacter* en la leche puede atribuirse a la contaminación fecal (Kaakoush et al., 2015).

1.1.8 Especies género *Campylobacter*.

El género *Campylobacter* está en permanente expansión.

A continuación, se describe las especies y subespecies conocidas del género *Campylobacter*.

Tabla 2: Especies del género *Campylobacter*.

<i>C. coli</i>	<i>C. molotri</i> sp. Nov
<i>C. concisus</i>	<i>C. californiensis</i> sp. Nov
<i>C. curvus</i>	<i>C. iguanorum</i> sp. Nov
<i>C. gracilis</i>	<i>C. fetus</i>
<i>C. helveticus</i>	subsp. <i>fetus</i>
<i>C. hominis</i>	subsp. <i>venerealis</i>
<i>C. lanienae</i>	subsp. <i>tertudinum</i>
<i>C. mucosalis</i>	<i>C. hyointestinalis</i>
<i>C. rectus</i>	subsp. <i>hyointestinalis</i>
<i>C. showae</i>	subsp. <i>lawsonii</i>
<i>C. sputorum</i>	<i>C. jejuni</i>
<i>C. insulaenigrae</i> sp. Nov	subsp. <i>jejuni</i>
<i>C. canadensis</i> sp. Nov	subsp. <i>doylei</i>
<i>C. peloridis</i> sp. Nov	<i>C. lari</i>
<i>C. cuniculorum</i> sp. Nov	subsp. <i>lari</i>
<i>C. subantarcticus</i> sp. Nov	subsp. <i>concheus</i>
<i>C. avium</i> sp. Nov	<i>Campylobacter upsaliensis</i>
<i>C. volucris</i> sp. Nov	subsp. <i>upsaliensis</i>
<i>C. ureolyticus</i> sp. Nov	subsp. <i>lastovicae</i>

Fuente: (Fernández, 2015)

Elaborado por: El autor

Las seis especies más frecuentemente involucradas en procesos infecciosos del ser humano son: *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. lari*, *C. jejuni* y *C. upsaliensis* (Fernández et al., 2016).

1.1.8.1 *Campylobacter jejuni*.

Campylobacter jejuni es un gram negativo, tiene forma de espiral (Bücker et al., 2017) y ha surgido como la bacteria más común entre las enfermedades transmitidas por los alimentos en muchos países industrializados (Dasti, Tareen, Lugert, Zautner y Grob, 2010).

Es la causa más frecuente de gastroenteritis bacteriana en el mundo, estimada para infectar el 1% en la Unión Europea (UE) cada año (Humphrey et al., 2014). El síndrome diarreico, que generalmente es autolimitado, puede ir acompañado de dolor abdominal, fiebre, náuseas y ocasionalmente de vómito, los sitios habituales de la infección suelen ser el yeyuno y el íleon (Hernández, Arreola y Castro, 2013).

La enfermedad puede complicarse con colitis ulcerativa aguda, artritis reactiva, artritis séptica y meningitis. La presencia de sangre y de leucocitos en las heces de las personas infectadas indica el poder invasivo de la bacteria. Por otro lado, el *C. jejuni* es uno de los agentes más importantes causantes de diarrea del viajero.

En cultivo las colonias aparecen levantadas, irregulares, húmedas, y "moqueadas", extendiéndose a lo largo del medio de cultivo. (Kimberlin et al., 2015).

1.1.8.2 *Campylobacter coli*.

C. coli es una bacteria microaerobia, que no forma esporas, gram negativa, positiva a la oxidasa y que forman vástagos en forma de espiral que son de 0,2-0,9 µm de ancho y 0,5-5 µm de largo. Es un agente importante de gastroenteritis y enterocolitis aguda en los seres humanos. Los síntomas típicos incluyen diarrea acuosa que puede contener células rojas y blancas de la sangre, enterocolitis inflamatoria, dolor abdominal, fiebre, malestar general, náuseas y vómitos; la persistencia de los síntomas se puede observar en pacientes inmunocomprometidos (Cabrera, 2016)

C. coli, se encuentra en la carne de aves de corral, y está presente en el 10-15% de los casos de enfermedades causadas por *Campylobacter* (Vliet et al., 2016).

1.1.8.3 *Campylobacter fetus*.

Campylobacter fetus subsp *fetus* se asocia principalmente con bacteriemia e infecciones extraintestinales durante el embarazo o en el huésped comprometido. Aunque la gastroenteritis ocurre con esta especie, es probable que la incidencia esté subestimada porque el organismo puede no crecer bien a 42 °C y suele ser susceptible a la cefalotina un agente antimicrobiano usado en algunos medios selectivos comunes para el cultivo de heces. *C. fetus* subsp *fetus* produce una microcápsula de proteína de superficie compuesta de una proteína de capa superficial de alto peso molecular que es esencial para la virulencia. *C. fetus* subsp. *venerealis* causa la Campilobacteriosis venérea bovina y es causa de infertilidad bovina, pero rara vez es la causa de infección humana (Howell et al., 2015).

1.1.8.4 *Campylobacter lari*.

Campylobacter lari es una especie termófila resistente al ácido nalidíxico, primero aislado de gaviotas del género *Larus* y de otras especies aviarias, perros, gatos y pollos. *C. lari* ha sido infrecuentemente reportado de humanos con bacteriemia e infecciones gastrointestinales y del tracto urinario. Recientes estudios filogenéticos han descrito dos subespecies, *C. lari subsp. concheus* y *C. lari subsp. lari* (Howell et al., 2015).

1.1.8.5 *Campylobacter hyointestinalis subsp. hyointestinalis*.

Campylobacter hyointestinalis es una bacteria no termotolerante que ha sido aislada de bovinos, ovejas y cerdos. Estos organismos ocasionalmente causan enfermedad en los seres humanos. *C. hyointestinalis* se divide actualmente en dos subespecies, *C. hyointestinalis subsp. hyointestinalis* y *C. hyointestinalis subsp. lawsonii*, aunque la mayoría de las cepas de *C. hyointestinalis* no están identificadas al nivel de la subespecie, casi exclusivamente se ha aislado *C. hyointestinalis subsp. hyointestinalis* de bovinos y *C. hyointestinalis subsp. lawsonii* de cerdos (Miller, Yee y Chapman, 2016)

Varios informes recientes indican el aislamiento de un número creciente de organismos de *C. hyointestinalis* de pacientes con diarrea. Por lo tanto, *C. hyointestinalis* se considera un patógeno zoonótico emergente del género *Campylobacter*. Aun así existe escasa información sobre su factor de virulencia y sus mecanismos de patogenicidad, excepto en el caso de una citotoxina no caracterizada reportada por Ohya y Nakazawa (Kamei et al., 2015).

1.1.8.6 *Campylobacter upsaliensis*.

Campylobacter upsaliensis es una especie termotolerante que causa diarrea y bacteriemia en humanos y también está asociada con gastroenteritis canina y felina. Durante un período de 10 años, *C. upsaliensis* fue el más común, *C. upsaliensis* es susceptible a muchos agentes antimicrobianos presentes en los medios selectivos de *C. jejuni* y, por lo tanto, no suele aislarse en los medios de aislamiento primarios rutinarios y se puede recuperar usando la técnica de filtración (Howell et al., 2015).

1.1.9 Patogenia.

En los últimos 10 años la incidencia y prevalencia de Campilobacteriosis han aumentado tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo. El dramático aumento en América del Norte, Europa y Australia es alarmante, y los datos de partes de África, Asia y

Oriente Medio indican que la Campylobacteriosis es endémica en estas áreas, especialmente en los niños (Kaakoush et al., 2015).

Las aves de corral son un gran reservorio y fuente de transmisión de Campylobacteriosis a los seres humanos. Otros factores de riesgo incluyen el consumo de productos animales y el agua, el contacto con animales y los viajes internacionales. La implementación estratégica de medidas de biocontrol multifacético para reducir la transmisión de este grupo de patógenos es primordial para la salud pública. En general, la Campylobacteriosis sigue siendo una de las enfermedades infecciosas más importantes que es probable que desafíe la salud mundial en los próximos años (Kaakoush et al., 2015).

1.1.9.1 Mecanismo de virulencia.

Algunos estudios han demostrado que *Campylobacter* al ingresar al tracto gastrointestinal de los seres humanos evade la capa de moco del intestino e interactúa con las células epiteliales, causando la producción de interleucina (IL) 8, al ingresar la bacteria a la célula epitelial y haber inducido la producción IL-8 provoca el reclutamiento de células dendríticas, macrófagos y neutrófilos, que interactúan con el *Campylobacter* (Poma, 2014).

Esta interacción origina la respuesta inflamatoria masiva y el aumento de citoquinas. Sin embargo, en las aves *Campylobacter* solo reside en la capa mucosa en el intestino especialmente el ciego; en algunos estudios se demostró que *Campylobacter* estimula la producción de IL-1beta y IL-6, pero la respuesta del huésped no suele conducir a la diarrea inflamatoria en pollos, los factores que influyen en la disminución de la respuesta inmune y permiten la tolerancia no están muy bien definidos (Poma, 2014).

Otros estudios han demostrado que la mucina del tracto gastrointestinal de las aves puede afectar la invasión de *Campylobacter*, al ser muy sulfatada en comparación a la mucina de los seres humanos, haciendo posible que esta sulfatación module la virulencia de *Campylobacter* y sus manifestaciones clínicas en los distintos hospedadores (Poma, 2014).

1.1.9.2 Mecanismo de adherencia y ataque.

Las bacterias del género *Campylobacter* son móviles con dos flagelos bipolares que les facilita la colonización de células humanas. Los flagelos son necesarios para la colonización del intestino delgado y para que el patógeno pueda trasladarse hasta el colón. El filamento está compuesto por una flagelina mayor FlaA y una menor FlaB, ambas codificadas por dos genes que son la flaA y flaB (Poma, 2014).

La adhesión de *Campylobacter* desempeña un papel temprano en el proceso infeccioso uniéndose a receptores específicos de las células del hospedador, *Campylobacter* tiene predilección por los receptores de superficie apical o baso lateral de los enterocitos. La adhesión y ataque están correlacionadas con el grado de severidad de los síntomas clínicos en pacientes infectados (Poma, 2014).

Muchas cepas pueden invadir las células epiteliales, provocando infiltrados inflamatorios en la lámina propia y abscesos en las criptas (Fernández et al., 2016). *Campylobacter* al ingresar en la célula epitelial a través de la invasión o mediante uniones estrechas permite que la bacteria se mueva en la superficie baso lateral, para poder invadir la célula epitelial o ser capturado por un macrófago, pudiéndose replicar dentro de estos e inducir la apoptosis. La interacción que puede darse entre células epiteliales, células dendríticas y macrófagos puede liberar citosinas y quimiocinas que contribuyen a la diarrea e infección (Poma, 2014).

1.1.10 Manifestaciones clínicas.

Las principales secuelas reconocidas de Campylobacteriosis son el síndrome de Guillain-Barré, la artritis reactiva (ReA) y el síndrome del intestino irritable. El síndrome de Miller Fisher, una variante de GBS, también se asocia con la infección de *Campylobacter* precedente (WHO, 2012).

1.1.10.1 Síndrome de Guillain-Barré (GBS).

El GBS fue informado primero por Landry en 1859; sin embargo, no fue sino hasta 1916 que los neurólogos franceses Guillain, Barré y Strohl describieron por primera vez las características clínicas de GBS (Kaakoush et al., 2015).

El trastorno fue primero descrito como una forma "benigna" de debilidad de la extremidad asociada con la recuperación completa, pero ahora reconocemos el GBS como un trastorno neuromuscular prolongado e incapacitante con dificultades respiratorias en casi un tercio de los pacientes afectados. Su patología es una polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria aguda (PDIA). La incidencia oscila entre 0,40 y 3,25 casos por 100.000 personas, dependiendo de la localización geográfica. El síndrome de Guillain-Barré suele ser precipitado por una infección, con una incidencia que varía dependiendo de los brotes infecciosos. Nuestra mejor comprensión de su inmunopatogénesis viene de estudiar pacientes con infecciones específicas. *Campylobacter jejuni*, citomegalovirus y virus de Epstein-Barr predominan como patógenos infecciosos precedentes (Wijdicks y Klein, 2017).

La mayoría de los pacientes son hospitalizados, pero aquellos con progresión más rápida, especialmente aquellos con debilidad orofaríngea y falta de aliento, requieren la admisión a una unidad de cuidados intensivos (UCI). El cuidado neurointensivo ha avanzado considerablemente e implica el manejo de la insuficiencia respiratoria aguda por debilidad diafragmática y disautonomía grave que se manifiesta como arritmias cardíacas, presiones sanguíneas lábiles o íleo adinámico (Wijdicks y Klein, 2017).

1.1.10.2 Síndrome de Miller Fisher (SMF).

El síndrome de Miller Fisher es una variante clínica de GBS que fue descubierta en 1956 por Charles Miller Fisher (Kaakoush et al., 2015), caracterizado por la tríada de oftalmoparesia, ataxia y arreflexia; aunque no es infrecuente que asocie otros síntomas secundarios a debilidad de pares craneales (parálisis facial, alteración en la deglución, etc.) e incluso síntomas sensitivos distales en extremidades. Es frecuente la existencia de una infección previa al cuadro; siendo la más descrita una infección gastrointestinal por *Campylobacter jejuni*. Otros factores desencadenantes descritos han sido vacunación, intervencionismo (Gabaldón, Badía y Salas, 2013).

Se ha demostrado que Siglec-7 se une exclusivamente a cepas de *C. jejuni* que expresan imitadores de gangliósidos terminales disialilados. *C. jejuni* vinculante a Siglec-7 se correlaciona con la presencia de anticuerpos anti-GQ1b y la debilidad óculo motora en los pacientes, lo que sugiere que este puede ser un posible desencadenante del síndrome de Miller Fisher (Kaakoush et al., 2015).

Habitualmente no es difícil llegar al diagnóstico cuando está presente la tríada clásica, la aparición de disociación albuminocitológica y los hallazgos neurofisiológicos conocidos. Sin olvidar el papel de determinados anticuerpos asociados a estas entidades de afectación disinmunitaria del sistema nervioso periférico. Pero en ocasiones, la presencia de otros síntomas asociados, la no existencia de Ac-GQ1b y la falta de resultados anómalos en exploraciones complementarias en la fase aguda del síndrome pueden hacer más complejo el diagnóstico. (Gabaldón et al., 2013).

1.1.10.3 Bacteriemia y Septicemia.

Una de las manifestaciones extragastrointestinales más comunes de las especies de *Campylobacter* es la bacteriemia, que está predominantemente asociada con infecciones por *C. jejuni*, *C. coli* y *C. fetus*. Se han documentado al menos 10 especies diferentes de *Campylobacter* en casos de bacteriemia, pero los casos de bacteriemia asociados con infecciones por *C. lari*, *C. insulaenigrae* y *C. upsaliensis* son raros. Casos de bacteriemia

asociada a *Campylobacter* son a menudo subobservados. La mayoría de los casos ocurren en pacientes ancianos o inmunocomprometidos con una o más patologías concurrentes, incluyendo cirrosis hepática o neoplasia; entre estos pacientes, del 10 al 15% fallecen dentro de los 30 días posteriores al diagnóstico de la enfermedad (Kaakoush et al., 2015)

Un estudio reciente llevado a cabo en una población danesa informó que la incidencia estimada de bacteriemia asociada a *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus* y *C. lari* era de 2,9 casos por año en 1'000.000 de personas, con un pico de incidencia en pacientes mayores de 80 años. Por el contrario, un estudio de 10 años en Finlandia concluyó que *C. jejuni* y *C. coli* afectaban a individuos predominantemente más jóvenes sin enfermedades subyacentes mayores. La enfermedad generalmente resulta de una única complicación gastroenteritis en niños o como episodios recurrentes en niños inmunocomprometidos sin síntomas gastrointestinales. Varias especies de *Campylobacter*, incluyendo *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus* y *C. upsaliensis*, también se han asociado con sepsis tanto en niños inmunocompetentes como inmunocomprometidos y adultos. Además, se han reportado varios casos de sepsis neonatal asociada a *C. fetus* (Kaakoush et al., 2015).

1.1.10.4 Artritis reactiva.

La artritis reactiva (ReA) es una forma de artritis que ocurre más comúnmente en pacientes de 30 a 40 años de edad y se desarrolla después de infecciones gastrointestinales o genitourinarias. Esta afección puede afectar las articulaciones, como las rodillas y los tobillos, así como los ojos y los sistemas genital, urinario y gastrointestinal. Los síntomas pueden comenzar aproximadamente un mes después de la infección y resolverse dentro de un año, aunque en algunos pacientes esta afección puede persistir hasta 5 años (Kaakoush et al., 2015).

La incidencia y prevalencia reportadas de ReA asociada a *Campylobacter* varían según los estudios, como resultado de las diferencias en la detección de casos, la evaluación de la exposición, los criterios diagnósticos y la población del estudio. Sin embargo, los datos disponibles sugieren que la artritis reactiva ocurre en 1-5% de los infectados con *Campylobacter*. La incidencia anual de ReA después de la infección por *Campylobacter* se estima en 4,3 por 100.000 en los países de ingresos altos. Aunque la duración de ReA varía, en un estudio prospectivo de cohortes se encontró que el 5% de *Campylobacter* ReA era crónico o recidivante. Hay evidencia de que puede haber una gama de trastornos musculoesqueléticos que podrían ser desencadenados por *Campylobacter* (WHO, 2012).

1.1.11 Actividad antimicrobiana.

Con respecto al tratamiento antimicrobiano de la Campylobacteriosis cabe destacar que *Campylobacter spp.* es sensible a diversas clases de antimicrobianos, incluido macrólidos, especialmente eritromicina, y quinolonas como ciprofloxacina, siendo estos fármacos considerados de primera línea a la hora de aplicar el tratamiento clínico. Hay trabajos científicos que consideran que la resistencia bacteriana a antimicrobianos se debe principalmente al excesivo uso de los mismos en seres humanos (Rivera et al., 2011).

Como asociación a esta situación, se plantea que el incremento de la resistencia de *Campylobacter spp.* a quinolonas en los reservorios animales puede conducir a fallos en el tratamiento de las diarreas producidas por estos microorganismos en el hombre (Rivera et al., 2011).

La actividad antimicrobiana en *Campylobacter* ha identificado niveles importantes de resistencia a tetraciclinas y fluoroquinolonas en muchas partes del mundo. Tanto en Estados Unidos como en la UE, la resistencia es generalmente más alta en *C. coli* que en *C. jejuni*. Una causa del alto nivel de resistencia a las fluoroquinolonas parece ser el uso de estos fármacos para tratar aves de corral (WHO, 2012)

En los EE. UU la resistencia a las fluoroquinolonas en *Campylobacter* aislada de seres humanos estaba relacionada con el consumo de aves de corral, así como con viajes al extranjero; La aprobación del uso de fluoroquinolonas en las aves de corral se retiró en 2005. En Australia, donde nunca se aprobó tal uso, la resistencia a las fluoroquinolonas en las infecciones de *Campylobacter* adquiridas en el país es rara (WHO, 2012).

En distintos países sudamericanos se ha estudiado el comportamiento de *Campylobacter spp.*, frente a diferentes antimicrobianos, demostrando la aparición de cepas aisladas desde pacientes humanos y desde animales, resistentes a eritromicina, tetraciclina, ampicilina y a quinolonas, encontrándose que la resistencia a esta última familia ha sido explosiva, alcanzando tasas superiores al 50% (Pulgar, 2016).

Los patrones de uso y selección de antimicrobianos para la resistencia en una parte del mundo afectan la salud en otras partes del mundo, a través de los viajes internacionales y el comercio. Se ha observado que las infecciones resistentes a las fluoroquinolonas suelen asociarse con viajes a países desarrollados o en desarrollo. Una recopilación más sistemática de esa información puede ofrecer una forma de monitorear patrones de resistencia en partes del mundo donde la vigilancia local es limitada o inexistente (WHO, 2012).

Es difícil llevar a cabo estudios sistemáticos de casos y controles entre los viajeros que regresan, pero la comparación de las cepas de los viajeros que regresan con los de la carne, aves de corral u otros productos alimenticios importados de los mismos países puede ser útil. Esta información es de particular valor cuando se combina con datos detallados sobre el uso de antimicrobianos en humanos y animales. Los datos de prevalencia de resistencia son el punto de partida para evaluar el riesgo asociado con la resistencia a los antimicrobianos (WHO, 2012).

1.2 Género *Arcobacter*.

1.2.1 Antecedentes Históricos.

Aunque el primer aislamiento de *Arcobacter* fue registrado en el año 1977 por Ellis y Col, denominando "*Vibrio/spirillum*" los microorganismos aislados fueron obtenidos a partir de muestras de abortos bovinos (Rojas, 2011), *Arcobacter* es un género relativamente nuevo, que fue propuesto en 1991 por Vandamme et al. para acomodar dos especies de *Campylobacter* aerotolerantes: *Campylobacter cryaerophila* (ahora *Arcobacter Cryaerophilus*) y *Campylobacter nitrofigilis* (ahora *Arcobacter nitrofigilis*) (Collado y Figueras, 2011).

En el mismo año se aceptó la propuesta de Vandamme y De Ley (1991), que consistió en la inclusión de una nueva familia, de nombre Campylobacteraceae, así como la agrupación en ella de los géneros *Campylobacter* y *Arcobacter*. Este agrupamiento se hizo basándose en los caracteres fenotípicos y genotípicos que tenían en común y que a su vez los separaba de otros géneros (Bayas, 2016).

En 1992, Vandamme et al. modificó y amplió el género, con la reclasificación de *Campylobacter butzleri* como *Arcobacter butzleri* y con la descripción de la nueva especie *Arcobacter skirrowii*. *Arcobacter butzleri* fue aislado originalmente de humanos y animales con diarrea, mientras que *A. skirrowii* se obtuvo de las heces de corderos con diarrea, fetos abortados porcinos, ovinos y bovinos, y el prepucio de los toros (Collado y Figueras, 2011).

El 2005 se describieron otras dos especies; uno de ellos fue *Arcobacter cibarius*, aislado de carcasas de pollos de engorde en Bélgica, y el otro fue *Arcobacter halophilus*, descrito en base a una cepa única recuperada de una laguna hipersalina en Hawái. Esta última representa la primera especie de *Arcobacter* halófila obligatoria. *Arcobacter mytili*, aislado de mejillones y agua salobre en España, fue la primera especie del género que no puede hidrolizar acetato de indoxilo, *Arcobacter thereius* se ha aislado de hígados y riñones de porcinas espontáneamente abortadas y de muestras cloacales de pato; se ha aislado *Arcobacter marinus* (informado sobre la base de una sola cepa) de una muestra mixta de agua de mar, estrellas de mar y algas marinas en Corea; *Arcobacter trophiarum* se aisló de heces de cerdos

de engorde en Bélgica; se aisló *Arcobacter defluvii* a partir de muestras de aguas residuales; y *Arcobacter molluscorum* se recuperó de mejillones y ostras y es la segunda especie del género que no hidroliza acetato de indoxilo (Collado y Figueras, 2011).

El análisis filogenético del gen rRNA 16S recientemente publicado, construido con secuencias de genes de rRNA 16S de longitud casi completa de especies no cultivadas o no descritas, reveló que las nuevas líneas filogenéticas que esperan ser descritas superan las ya conocidas. Estas especies potencialmente nuevas de *Arcobacter* provienen de huéspedes y hábitats muy diferentes, es decir, lodos activados y aguas residuales, ambientes de campo petrolífero, sedimentos marinos y marinos, agua de mar, estuarios y aguas fluviales, corales, gusanos tubulares, caracoles, ostras, abulón y asociado con larvicultura de bacalao o con esteras de cianobacterias (Collado y Figueras, 2011).

Aunque la mayoría de ellos son secuencias de bacterias no cultivadas, es probable que se propongan varias nuevas especies en un futuro próximo. Todos estos datos demuestran que las especies de *Arcobacter* habitan en entornos muy diversos (Collado y Figueras, 2011).

Desde entonces, el número de especies descritas ha aumentado progresivamente de 6 especies en 2008 a más de 22 especies a partir de 2017 (Banting y Figueras, 2017).

1.2.2 Características morfológicas.

Los microorganismos de este género son bacilos gram negativos, cortos, curvados o ligeramente curvados en forma de S o espiral cuando está en cultivo joven, y de forma cocoidal o esférica en cultivos viejos. Presentan un flagelo polar que las dota de movimiento típico en forma de sacacorchos y miden de entre 0,2 y 0,9 μm de ancho con una longitud de entre 0,5 y 3 μm . Las colonias de *Arcobacter* comúnmente carecen de pigmentación (Bayas, 2016).

1.2.3 Características bioquímicas.

Todas las especies tienen actividad oxidasa y catalasa variable, presentan reacción negativa con el rojo de metilo y con el Voges Proskauer, no producen indol, excepto *A. mytili* y *A. molluscorum*. Son quimioorganótrofas y utilizan una gran variedad de fuentes de carbono, como ácidos orgánicos y aminoácidos (Calvo et al., 2013).

Excepto *A. nitrofigilis*, *A. venerupis*, *A. defluvii* y *A. ebronensis*, las demás especies del género son ureasa negativa. La mayoría de las especies reducen nitratos y no hidrolizan el hipurato (Bayas, 2016).

Tabla 3. Características bioquímicas de especies del género *Arcobacter*.

PRUEBA	<i>A. cibarius</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. mytili</i>	<i>A. nitrofigilis</i>	<i>A. skirrowii</i>	<i>A. thereius</i>
Catalasa	V	V	V	+	+	+	+
Requerimiento H ₂	-	-	-	-	-	-	-
Ureasa	-	-	-	-	+	-	-
H ₂ S TSI	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de Hipurato	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de indoxilacetato	+	+	+	-	+	+	+
Arylsulfatasa	ND	-	-	ND	-	-	-
Reducción de Selenito	-	-	-	ND	ND	ND	-
Crecimiento al 1 % de glicina	-	V	+	ND	-	V	+
Crecimiento a 25 °C	+	+	V	+	ND	+	+
Crecimiento aeróbico	V	+	+	+	ND	+	+
Agar MacConkey	+	V	+	+	-	V	V

Reacción positiva (+); reacción (-); reacción variable (V); no determinado (ND).

Fuente: (Howell et al., 2015)

Elaborado por: El autor.

1.2.4 Condiciones de crecimiento.

Dentro de sus características y por las cuales se diferencia del género *Campylobacter* se encuentra el que puede crecer en un rango de temperaturas que oscila entre los 15 - 42°C, aunque son microaerófilos, crecen en aerobiosis a 30 ° C. No obstante, para el aislamiento inicial de la mayoría de ellas, el crecimiento óptimo ocurre bajo condiciones de microaerofilia (5-10 % O₂) y no requieren hidrógeno (Calvo et al., 2013).

Las especies de *Arcobacter* difieren en sus requerimientos nutritivos y condiciones de cultivo. La característica más importante es su dependencia del ion sodio. Las concentraciones mínimas requeridas de Na⁺ para conseguir un crecimiento óptimo se encuentran dentro de un rango que va desde 0,5 al 4 %; todas las especies reaccionan positivamente a la concentración mínima, a excepción de *A. halophilus* y *A. marinus* (Levican, Rubio, Martínez, Collado y Figueras, 2015).

1.2.5 Epidemiología.

La distribución de *Arcobacter* en seres humanos es actualmente desconocida debido a la naturaleza emergente de la información. Sin embargo, probablemente tendrá una distribución más amplia que *Campylobacter* debido a su capacidad de sobrevivir y posiblemente replicarse en agua. Hasta ahora los casos humanos reportados han sido reportados desde cuatro continentes, lo que sugiere una amplia distribución. La información derivada del cultivo de heces humanas de pacientes con diarrea indica una prevalencia de *Arcobacter* entre 0,1% y 1,25%, mientras que en estudios que detectaron estas bacterias en heces por PCR los resultados fueron mucho más altos, desde 0,4% hasta 56,7%. En un estudio retrospectivo dedicado, realizado en Bélgica entre 2008 y 2013, *Arcobacter* fue el cuarto patógeno bacteriano más prevalente detectado, con una incidencia de 1,31% después de estudiar 6,774 muestras fecales de pacientes con enteritis. La introducción de MALDI-TOF como una herramienta de identificación rápida en los laboratorios clínicos probablemente ayudará con la futura identificación de casos clínicos adicionales de infección por *Arcobacter* (Banting y Figueras, 2017).

1.2.6 Reservorios.

Arcobacter ha sido identificado repetidamente en las heces de animales como en la de ganado sanos. Las tasas de aislamiento varían entre los diferentes estudios, pero los bovinos/terneros jóvenes muestran considerables cantidades de *Arcobacter*. En operaciones agrícolas *Arcobacter* también es comúnmente detectado principalmente en muestras de agua (Banting y Figueras, 2017).

Las granjas lecheras han demostrado tener una alta probabilidad de contaminación de *Arcobacter*. Debido a la complejidad de los productos lácteos operaciones y el enfoque en un producto líquido como la leche. En múltiples estudios *Arcobacter* ha sido identificado en tanques de leche, aparatos de ordeño, alimentación de animales, entre otros (Banting y Figueras, 2017).

En animales no ganaderos *Arcobacter* ha sido identificado en una amplia gama de animales como alpaca, gacela, rinoceronte y gorila. *A. butzleri* ha sido aislado de una colonia de Rhesus macacos que muestran diarrea acuosa de forma recurrente, también los perros han demostrado llevar especies como *A. butzleri* y *A. cryaerophilus* que están cercanamente asociadas al hombre (Banting y Figueras, 2017).

Es probable que las aves de corral producidas para consumo humano sean una fuente significativa de *Arcobacter*, muy parecido a *Campylobacter*. Varios estudios han mostrado tasas de aislamiento de *Arcobacter* en pollos (Banting y Figueras, 2017).

El agua es un componente clave para la probable transmisión de *Arcobacter* y en la mayoría de los estudios que buscan tasas de prevalencia de esta bacteria en animales han demostrado que el agua tiene *Arcobacter*. Esto es particularmente común en operaciones agrícolas intensivas donde el agua es consumida por los animales o utilizados para lavar cadáveres de animales o vegetales. *Arcobacter* también ha sido identificado en tubería de distribución de agua, en equipos de matanza y en mataderos de aves de corral (Banting y Figueras, 2017).

1.2.7 Rutas de Transmisión.

El consumo de alimentos o agua contaminados con *Arcobacter* se considera la vía de transmisión a humanos y animales, aunque esto aún no ha sido probado. En algunos brotes de agua potable *Arcobacter* ha sido aislado de los pacientes y/o del agua contaminada. Además, las especies de *Arcobacter* se han definido como agentes zoonóticos potenciales debido a su función patógena en humanos y animales (Collado y Figueras, 2011).

La mayoría de las especies descritas hasta la fecha han sido aisladas de mariscos, ganado, ambientes marinos y aguas residuales (Banting y Figueras, 2017).

1.2.7.1 Transmisión por alimentos.

Se ha demostrado que las bacterias del género *Arcobacter* pueden tolerar concentraciones altas de cloruro de sodio, así como la desecación; pueden crecer a temperaturas de refrigeración y tienen la capacidad de unirse a distintos tipos de superficies. Además, en un estudio llevado a cabo por Ferreira et al. (2013), la mayoría de las cepas (72,2 %) mostraron la capacidad de formar biopelículas con un alto grado de resistencia a varios antibióticos, lo que podría explicar la persistencia de *Arcobacter* en la cadena alimentaria (Bayas, 2016)

Se ha encontrado *Arcobacter spp.* en diferentes tipos de alimentos de origen animal. La incidencia en leche de ganado vacuno oscila entre el 3,2 % y el 46,0 % de las muestras. Además, en un estudio en 13 granjas de vacas y una granja autorizada a vender leche cruda en Bolonia, Italia, se encontró *Arcobacter* en 7 granjas de vacas y en una granja de búfalos, así como en quesos frescos. Diversos estudios también han investigado los productos cárnicos, encontrando incidencias de entre el 14 % y el 53 % en carne de cerdo, del 16,9 % al 46,8 % en carne de ternera, y del 10 % en la carne de conejo. Los resultados de estos estudios sugieren que la contaminación de los productos cárnicos ocurre probablemente por

contaminación cruzada de las canales con las heces de los animales durante el faenado en el matadero (Collado y Figueras, 2011).

El género *Arcobacter* ha sido aislado de muestras del tracto intestinal y muestras de heces de diferentes animales de granja tales como pollos, vacas y cerdos, también en otros animales domésticos y salvajes, como perros, peces, moluscos, tortugas, avestruces, monos, mapaches y alpacas (Calvo et al., 2013).

Aunque aún son pocos los estudios que han evaluado el potencial de transmisión de los moluscos y otros alimentos marinos, parece que podrían actuar como una importante fuente de transmisión de cepas virulentas, dado que a menudo son consumidos poco cocinados o crudos, y harían falta más estudios para determinar el papel real de estos alimentos en la infección por *Arcobacter* (Bayas, 2016).

1.2.7.2 Transmisión por agua.

Las aguas de mar son consideradas el hábitat natural para muchas especies del género *Arcobacter*, *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, y *A. skirrowii* son significativamente más prevalentes en el agua que está fecalmente contaminada (Collado y Figueras, 2011), y el hecho de que en los últimos años un gran número de nuevas especies hayan sido aisladas inicialmente de moluscos, probablemente se deba a que éstos son grandes filtradores de agua. El agua residual también ha sido propuesta como otro reservorio importante de este género. De hecho, las aguas residuales han dado origen al descubrimiento de nuevas especies, como *A. defluvii* en 2011 y *A. faecis* en 2015 (Bayas, 2016).

Por otra parte, estudios de prevalencia de *Arcobacter* en distintos tipos de aguas han revelado la presencia de este microorganismo en aguas subterráneas, residuales, de ríos, lagos y mares. Se han descrito al menos tres brotes infecciosos asociados al consumo de agua contaminada por *Arcobacter*. La alta prevalencia de estos microorganismos en diferentes tipos de aguas ha hecho suponer que las especies de *Arcobacter* podrían ser autóctonas de ambientes acuáticos. Sin embargo, en todos los casos de brotes el agua potable presentaba contaminación fecal, por lo que su verdadero origen aún no ha podido ser totalmente probado

1.2.8 Especies género *Arcobacter*.

Hasta la fecha se han reportado las siguientes especies de *Arcobacter* con una significativa diversidad genética entre especies:

Tabla 4: Descripción de especies de *Arcobacter*.

<i>A. butzleri</i>	<i>A. ellisii</i>
<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. venerupissp</i>
<i>A. skirrowii</i>	<i>A. bivalviorum</i>
<i>A. nitrofigilis</i>	<i>A. ebronensis</i>
<i>Candidatus Arcobacter sulfidicus</i>	<i>A. marinus</i>
<i>A. halophilus</i>	<i>A. trophiarum</i>
<i>A. cibarius</i>	<i>A. defluvii</i>
<i>A. thereius</i>	<i>A. cloacae</i>
<i>A. mytili</i>	<i>A. suis</i>
<i>A. molluscorum</i>	<i>A. pacificus</i>
<i>A. aquimarinus</i>	<i>A. lanthieri</i>
<i>A. anaerophilus</i>	<i>A. lekithochrous</i>
<i>A. acticola sp. Nov</i>	

Fuente: (Ramees et al., 2017)

Elaborado por: El autor.

De ellas, cuatro *Arcobacter butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* y *A. thereius* han sido aisladas de cuadros infecciosos del ser humano, particularmente de cuadros entéricos, siendo *A. butzleri* la especie más frecuentemente aislada, tanto de procesos infecciosos, como de reservorios, de muestras ambientales y de alimentos de origen animal (Heriberto Fernandez & Jaramillo, 2016). Además de *A. cibarius* que es considerado como un patógeno emergente de origen alimentario (Ramees et al., 2017).

A continuación, se detalla algunas de las especies del género *Arcobacter* y que por sus características son de mayor importancia epidemiológica:

1.2.8.1 *Arcobacter butzleri*.

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



Figura 2. *Arcobacter butzleri*. Colonias en agar sangre.
Fuente:(Fernández y Jaramillo, 2016).
Elaborado por: El autor

La identificación fenotípica de *A. butzleri* es dificultosa debido a su escasa actividad metabólica y las pocas pruebas que se pueden utilizar, a su vez, no dan resultados bien definidos y pueden conducir a resultados erróneos. Por ello, se prefiere utilizar la identificación molecular, tanto para determinar género como especie. Existe consenso que para aislar *A. butzleri* se requiere como paso inicial un período de enriquecimiento de 24 a 48 h en un caldo conteniendo antimicrobianos y sangre, con posterior resiembra a un medio selectivo. La incubación es de hasta 72 horas, entre 25 y 30° C y puede hacerse tanto en aerobiosis como en microaerofilia (Fernandez y Jaramillo, 2016).

1.2.8.2 *Arcobacter skirrowi*.

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

1.2.8.3 *Arcobacter cryaerophilus*.

A. cryaerophilus es la especie de *Arcobacter* predominantemente asociada a casos de aborto en animales. Se aislado de pacientes con cáncer, fallo renal y hasta en pacientes con hiperuricemia y alcoholismo. También se ha aislado en Suiza a partir de muestras de heces de trabajadores de mataderos, sin síntomas de infección. Dentro de esta especie se encuentran dos grupos denominados 1A y 1B o 1 y 2, los cuales se han separado mediante diferentes RFLP (restriction fragment length polymorphisms) de los genes 16s y 23s, además del contenido total de proteínas celulares y ácidos grasos. El grupo 1A es el más prevalente.

No obstante, ambos grupos han sido aislados simultáneamente en muestras de alimentos y en muestras clínicas de animales y humanos. Algunos estudios han planteado la necesidad de separar estos dos grupos en dos especies (Calvo et al., 2013).

1.2.8.4 *Arcobacter thereius*.

Aislado en el año 2009 en Dinamarca por Houf, y colaboradores (Calvo et al., 2013). Son gram negativos aislados, ligeramente curvados, no capaces de degradar la urea, la formación de esporas, la oxidasa, la catalasa y la reducción de nitrato positivo, es generalmente lento y difícil de cultivar in vitro y ha preocupado a muchos investigadores desde entonces. La especie *Arcobacter thereius* se ha aislado primero de tejido de lechones abortados, heces de pato y de cerdo, y recientemente de heces de pacientes humanos con enteritis (Rovetto, Van den Abeele, Van Nieuwerburgh y Houf, 2017).

1.2.8.5 *Arcobacter cibarius*.

Descrita en el 2005 por Houf, fue aislada de carne de pollos en Bélgica. Comparaciones del gen 16S ARNr revelan similitudes del 97,5% con *A. cryaerophilus* y un 96,5% con respecto a *A. butzleri* (Calvo et al., 2013). Las bacterias son ligeramente curvas, bacilos gram negativos que son de 1-5 mm de largo y 0- 5 mm de ancho. Su forma es convexa y blanquecina, liso-redondeado con márgenes enteros de alrededor de 2 mm de diámetro. En agar sangre después de 72 horas de incubación a 28 °C en condiciones de microaerobiosis las cepas se forman translúcidas a opacas con colonias de 1 a 2 mm de diámetro (Sons y Wiley, 2017).

1.2.9 Patogenia.

La patogenicidad y los mecanismos de virulencia de *Arcobacter* no han sido estudiados a profundidad y aun no son comprendidos en su totalidad, a pesar de que varios estudios han intentado demostrar la capacidad de adherencia, de invasión y la citotoxicidad de esta bacteria en varias líneas celulares (Calvo et al., 2013). Sólo unos pocos estudios han intentado explorar los mecanismos patogénicos asociados con *Arcobacter*. Estudios de cultivos celulares in vitro de origen animal y humano revelaron que *Arcobacter* puede adherirse a células eucarióticas, invadir y producir toxinas resultando en daño a las células huésped. Adhesión e invasión de las bacterias a las células huésped son esenciales para el éxito de la colonización y el establecimiento de la infección (Kolling et al., 2012), que podría ser responsable de la naturaleza patogénica potencial de varios *Arcobacter* (Ramees et al., 2017).

El mecanismo responsable de la diarrea inducida por *A. butzleri* fue explorado por Bucker et al. (2009), en la que se demostró que estaba relacionada con el deterioro funcional de la

barrera epitelial en células de carcinoma de colon humano (HT-29/B6), mejorando la permeabilidad macromolecular a través de la vía paracelular y disminuyendo la resistencia epitelial. Durante la infección por *Arcobacter* se observó alteración en la composición y distribución de la proteína de unión estrecha, con disminución de la expresión de proteínas asociadas al sellado, a saber, claudin-1, claudin-5 y claudin-8, que podrían ser responsables de la diarrea inducida por la infección de *A. butzleri* a través del mecanismo de flujo de fugas (Ramees et al., 2017).

1.2.9.1 Mecanismo de Virulencia.

Los mecanismos de patogenicidad y virulencia de las especies *Arcobacter* son aún poco conocidos, a pesar de existir varios estudios que analizan su capacidad invasiva, de adherencia y citotoxicidad en varias líneas celulares, como CHO, Vero, HeLa e INT 407. En conjunto, estos estudios han mostrado grandes diferencias en la capacidad de adhesión, invasión, y la citotoxicidad de las cepas de *Arcobacter*. Los investigadores han llegado a la conclusión de que las diferencias observadas pueden ser debidas al origen de las cepas (ambientales frente a clínicas), así como a las diferentes líneas celulares utilizadas en los estudios (Bayas, 2016).

La capacidad patógena in vitro se ha demostrado principalmente para *A. cryaerophilus* y *A. butzleri*, siendo esta última la especie más invasiva, con efectos citotóxicos en células CHO y Vero y en animales infectados experimentalmente. En un reciente estudio desarrollado por Karadas et al. (2016), en el que se comparaba la patogenicidad de cepas de humanos con las aisladas de porcino, los autores demostraron que *A. butzleri* se adhiere e invade líneas celulares humanas de diferentes orígenes, tales como las células del colon HT-29/B6 (Collado y Figueras, 2011).

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

1.2.9.2 Mecanismo de adherencia y ataque.

A. butzleri tiene capacidad de adherencia al epitelio, que causa una disfunción de la barrera epitelial induciendo cambios en las proteínas de unión estrecha (tight junction proteins), además de inducir la apoptosis epitelial, con lo cual produce una diarrea tipo fuga de flujo. Se ha sugerido que este microorganismo tiene el potencial de invadir otras partes del cuerpo y producir complicaciones, ya que se ha aislado de pacientes con cirrosis hepática y apendicitis

gangrenosa aguda (Calvo et al., 2013). También se ha demostrado el efecto citotóxico sobre células Vero, probablemente debido a la producción de citotoxinas vacuolizantes (Bayas, 2016).

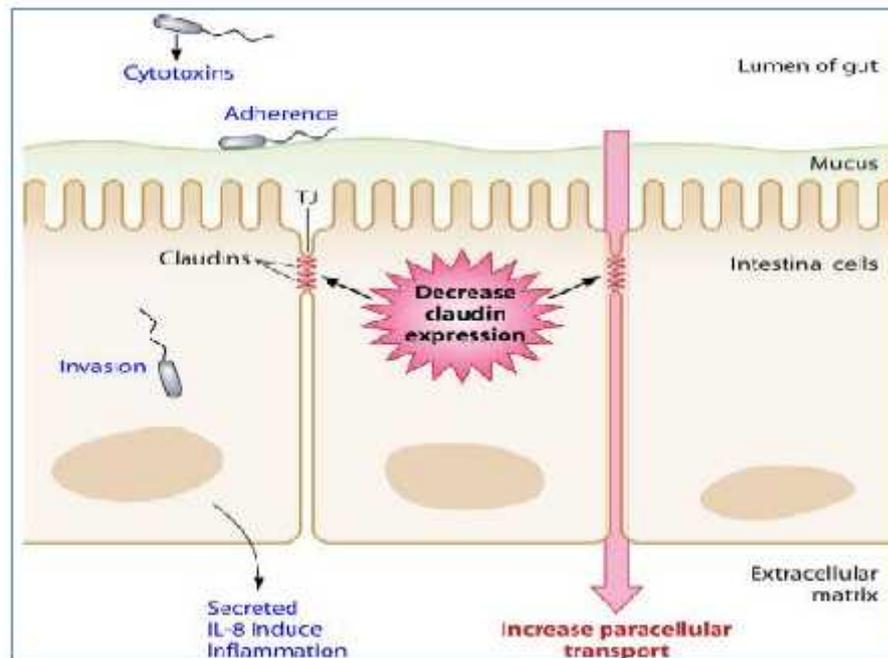


Figura 3. Mecanismos de virulencia descritos para *Arcobacter*.
 Fuente: (Collado y Figueras, 2011).
 Elaborado por: El autor.

Las *Arcobacterias* han mostrado la capacidad para producir citotoxicidad, adherencia, invasión, e inflamación mediada por interleukin-8 (IL-8), con la disfunción de la barrera epitelial y el concomitante aumento en el transporte de la paracelular, han demostrado que *A. butzleri* es un candidato en humanos a colonizar el epitelio y producir densidad de flujo (diarrea) (Collado y Figueras, 2011).

1.2.10 Manifestaciones clínicas.

Arcobacter en enfermedades humanas aún no está bien establecido, *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* y *A. thereius* se han asociado con enfermedades gastrointestinales, tanto en estudios de población como en casos clínicos. Estas especies han sido aisladas de muestras fecales de personas con diarrea, y en personas con bacteriemia, endocarditis y peritonitis. Sin embargo, existen informes sobre la existencia de portadores asintomáticos de especies de *Arcobacter*, con lo cual persisten las incógnitas sobre el potencial patógeno de este género bacteriano (Bayas, 2016).

La gravedad del cuadro clínico en las infecciones por *Arcobacter* es muy variada. El síntoma principal es la diarrea acuosa persistente, en contraste con la diarrea inflamatoria encontrada en los casos de infección por *Campylobacter jejuni*. Las manifestaciones clínicas, sin embargo, pueden ir desde infecciones asintomáticas o diarreas leves, hasta diarreas crónicas y abundantes, que exigen hospitalización (Bayas, 2016).

1.2.11 Actividad antimicrobiana.

Al igual que con *Campylobacter*, la mayoría de los casos de enteritis y bacteriemia causada por *Arcobacter* parecen ser autolimitantes y no requieren tratamiento antimicrobiano. Sin embargo, la gravedad o prolongación de los síntomas puede justificar el uso de tratamiento antibiótico. Diferentes técnicas han sido utilizadas para establecer su comportamiento frente a los antimicrobianos; como aún no existe un método estandarizado y tampoco se cuenta con puntos de corte, se han utilizado como referencia aquellos propuestos por el CLSI y EUCAST para *Campylobacter* u otros patógenos intestinales (Fernandez y Jaramillo, 2016), es decir, E-test, dilución en agar, difusión en agar disco o microdilución en caldo (Collado y Figueras, 2011).

Los resultados han demostrado que muchas cepas de *A. butzleri* son resistentes a clindamicina, azitromicina, ciprofloxacina, metronidazol, carbenicilina y cefoperazona. Se han sugerido fluoroquinolonas y tetraciclina para el tratamiento de infecciones humanas y animales producidas por *Arcobacter*, porque mostraron buena actividad contra cepas de varios orígenes. Sin embargo, se han detectado cepas resistentes al ácido nalidíxico y a la ciprofloxacina (Collado y Figueras, 2011).

Hasta ahora se había demostrado que dos cepas de *A. butzleri* y una cepa de *A. cryaerophilus* resistentes a la ciprofloxacina (con CIMs que hiban de 6 a 12 mg ml⁻¹) muestran una mutación en la quinolona determinante de la resistencia del gen *gyrA*, que también podría estar presente en otras cepas. Por otra parte, la cepa de *A. butzleri* (RM4018) a partir de la cual se secuenció el genoma completo mostró una alta resistencia a los antibióticos asociada con la presencia o ausencia de genes específicos que regulan la susceptibilidad a los antibióticos. Con respecto a esto, la presencia del gen *cat* (que codifica una O-acetiltransferasa de cloranfenicol) estaba relacionada con la resistencia al cloranfenicol, tres genes putativos de beta - lactamasa o el operón *IrgAB* estaban asociados con la resistencia a beta - lactama y la ausencia del gen *upp* (que codifica uracilo fosforribosiltransferasa) se asoció con la resistencia a 5-fluorouracilo (Collado y Figueras, 2011).

Es importante señalar que sólo ha habido algunos estudios de susceptibilidad antimicrobiana con cepas clínicas de *Arcobacter* recuperadas de casos humanos o animales y en ausencia de un tratamiento específico recomendado, el tratamiento es empírico. Se ha sugerido que las infecciones producidas por *Arcobacter spp.* probablemente requieren un tratamiento diferente al aplicado a las infecciones producidas por las especies comunes de *Campylobacter* (Collado y Figueras, 2011). Por lo tanto, es necesario seguir realizando muchas más pruebas con el fin de establecer el tratamiento más adecuado en cada caso específico.

CAPITULO II
MÉTODOS

2.1 Muestreo.

Durante el periodo mayo-julio se recolectó 110 muestras fecales humanas con y sin diarrea, de las cuales 50 muestras correspondieron a niños menores de 5 años de los centros de Salud del Distrito N°1 de la ciudad de Loja, 30 muestras a personas mayores de 65 años de la “Casa Hogar Betania” y 30 muestras a niños menores de 5 años del centro infantil del Buen Vivir “Caritas de Ángel” de la provincia de Zamora Chinchipe.

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología de la Sección Genética Humana y Bioquímica Clínica del Departamento Ciencias de la Salud de la Universidad Técnica Particular de Loja (**Figura 4**).

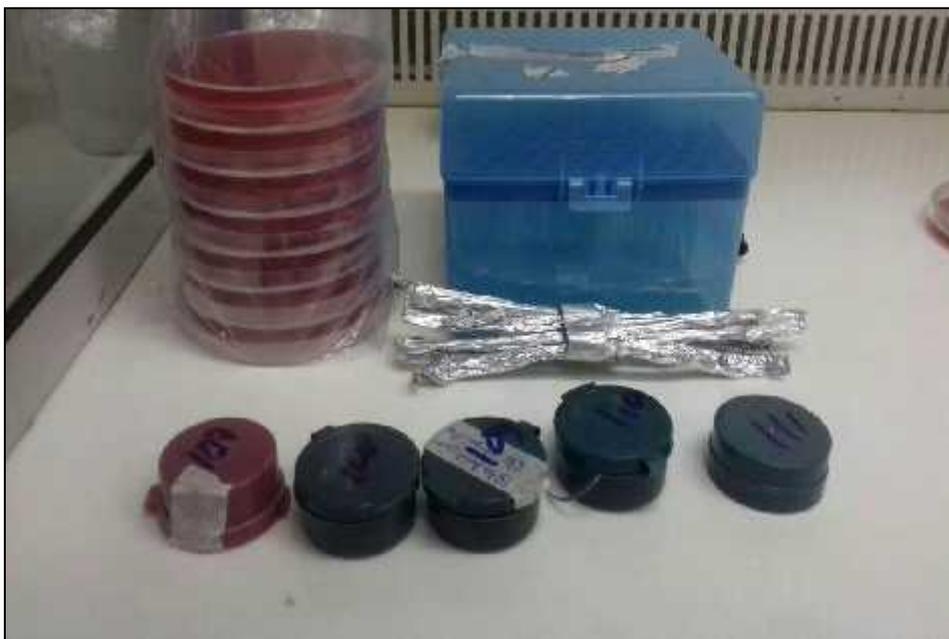


Figura 4. Procesamiento de muestras fecales.

Fuente: El autor.

Elaborado por: El autor.

2.2 Aislamiento.

2.2.1 *Campylobacter*.

Para el aislamiento de las especies del género *Campylobacter* se sembró en el medio de cultivo presentadas en la (**Tabla 5**) y se utilizó las siguientes condiciones de incubación.

Tabla 5. Condiciones para el aislamiento de *Campylobacter* y *Arcobacter*.

	<i>Campylobacter</i>	<i>Arcobacter</i>
Medio de cultivo	Agar sangre 5 % con suplemento selectivo Butzler más extracto de levadura al 1 % (Anexo 1).	Caldo de enriquecimiento Figura 5 suplementado con sangre y solución antibiótica de Houf modificada (Anexo 3). Agar sangre 5 % más extracto de levadura al 1 %.
Temperatura de Incubación	42 - 43 °C	30 °C
Tiempo de Incubación	48 horas	48-72 horas
Atmósfera de Incubación	Microaerofilia (10 % O ₂ , 5 % CO ₂ , N ₂) para balance Anaerobiosis	Aerobiosis

Fuente: (Calvo et al., 2013; Fernández et al., 2016)

Elaborado por: El autor.

2.2.2 *Arcobacter*.

Para el aislamiento de las especies del género *Arcobacter* se sembró en las condiciones de incubación presentada en la (**Tabla 5**).



Figura 5. Inoculación en caldo de enriquecimiento.

Fuente: El autor.

Elaborado por: El autor.

Pasado las 72 horas de incubación en el caldo de enriquecimiento, se sembró en el medio de cultivo Agar sangre enriquecido con extracto de levadura al 1 % y utilizando el método de

filtración pasiva a través de una membrana de triacetato de celulosa de 47 mm de diámetro y 0,45 um de porosidad (**Figura 6**), se incubó en aerobiosis por 48 a 72 horas a 30 °C.



Figura 6. Filtración pasiva
Fuente: El autor
Elaborado por: El autor

2.3 Identificación fenotípica.

2.3.1 *Campylobacter*.

Para la identificación del género *Campylobacter* se realizó la tinción de Hucker y Gram para observar la morfología característica de bacilos en forma de alas de gaviota, además de realizarse las pruebas de catalasa, oxidasa e hidrólisis de hipurato (**Anexo 7**).

2.3.2 *Arcobacter*.

Para el género *Arcobacter* se realizó un frotis a las colonias sospechosas, donde se observó bacilos gram negativos, cortos o ligeramente curvos en forma de S o espiral y de igual forma se evaluó la actividad catalasa, oxidasa (**Anexo 7**) y el crecimiento en Agar MacConkey (**Anexo 3**).

2.4 Identificación genotípica.

2.4.1 Extracción de ADN.

La extracción de ADN se realizó utilizando el Kit de extracción Wizard® Genomic DNA Purification (**Anexo 9**).

2.4.2 Reacción en cadena de la Polimerasa PCR-Múltiplex.

2.4.2.1 *Campylobacter*.

Para la identificación molecular del género *Campylobacter* se utilizó la técnica de la PCR-Múltiplex (**Anexo 2**) descrita por (Yamazaki et al., 2007) (**Tabla 6**).

Tabla 6. Secuencias de primers de la PCR-Múltiplex utilizadas en la identificación de género y especies de *Campylobacter*.

ESPECIES	TAMAÑO (pb)	GEN	PRIMER	SECUENCIA (5' a 3')
Género <i>Campylobacter</i>	816	16S rRNA	C412F	5'-GGATGACACTTTTCGGAGC-3'
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	611	23S rRNA	C1228R* HYO1F	5'-CATTGTAGCACGTGTGTC-3' 5'-ATAATCTAGGTGAGAATCCTAG-3'
<i>C. coli</i>	502	AskI	HYOFET23SR CC18F CC519R	5'-GCTTCGCATAGCTAACAT-3' 5'-GGTATGATTTCTACAAAGCGAG-3' 5'-ATAAAAGACTATCGTCGCGTG-3'
<i>C. fetus</i>	359	CstA	MG3F CF359R	5'-GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT-3', 5'-AGCCAGTAACGCATATTATAGTAG-3'
<i>C. lari</i>	251	GlyA	CLF CLR	5'-TAGAGAGATAGCAAAAGAGA-3' 5'-TACACATAATAATCCCACCC-3'
<i>C. jejuni</i>	161	cj041 4s	C1 C3	5'-CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT-3' 5'-CCATAAGCACTAGCTAGCTGAT-3'
<i>C. upsaliensis</i>	86	LpxA	CU61F CU146R	5'-CGATGATGTGCAAATTGAAGC-3' 5'-TTCTAGCCCCTTGCTTGATG-3'

Fuente: (Yamazaki et al., 2007).

Elaborado por: El autor.

Los amplicones generados en la PCR-Múltiplex se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % utilizando un marcador de peso molecular de 100 bp (Fernández et al., 2016).

2.4.2.2 *Arcobacter*.

Para el género *Arcobacter* se utilizó la técnica de la PCR-Múltiplex (**Anexo 4**) descrita en el 2010 por Doudah (**Tabla 7**).

Tabla 7. Secuencias de primers de la PCR-Múltiplex utilizadas en la identificación de género y especies de *Arcobacter*.

ESPECIES	TAMAÑO (pb)	GEN	PRIMER	SECUENCIA (5' a 3')
<i>A. butzleri</i>	2061	23S rRNA	ButR	5-TCCTGATACAAGATAATTGTACG-3
<i>A. theaeus</i>	1590	23S rRNA	TherR	5-GCAACCTCTTTGGCTTACGAA-3
<i>A. cibarius</i>	1125	23S rRNA	CibR	5-CGAACAGGATTCTCACCTGT-3
<i>A. skirrowii</i>	198	23S rRNA	SkiR	5-TCAGGATACCATTAAAGTTATTGATG-3
<i>A. cryaerophilus</i>	395	Gyrase A	GyrasF GyrasR	5-AGAACATCACTAAATGAGTTCTCT-3 5-CCAACAATATTTCCAGTYTTTGGT-3

Fuente: (Doudah et al., 2010).
Elaborado por: El autor.

Se utilizó un gel de agarosa al 2 % y las bandas generadas se revelaron en un transiluminador de UV (Doudah, De Zutter, Vandamme, & Houf, 2010) **(Anexo 10)**.

Adicionalmente, se consideraron cepas control para las especies *C. jejuni*, *C. coli*, *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* las cuales fueron proporcionadas por el Instituto de Microbiología Clínica de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile.

2.5 Determinación de la actividad antimicrobiana.

Se realizó mediante el método de difusión por disco (método Kirby – Bauer) en agar Muller-Hinton **(Anexo 6)** enriquecido con sangre al 5 %. Se probaron 5 antibióticos: eritromicina (macrólido), gentamicina (aminoglucósido), ciprofloxacina (fluoroquinolona), ampicilina (penicilina) y tetraciclina (tetraciclinas) (Fernández et al., 2016).

Tabla 8. Puntos de corte según el SFM y EUCAST 2017.

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

Fuente: (SFM y EUCAST, 2017).
Elaborado por: El autor.

La interpretación de los resultados para *Campylobacter* se llevó a cabo en base a los puntos de corte establecidos por el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad según el SFM y EUCAST (2017); las mismas se usaron para *Arcobacter* ya que en la actualidad no se han desarrollado puntos de corte estandarizados para la evaluación de la susceptibilidad de esta bacteria (**Tabla 8**).

CAPITULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Identificación de *Campylobacter* en población de Loja y Zamora Chinchipe.

Los datos presentados en el presente estudio demuestran que de las 110 muestras analizadas se presentó una prevalencia del 3,63 % (Tabla 9).

Tabla 9. Prevalencia de *Campylobacter* en población pediátrica y geriátrica de Loja y Zamora Chinchipe.

Población de estudio	<i>Campylobacter</i>	Muestras diarreicas	Muestras no diarreicas	%	N° de muestras
Centros de Salud del Distrito N°1 - Loja.	3	3	0	6	50
Centro infantil del Buen Vivir "Caritas de Ángel". Zamora Chinchipe.	1	0	1	3.3	30
"Casa Hogar Betania". Zamora Chinchipe.	0	0	0	0	30
TOTAL	4	3	1	3,63	110

Fuente: El autor.

Elaborado por: El autor.

Existen datos reportados en todos los continentes, así por ejemplo en Europa y Norte América la prevalencia es alta en relación a los presentados en esta investigación; en países como Inglaterra y los Estados Unidos constituye la mayor cantidad de casos de gastroenteritis (Mardones y López, 2017) y en este último representa un 41,7 % de prevalencia, en Portugal también se reportan porcentajes altos con el 31.9 % (Kaakoush et al., 2015).

En los Países Bajos entre marzo y abril de 2011, se reveló que el 71.4 % de los 493 casos de gastroenteritis estudiados fueron positivos para *Campylobacter* (Kaakoush et al., 2015).

Sin embargo, existen otros estudios donde se presentan prevalencias muy cercanas como el realizado en la India, en un hospital de enfermedades infecciosas en Calcuta donde se informó que, en el período de enero 2008 a diciembre 2010 el 7,0 % (222/3.186 muestras) de pacientes hospitalizados con gastroenteritis dieron positivo para *Campylobacter*. Además otra investigación reportó también que el 16,2 % (11/68 muestras) de muestras de heces diarreicas de pacientes en la misma región dio positiva para *Campylobacter*, y que la mayor prevalencia estaba en niños menores de 5 años (Kaakoush et al., 2015).

En Asia y Medio Oriente los datos epidemiológicos sobre *Campylobacter* son limitados, pero una investigación de la etiología de gastroenteritis en tres hospitales en Yangzhou China a

menores de 7 años entre julio de 2005 y diciembre del 2006 demostró una prevalencia del 4.84 %, otro estudio en un hospital en Beijing China entre el 2005 y 2009 reveló una prevalencia mayor del 14.9 % (Kaakoush et al., 2015).

E. coli, *Salmonella* y *Shigella* en América Latina son los patógenos importantes de diarrea (Mardones y López, 2017), pero *Campylobacter* se mantiene muy cercano con una prevalencia importante, así lo demuestran los porcentajes en países como Argentina con el 6,1 % (Fernández, 2015), aunque otros estudios en este mismo país revelan porcentajes hasta el 15,2 % (Tamborini et al., 2012).

En Perú se presenta una prevalencia del 15,0 a 23 %, Colombia 16,8 %, Uruguay 14,3 % (Mota, 2010), Chile 12 % (Martinez, 2008) y 14,1 % (Fernández, 2015), Brasil 11,2 %, Bolivia 10,5 %, Venezuela 9,2 a 9,6 % y Ecuador 7,5 a 10 % (Fernández, 2015).

En Paraguay, en la comunidad del Chaco central en un estudio realizado a pacientes entre 2 meses y 16 años de edad, *Campylobacter* se establece en un 4,19 % de prevalencia (Da Silva, 2011) dato muy cercano a los reportados en el presente trabajo.

En Ecuador, en el Hospital Manuel Ignacio Monteros de la ciudad de Loja se presentó una prevalencia similar del 6,8 % en el 2014 (Narvaez, 2014), y 5,2 % en el 2016 (Cabrera, 2016), en el Hospital Regional Isidro Ayora, 8 % en el 2014 (Cuenca, 2015) y 7,60 % en el 2016 (Villavicencio, 2016) y en el Hospital del día el 9 % en el 2014 (Cuenca, 2014).

Estos datos de prevalencia de *Campylobacter* presentados en la población de Loja mantiene porcentajes similares al del presente estudio, sin embargo, esta investigación estableció en la población de Zamora Chinchipe una prevalencia más baja, por lo que sería interesante ampliar estos datos estadísticos direccionando más estudios en esta población.

Además de los datos de prevalencia de *Campylobacter* en seres humanos realizados en el Sur del Ecuador, también existen otros estudios realizados en animales como en perros donde se reportó una prevalencia del 10 % (Nuñez, 2016), en pollos de traspatio, en el cual se incluyó a población avícola de Vilcabamba, Loja y Zamora se presentó una prevalencia del 41,5 %, 37,5 % y 44,7 % respectivamente (Fernández, 2016).

Porcentajes que indudablemente son mayores, principalmente en pollos donde siendo estas aves un alimento de consumo diario se debe tomar en cuenta las altas prevalencias que existen ya que puede también ser la mayor fuente de infección al ser humano.

Otro grupo de estudio fueron los adultos mayores a 65 años de la población de Zamora Chinchipe donde no se observó presencia de *Campylobacter*, por lo que esta investigación

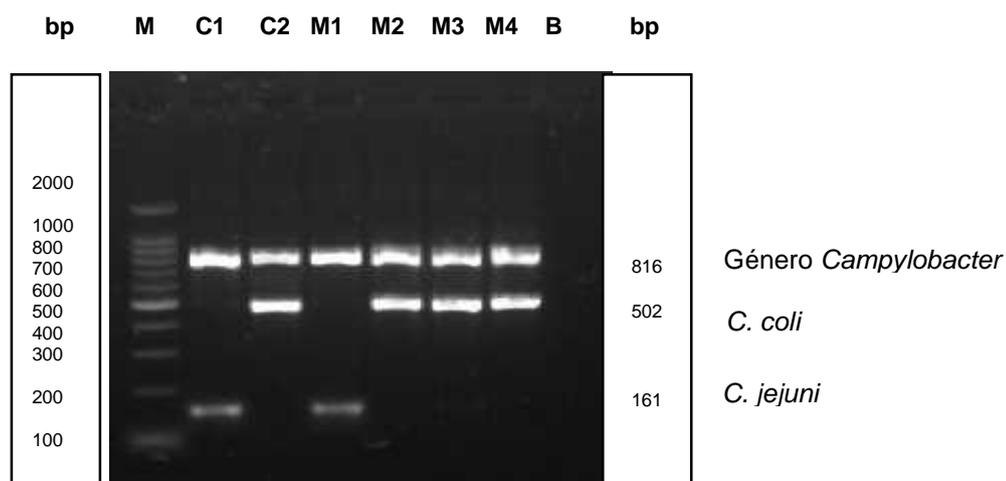
evidencia que la mayor prevalencia de este enteropatógeno se presenta en niños de corta edad.

Así lo demuestran diferentes estudios, como en Dinamarca donde una investigación presentó mayor frecuencia de *Campylobacter* en niños pequeños (1 a 4 años) y en adultos jóvenes (15 a 24 años) (Kaakoush et al., 2015), aunque es necesario mencionar que *Campylobacter* es de distribución mundial y afecta a todas las razas, edades y sexos (Fernández, 2015).

Estos datos de prevalencia de *Campylobacter*, demuestran que esta bacteria sigue siendo de gran importancia en Salud Pública, por lo que se debería establecer políticas claras de salud en cuanto a detección y prevención de este enteropatógeno.

3.2 Especies del género *Campylobacter* en población de Loja y Zamora Chinchipe.

Mediante técnica moleculares se identificaron las especies de *Campylobacter* evidenciándose bandas que se muestran en la (Figura 7).



Representa el análisis molecular de género y especies de *Campylobacter*. **bp**: Pares de bases; **M**: Marcador de peso molecular; **C1**: Control positivo *C. jejuni*; **C2**: Control positivo *C. coli*; **M1-M4**: muestras; **B**: Blanco

Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % para especies de *Campylobacter*.

Fuente: El autor

Elaborado por: El autor.

Es así, que al aplicar métodos fenotípicos y genotípicos se llegó a identificar a las especies *C. jejuni* y *C. coli*, siendo esta última la especie de mayor prevalencia (Tabla 10); estos resultados confirman los datos bibliográficos que mencionan que desde 1970 estas dos especies han sido aisladas de una amplia gama de aves silvestres y domesticadas (Sheppard

y Maiden, 2015), además de ser reconocidas en los seres humanos como las especies de *Campylobacter* mas importantes causantes de gastroenteritis (Hernández et al., 2013).

Tabla 10. Prevalencia de especies de *Campylobacter* en población de Loja y Zamora Chinchipe.

Población de estudio	<i>C. jejuni</i>	%	<i>C. coli</i>	%
Centros de Salud del Distrito N°1 - Loja.	1	33,3	2	66,7
Centro infantil del Buen Vivir "Caritas de Ángel". Zamora Chinchipe.	0	0	1	100
"Casa Hogar Betania". Zamora Chinchipe.	0	0	0	0
TOTAL	1		3	

Fuente: El autor.

Elaborado por: El autor.

C. jejuni es la especie que se ha establecido como la principal causante de gastroenteritis en los países desarrollados, así lo demuestra el *Institute of Food Research* que menciona, que la especie más aislada y asociada con la enfermedad infecciosa intestinal es *C. jejuni* (>50%), mientras que 10-15% de los casos lo atribuyen a *C. coli*.

La mayoría de lo que se conoce sobre estas especies proviene de aislamientos obtenidos de seres humanos, de la cadena alimentaria, la agricultura y el ambiente; y entres sus datos de prevalencia como en el Reino Unido y los Estados Unidos representa el 90 % de los casos para *C. jejuni* y el 10 % para *C. coli* (Sheppard y Maiden, 2015).

Otros estudios revelan porcentajes similares, así en el Sur de Irlanda en una investigación para siete miembros del género *Campylobacter* se reveló que *C. jejuni* era la especie predominante, la misma que representó el 66 % de todas las especies detectadas, mientras tanto que *C. coli* mostró el 6.7 % (Kaakoush et al., 2015), en el sudoeste de Alberta, Canadá, el 36.9 % y el 5,4 % de los pacientes con diarrea informadas desde el 31 de mayo al 31 Octubre de 2005 fueron positivos para *C. jejuni* y *C. coli*, respectivamente (Kaakoush et al., 2015).

En Ecuador, en la ciudad de Quito en un trabajo realizado a una población infantil la especie con mayor prevalencia pertenencia a *C. jejuni* con el 30.7 % (Vasco, Graham y Trueba, 2016), en la ciudad de Loja en el Hospital Manuel Ignacio Monteros en el (2014) el 91,7 % correspondió a *C. jejuni* y el 8,3 % *C. coli* (Narvaez, 2014), y en el (2016) el 89 % a *C. jejuni* y el 11 % a *C. coli* (Cabrera, 2016).

En el Hospital Regional Isidro Ayora en el (2015) se encontró una prevalencia del 60 % para *C. jejuni* y el 40 % a *C. jejuni* mas *C. coli* (Cuenca, 2015); (2016) el 71,43 % perteneció a *C. jejuni* y el 28,57 % a *C. coli* (Villavicencio, 2016) y en el Hospital del Día (2014) el 71 % a *C. jejuni* y el 29 % a *C. coli* (Cuenca, 2014).

Estudios en otros reservorios como en aves y mamíferos consideran porcentajes similares de prevalencia en relación a estas dos especies, así por ejemplo en un estudio realizado en el sur de Chile en el 2005 menciona que las especies más frecuentemente aisladas fueron *C. jejuni* con el 25,3 % y *C. coli* con el 18 % (Fernandez, Vera y Villanueva, 2007).

Otras investigaciones realizadas en el Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Georgia (EE.UU), a pollos de engorde, identificó entre las especies más prevalentes a *C. jejuni* con el 87.6 % y *C. coli* el 12.4% (Son, Englen, Berrang, Fedorka y Harrison, 2007); el Departamento de Biotecnología de Universidad Politécnica de Valencia España publicó un trabajo realizado en pollos y agua, el cual indica que el 80 % (16/20) correspondió a *C. jejuni* y el 20 % (4/20) a *C. coli* (González, Ferrús, González y Hernández, 2007).

El presente estudio evidencia un dato interesante, ya que estableció a *C. coli* con el 66,7 % y 100 % como la especie con mayor prevalencia, y aunque esta no es la especie más común de este género, sería interesante ampliar la cantidad o el tiempo de recolección de muestras para poder así evidenciar el aumento de la prevalencia de *C. coli* en estas poblaciones; si embargo estos resultados no dejan de ser importantes ya que esta especie también es causante de un gran porcentaje de gastroenteritis en humanos.

Además, *C. coli* tiene los mismos reservorios que *C. jejuni* y ha sido aislado de humanos, pollos, perros, conejos, cuyes, vacas, agua etc, por lo que estos datos de prevalencia presentados en este estudio tanto en la población de Loja y de Zamora Chinchipe son de valiosa importancia en Salud Pública y despierta el interés de ampliar los datos estadísticos y de conocer cuáles son los medios de transmisión de este enteropatógeno.

3.3 Actividad antimicrobiana de 5 antibióticos frente a especies de *Campylobacter*.

La mayoría de las infecciones causadas por *Campylobacter* son autolimitantes y no requieren intervención terapéutica que no sea terapia de apoyo, como mantenimiento de la hidratación y equilibrio electrolítico. No obstante, los antibióticos se emplean en pacientes inmunocomprometidos, pacientes cuyos síntomas son severos o persistentes, y en aquellos con síntomas extraintestinales (Kaakoush et al., 2015).

Ciprofloxacina es la fluoroquinolona que se usa a menudo para el tratamiento empírico de la gastroenteritis. Los principales objetivos de las quinolonas en las bacterias son el DNA girasa y IV topoisomerasa, que son enzimas esenciales para la replicación, la transcripción, la recombinación y la reparación del ADN (Kaakoush et al., 2015).

Sin embargo, en el caso de campilobacteriosis, los macrólidos son la opción preferida de terapia ya que estos se unen a los nucleótidos 23S rRNA y en la subunidad 50S ribosomal, lo que resulta en el bloqueo de la etapa de translocación de la síntesis de proteínas, lo que además impide después de la formación de enlaces peptídicos la liberación de tRNA y que resulta en la terminación de alargamiento de la cadena peptídica (Kaakoush et al., 2015).

Es así, que se evaluó la actividad antimicrobiana frente a 5 antibióticos: eritromicina, gentamicina, ciprofloxacina, ampicilina y tetraciclina donde se observó una resistencia del 100 % a la ciprofloxacina y tetraciclina, el 50 % a ampicilina y el 25 % a eritromicina y gentamicina (**Figura 8**), estos resultados generan evidente preocupación porque frente a las infecciones causadas por este enteropatógeno el tratamiento terapéutico se vería limitado.

Las altas tasas de resistencia a la ciprofloxacina, es la razón del aumento de macrólidos para el tratamiento de las infecciones por *Campylobacter* (Kaakoush et al., 2015), algo que también se puede observar en este estudio ya que el porcentaje mayor de sensibilidad corresponde a eritromicina y gentamicina con un 75 %.

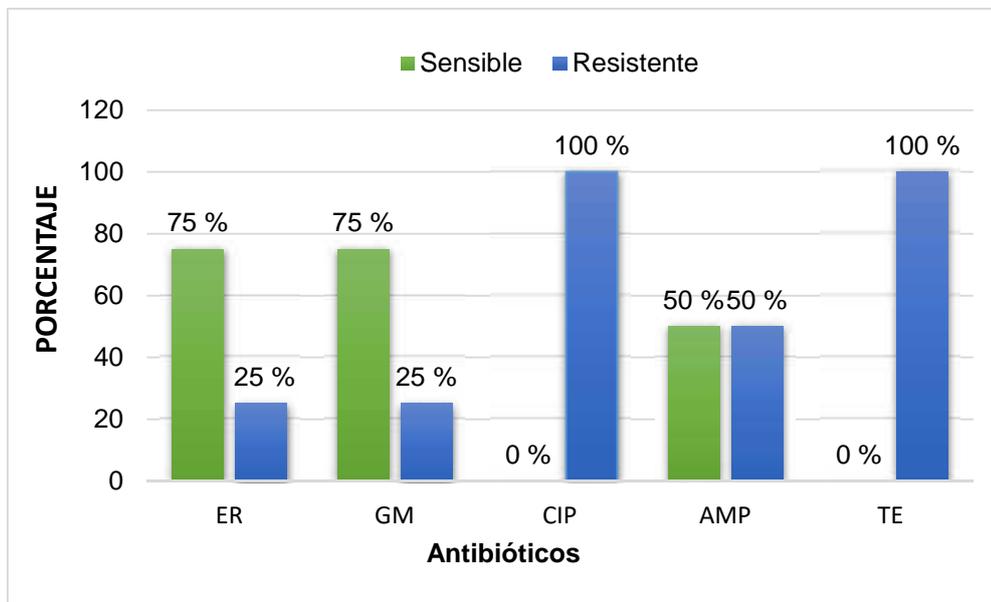


Figura 8. Actividad antimicrobiana de 5 antibióticos frente a especies de *Campylobacter*.

Fuente: El autor

Elaborado por: El auto

En un trabajo realizado en el Hospital del niño Jesús de Madrid-España, se evaluó la susceptibilidad de las cepas aisladas de muestras clínicas de niños frente a 8 antibióticos, estos datos muestran cercanía al del presente estudio y se evidencia que frente a quinolonas y tetraciclinas se presenta el 61,7 % de resistencia (Domingo, 2003).

La resistencia antibiótica adquirida por *Campylobacter* tanto para *C. jejuni* como *C. coli* se ha venido evidenciando a lo largo de muchos estudios realizados para este género, es así que en países desarrollados como los Estados Unidos, para el 2010, el 43 % de los aislamientos de *C. jejuni* de humanos eran resistentes a la tetraciclina y el 22 % a la ciprofloxacina. En el mismo año en la Unión Europea (UE), el 21 % de *C. jejuni* en humanos eran resistentes a la tetraciclina y el 52 % a las fluoroquinolonas (WHO, 2012).

En países de Sur América como Chile entre el 2002 y 2007 se evidenció que *C. jejuni* era resistente a la ciprofloxacina en 24 cepas de las 73 aisladas, es decir en un 32,4 %, y en el 2010 un 33,3 % (Rivera et al., 2011).

En Lima (Perú), el 78 % de *C. jejuni* aislado de casos clínicos demostraron ser resistentes a ciprofloxacina. En 2012, (Pollet et al., 2012) informaron que entre los años 2001 y 2010, la resistencia a las fluoroquinolonas aumentó en tres regiones del Perú, en Lima, Iquitos y Cusco donde las cepas de *C. jejuni* resistente a ciprofloxacina aumentó de 73.1 a 89.8 %, de 24.1 a 48.9 %, y de 72.6 a 82.8 % respectivamente. En el mismo período, se observaron aumentos similares en la resistencia a la ciprofloxacina entre las cepas de *C. coli*, del 48.1 al 88.4 % en Lima, desde 10 a 65.9 % en Cusco y de 19.5 a 30 % en Iquitos (Fernández y Pérez, 2016).

Buenos Aires (Argentina), el 59.6 % de las cepas de *C. jejuni* y 49.1% de *C. coli* aisladas de un hospital pediátrico también presentaron resistencia a ciprofloxacina. Otros, estudios como el realizado en la ciudad de Córdoba de este mismo país evidenció que el 74 % de las cepas de *Campylobacter* aisladas de heces diarreicas humanas durante el 2006 a 2008 fueron igualmente resistentes a ciprofloxacina (Fernández y Pérez, 2016).

Un dato importante a tener en cuenta, es que la resistencia de *C. jejuni* y *C. coli* a las fluoroquinolonas aparece inicialmente en Europa en la segunda mitad de los años 80 después de la introducción de las fluoroquinolonas en la práctica veterinaria y posteriormente aparece en muchos países industrializados y en países en vías de desarrollo; es por ejemplo que en el sur de Chile las primeras cepas resistentes aparecen en 1995 al igual que en otros países de América del Sur (Fernández, 2015).

En el Ecuador, en la provincia de Loja también se ha presentado porcentajes considerables de resistencia, en el Hospital Manuel Ignacio Monteros (2014) se reportó el 91,7 % de resistencia a la ciprofloxacina y tetraciclina (Narvaez, 2014) y en el (2016) el 67 % de resistencia a la ciprofloxacina (Cabrera, 2016).

En el Hospital Regional Isidro Ayora (2015) también se reportó el 100 % de resistencia a ciprofloxacina y el 60 % a tetraciclina (Cuenca, 2015) y en el (2016) el 86 % de resistencia a ciprofloxacina (Villavicencio, 2016), de igual manera en otro estudio realizado en el (2014) a niños del Hospital del Día se observó que el 71 % de las cepas aisladas eran resistentes a ciprofloxacina y tetraciclina (Cuenca, 2014), todos estos datos demuestran cercanía a la resistencia presentada en este estudio.

Otros datos de resistencia a considerar son los reportados en las ciudades de Loja, Vilcabamba y Zamora en pollos de patio trasero donde la resistencia a ciprofloxacina es del 62,5 al 100 % y de la tetraciclina del 80 al 100 % (Ochoa et al., 2016), información que podría sugerir que la resistencia estaría siendo adquirida desde las aves de corral provocando así un grave problema epidemiológico.

La situación es preocupante, tanto así, que la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en el año 2017 los denominados “patógenos prioritarios” resistente a los antibióticos, en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana y en el cual *Campylobacter* se ubica en la prioridad 2 “elevada” con una resistencia a las fluoroquinolonas, dato que debería despertar el interés de promover la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos que puedan combatir la creciente problemática mundial de resistencia a los antimicrobianos (OMS, 2017), además de direccionar estudios que permitan dilucidar el origen de los genotipos resistentes a estos antibióticos.

Es importante mencionar, que es muy poca la vigilancia por parte de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) referente a la resistencia a fluoroquinolonas, por lo tanto, la mayoría de los datos generados en América Latina sobre la resistencia de *Campylobacter* a son principalmente esfuerzos esporádicos por grupos académicos de investigación (Fernández y Pérez, 2016).

Este aumento de la resistencia a las fluoroquinolonas podría deberse a la infección de humanos con cepas ya resistentes. Dado que la fuente de infección humana más importante son los pollos, la emergencia de mutantes resistentes en los pollos de consumo humano podría ser el origen de la infección humana, tanto así que en América Latina está permitido el uso de quinolonas como la ciprofloxacina para el tratamiento veterinario y la alimentación de

aves (Notario et al., 2011), y ya que estas aves son un alimento de consumo diario se sugiere la posibilidad que la resistencia sea transmitida desde estos reservorios

No obstante, los datos establecidos de sensibilidad en esta investigación también son importantes, ya que revelan que eritromicina y gentamicina presentan un 75 % y un 50 % a ampicilina (**Figura 8**). Sensibilidad que comparada con otras investigaciones demuestran, por ejemplo, que eritromicina mantiene porcentajes cercanos, así en un estudio en Madrid-España este antibiótico mostró el 96,3 % de sensibilidad (Domingo, 2003), en Estado Unidos en el 2010 el 99 % y en la Unión Europea (UE) el 98 % (WHO, 2012).

En Sur América, en estudios presentados en Chile se menciona un 100 % de sensibilidad a la eritromicina (Rivera et al., 2011), en Ecuador en la población de Loja en el 2014 (Cuenca, 2015) y 2016 eritromicina y gentamicina presentaron el 100 % (Cabrera, 2016), otros estudios realizados en esta misma ciudad en el 2016, mencionan el 86 % de sensibilidad a eritromicina y el 100 % a gentamicina, porcentajes que reflejan importante cercanía a las reportadas en la presente investigación.

3.4 Identificación de *Arcobacter* en población de Loja y Zamora Chinchipe.

De las 110 muestras analizadas para el género *Arcobacter* se identificó una prevalencia del 7,27 % (**Tabla 11**).

Tabla 11. Prevalencia de *Arcobacter* en población pediátrica y geriátrica de Loja y Zamora Chinchipe.

Población de estudio	<i>Arcobacter</i>	Muestras diarreicas	Muestras no diarreicas	%	N° de muestras
Centros de Salud del Distrito N°1 -Loja	3	1	2	6	50
Centro infantil del Buen Vivir "Caritas de Ángel" - Zamora Chinchipe.	2	0	2	6.7	30
"Casa Hogar Betania" - Zamora Chinchipe.	3	0	3	10	30
TOTAL	8	1	7	7,27	110

Fuente: El autor.

Elaborado por: El autor.

Estos resultados evidencian que las poblaciones infantiles y adulta mayor de la población de Loja y Zamora muestran similar prevalencia a los reportados en EE.UU y Europa con el 8 % (Rojas, 2011), pero porcentajes mayores se observan en Sudáfrica con el 12.9 % (Calvo et al., 2013) y en Italia con el 46,5 % (Rojas, 2011); en un estudio realizado en muestras fecales

humanas entre 1991 y 2010 demuestran datos que incluyen a países como Inglaterra con porcentajes muy menores del 0,13 % y Dinamarca con el 0,1 % (Collado y Figueras, 2011)

En países como Perú, se ha identificado prevalencias de *Arcobacter* más bajas hasta del 2 % (Zerpa et al., 2014), en el sur de Chile en muestras diarreicas de niños una prevalencia del 3,6 % (Fernández, Villanueva, Mansilla, Gonzalez y Latif, 2015), en un estudio del 2008 al 2013 en Bélgica el 1,31 % (Van den Abeele et al., 2014), en Francia el 1,2 %, en Tailandia el 2,4 % (Rojas, 2011) y en la India el 2 % de prevalencia (Mohan et al., 2014), lo que refleja que los datos obtenidos son inferiores al del presente estudio.

El estado actual sobre la prevalencia de *Arcobacter* en América muestra que el patógeno ha sido reportado desde Argentina, Brasil, Chile, Costa Rica y también de México, por otro lado, el uso de varias herramientas moleculares en diferentes países como Portugal ha revelado que *Arcobacter* es más frecuente en población pediátrica (Ramees et al., 2017).

También está demostrado que la prevalencia en muestras humanas es menor en relación a otros huéspedes, así lo demuestran algunos reportes, como por ejemplo en vacunos los porcentajes de prevalencia han llegado hasta un 52,5 %, en ovejas el 40 %, en cerdos el 60 %, en gallinas el 38 %, en patos el 40 %, en pavos el 29 %, en perros el 23 % y en gatos el 61 % (Rojas, 2011).

En ganado sano de diferentes países del mundo como en Turquía el 9,5 %, en Italia el 22,2 % y en Bélgica el 39 % (Ramees et al., 2017); de sus derivados como la leche también se ha reportado datos, en un estudio realizado en una granja se identificó el 22,3 %, y en lecheros, alimento, agua, pezones de animales, y demás animales que viven en la granja (palomas y gatos) la prevalencia varía entre 15 y 83 % según la muestra (Giacometti et al., 2015).

Esta amplia gama de animales huéspedes, incluidos el ganado bovino, las aves de corral, los pequeños rumiantes, los cerdos, las aves silvestres, las mascotas portan *Arcobacter* asintóticamente y los excretan por las heces, por lo que pueden ser fuentes de contaminación de alimentos o agua y, en consecuencia, un riesgo para la salud humana (Giacometti et al., 2015).

En Perú, en un estudio de especies de mariscos se presentaron prevalencias altas: choro 24 % (12/50), langostinos 22 % (11/50) y en peces como jurel el 10 %, lisa el 6,6 % y carajito 6,6 % (Zerpa et al., 2014), datos interesantes y preocupantes ya que todos ellos son de consumo humano y pueden llegar a contaminar al ser humano.

En ambientes acuáticos, que es una posible vía de transmisión también se ha presentado estudios de este género, y al haber sido recuperados de varios ríos, lagos, aguas residuales,

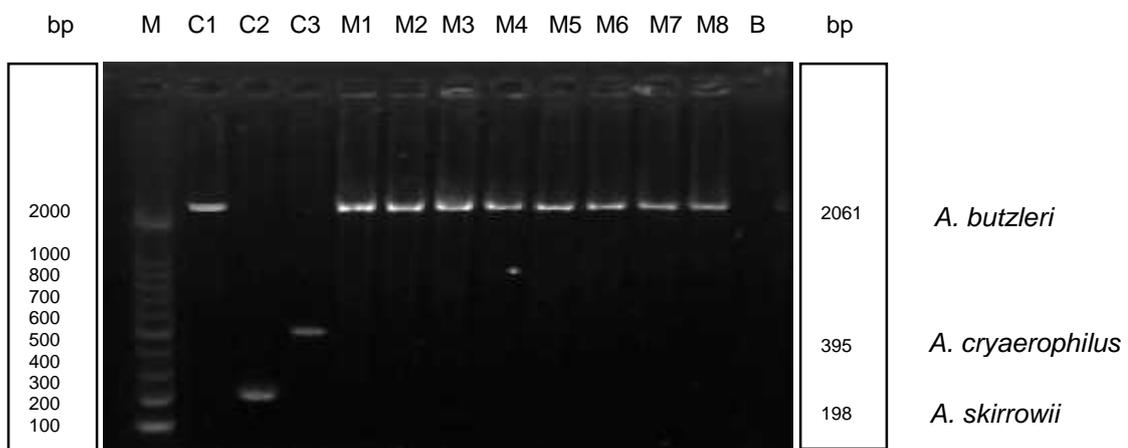
aguas subterráneas y agua de mar se plantea la hipótesis de que las especies de *Arcobacter* son autóctonas de ambientes acuáticos (Collado y Figueras, 2011).

Debido a una alta prevalencia de estas bacterias observadas en las heces de ganado se podría pensar que esas son las fuentes de contaminación del agua superficial, en donde estas especies entran al agua de mar con el agua dulce contaminada y llegan a colonizar diferentes especies marinas (Collado y Figueras, 2011), esto también tendría sentido ya que estudios han estimado que cerca del 63 % de las infecciones en humanos se debe al consumo o contacto con agua contaminada (Calvo et al., 2013).

La población de Zamora Chinchipe tiene dentro de sus actividades económicas la ganadería, la producción de leche, criaderos de peces, etc. y aún más cuenta con afluencias de muchos ríos que podrían por lo antes citado contribuir como una vía transmisión de esta bacteria, por lo que sería muy importante direccionar estudios que permitan verificar posibles fuentes de transmisión ya que *Arcobacter* podría en el futuro evidenciar un impacto importante en la salud humana.

3.5 Especies del género *Arcobacter* en población de Loja y Zamora Chinchipe.

Este estudio identificó como única especie *A. butzleri* y sus bandas se muestran en la (Figura 9).



bp: Pares de bases; **M:** Marcador de peso molecular; **C1:** Control positivo *A. butzleri*; **C2:** Control positivo *A. skirrowii*; **C3:** *A. cryaerophilus*; **M1-M8:** muestras; **B:** Blanco.

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 2,0 % para especies de *Arcobacter*.

Fuente: El autor.

Elaborado por: El autor.

Y la prevalencia de esta especie en las poblaciones de estudio se indican en la (Tabla 12).

Tabla 12. Prevalencia de especies de *Arcobacter* en población de Loja y Zamora Chinchipe.

Población de estudio	<i>A. butzleri</i>	%
Centros de Salud del Distrito N°1 - Loja.	3	6
Centro infantil del Buen Vivir "Caritas de Ángel". Zamora Chinchipe.	2	6,7
"Casa Hogar Betania". Zamora Chinchipe.	3	10
TOTAL	8	7,56

Fuente: El autor.

Elaborado por: El autor.

En relación a los datos obtenidos es necesario mencionar que en EE.UU, Europa, Guatemala, México e India *A. butzleri* es la especie que con mayor frecuencia se aísla de muestras diarreicas en comparación con pacientes no diarreicos en la denominada diarrea del viajero con una prevalencia del 8 %, aunque también en un brote donde no presentaron diarrea pero si otros síntomas como calambres abdominales en niños de una guardería y escuela primaria en Italia, *A. butzleri* fue el único patógeno entérico aislado durante el brote (Ramees et al., 2017).

Estudios realizados en el Hospital Sint-Lucas en Gante-Bélgica en muestras fecales humanas mencionan prevalencias bajas en relación a *A. butzleri* con el 0,4 % en el 2008, 0,5 % en el 2009, 0,9 % en el 2010, 0,4 % en el 2012 y el 1,6 % en el 2013 (Van den Abeele et al., 2014).

En Portugal, en 298 muestras de heces de pacientes con diarrea, recolectadas en 22 hospitales entre septiembre y noviembre del 2012 se observó que el 1.3 % de las muestras fueron positivas para *A. butzleri* seguido de *A. cryaerophilus* con el 0.3 % (Ferreira, 2014), en Venda Sudáfrica el 6.2 % correspondió a *A. butzleri* (Samie et al., 2007).

En el Sur de Chile, en 83 muestras de niños con diarrea se obtuvo una prevalencia del 3,6 % para a *A. butzleri* (Fernandez et al., 2015), mientras que en otro estudio en circunstancias similares en Valdivia-Chile se reportó que de las cepas aisladas de *Arcobacter* el 100 % pertenecían a *A. butzleri* (Jara, 2006), situación similar al reportado en el presente trabajo donde se aisló el mismo porcentaje.

Es importante hacer referencia otros importantes aislamientos, principalmente en reservorios que puedan ser fuente de contaminación al ser humano, así que por ejemplo en el Sur de Chile en el 2007 se reportó un estudio en muestras fecales de algunos animales entre los que se aisló una considerable prevalencia de *A. butzleri*, en perros el 3,3 %, en bovinos el 25 %, en

en pelícanos el 13,3 %, en gorriones el 6,7 %, en gallinas el 20 %, en patos el 40 %, en pavos el 28,6 % (Fernandez et al., 2007), en heces de pollo el 10% (Fernandez et al., 2015), porcentajes que comparados con este estudio en muchos de los casos son mayores, esto debido a que estos animales alojan este patógeno de manera asintomática.

En EE. UU, en investigaciones realizadas en muestras de canales de engorde en una planta de procesamiento de aves de corral comercial, la especie más prevalente fue *A. butzleri* con el 79.1 %, lo cual evidencia una contaminación significativa de canales de pollo de engorde (Son et al., 2007); además, *A. butzleri* también ha sido aislado de muestras de aguas residuales con el 78.5 % de prevalencia, seguido de carne de pollo con el 41.6 % y carne picada el 33.3 % (Elmalii y Can, 2017).

En Novo Amburgo (Brasil) también hay un reporte, donde de un total de 32 muestras de leche se evidenció una prevalencia del 3,1 % para *A. butzleri* (Pianta, Passos, Hepp y Oliveira, 2007).

La prevalencia de las especies de *Arcobacter* depende de muchos factores propios de la metodología de detección, aunque hasta ahora no existe un protocolo oficial y un método de aislamiento que actúe como estándar de oro para la identificación de *Arcobacter* y sus especies ya se han venido reportando casos que evidencian que existe un impacto importante por parte de esta bacteria en la salud humana y animal.

Este porcentaje de prevalencia de *A. butzleri* encontrado en las poblaciones de Loja y Zamora refieren gran importancia ya que como se ha mencionado estos datos son superiores a los reportados en otros países, y a al ser uno de los pocos estudios realizados en nuestro país es necesario seguir generando más información con la finalidad de conocer más datos estadísticos que permitan implementar metodologías diagnósticas para su aislamiento rutinario.

3.6 Actividad antimicrobiana de 5 antibióticos frente a especies de *Arcobacter*.

Varios estudios existentes han informado la actividad antimicrobiana frente a las arcobacterias del medio ambiente, animales y humanos (Ferreira et al., 2016), lo cual ha revelado que algunas cepas de *A. butzleri* son resistentes a la ampicilina y ciprofloxacina (Calvo et al., 2013).

A. butzleri es comparativamente más resistente que *A. cryaerophilus* y *A. skirrowi* (Ramees et al., 2017), además es importante mencionar que de lo que se conoce la mayoría de las enteritis causadas por *Arcobacter* son autolimitadas y no requieren de terapia antimicrobiana.

La presente investigación evaluó la actividad antimicrobiana de las especies aisladas de *Arcobacter* y se evidenció que gentamicina y ampicilina presentaron mayor resistencia con el 62 %, mientras que ciprofloxacina y tetraciclina mostraron el 38 % (**Figura 10**).

Estos porcentajes establecidos en el presente estudio son de gran importancia ya que serían los primeros trabajos investigativos donde se evalúa la actividad antimicrobiana de *Arcobacter* en seres humanos en la región Sur del Ecuador, por lo que estos datos deberían despertar el interés por conocer la susceptibilidad y resistencia de *Arcobacter* en otros orígenes que puedan ser fuente de contaminación, ya que como se ha mencionado *Arcobacter* está distribuido en diferentes ambientes y puede considerarse en un futuro como un patógeno que puede tener gran efecto en la salud humana.

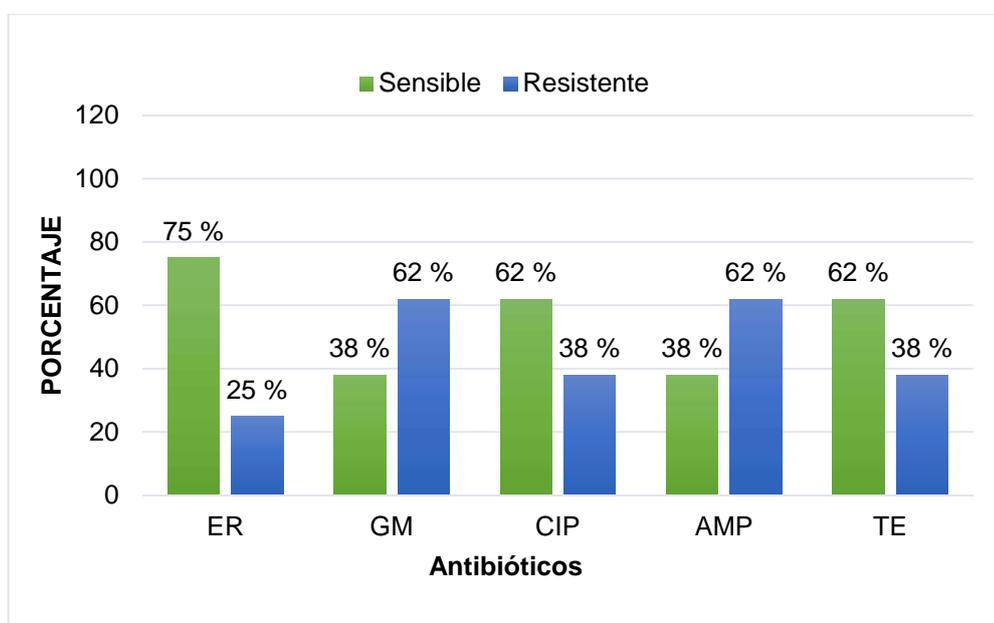


Figura 10. Actividad antimicrobiana de 5 antibióticos frente a especies de *Arcobacter*.

Fuente: El autor.

Elaborado por: El autor.

Los estudios sobre la actividad antimicrobiana de *Arcobacter* en nuestro país aún son pocos, por lo que es necesario mencionar y comparar algunos estudios realizados tanto en seres humanos como en otras fuentes de contaminación, ya que en algunos de los casos son de consumo diario o comparten el hábitat con el hombre.

Así, por ejemplo, en Turquía en 39 cepas de *A. butzleri* aislados de pollos de engorde se mencionan porcentajes importantes, donde frente a la acción de la ampicilina se observa el 64,1 % (25/39) de resistencia (Atabay y Aydin, 2001); en Irán en un estudio en ganado y ovejas una resistencia del 88 % (8/9) (Shirzad, Tabatabaei, Khoshbakht y Raeisi, 2016); en Chile en

un estudio realizado en muestras de mariscos compradas desde julio de 2010 hasta marzo de 2013 ampicilina mostró el 45, 2 % de resistencia (Collado et al., 2014), porcentajes que aunque son de otras fuentes resultan cercanos al establecido en el presente estudio.

Otros datos referentes a la resistencia de ampicilina se reportan en República Checa, en donde se aisló cepas de *A. butzleri* de carne de aves de corral, aguas residuales y muestras de heces humanas y se obtuvo el 83,6 %, 94,4 % y el 85,7 % respectivamente (Silha, Pejchalová y Silhová, 2017).

En relación a la acción de la gentamicina, estos dos estudios antes mencionados señalan que este antibiótico presentó porcentajes inferiores del 3,9 % (Atabay y Aydin, 2001) y 11,1 % (Shirzad et al., 2016) respectivamente, en inclusive en República Checa la resistencia de gentamicina es baja llegando al 0 % en muestras de heces humanas (Silha et al., 2017), esto en relación al 62 % establecido en el presente estudio.

También existen reportes de resistencia en algunos alimentos, como leche cruda, carne picada, muestras de matadero de ganado y aguas residuales, en el cual de un total de 60 muestras ampicilina mostró el 100 % de resistencia (Elmalii y Can, 2017), siendo un porcentaje mayor al de este estudio, donde de las cepas aisladas de *Arcobacter* de la población de Loja y Zamora Chinchipe se observa una menor tasa de resistencia. .

En cuanto a los datos de sensibilidad, este estudio determinó un 75 % a la eritromicina y el 62 % a la ciprofloxacina y tetraciclina; estos 3 antibióticos son los que mostraron mayor eficacia terapéutica, por lo que es importante mencionar que existen estudios como el realizado en Bélgica a pacientes con gastroenteritis en el periodo entre el 2008 y 2014, donde se aisló *A. butzleri* y se evaluó la actividad antimicrobiana y frente a tetraciclina se obtuvo el 49 % de sensibilidad (Van den Abeele et al., 2016), porcentaje que resulta menor al del presente estudio.

Este mismo estudio determinó el 97 % de sensibilidad a la ciprofloxacina (Van den Abeele et al., 2016), mientras que en Republica Checa en muestras fecales humanas se menciona el 100 %, en aves de corral 100 % y en aguas residuales 94,4 % (Silha et al., 2017), porcentajes que resultan superiores al que se determinó en este trabajo donde este antibiótico reporta el 62 % de sensibilidad, pero que coinciden con el presente estudio en que frente a la mayoría de cepas de *Arcobacter* estas aún pueden tener una alta eficacia en el tratamiento.

En una investigación en la India frente a la acción de la eritromicina, ciprofloxacina y tetraciclina el porcentaje de sensibilidad fue del 100 % (Shirzad et al., 2016), y en Turquía la

eritromicina y tetraciclina el 100 % y el 87,1 % a ciprofloxacina (Atabay y Aydin, 2001), datos que por sus porcentajes cercanos resultan comparables al presente trabajo.

De los estudios hasta ahora realizados para el tratamiento de las infecciones por *Arcobacter* tanto en humanos como en animales las fluoroquinolonas y tetraciclinas son las que mayormente se han propuesto, ya que estas presentan una buena actividad contra las cepas de *Arcobacter* (Calvo et al., 2013), situación que se observa en este estudio donde ciprofloxacina y tetraciclina muestra porcentajes considerables de sensibilidad.

Es también preciso indicar, que el porcentaje del 38,5 % de resistencia a la ciprofloxacina que presenta este estudio es mucho mayor al reportado en otros trabajos donde ciprofloxacina presenta el 3,2 % (Collado et al., 2014), en vegetales el 11,76 % (González et al., 2017), en humanos el 7,4 % (Pérez, 2017) y el 28 % (Van den Abeele et al., 2016), datos que sin duda alguna deja abierta la posibilidad de que un futuro con el uso incontrolado de este antibiótico podría también presentarse como resistente, ya que como se conoce las fluoroquinolonas son uno de los agentes antimicrobianos más comúnmente recetados en el mundo y se usa para tratar una variedad de infecciones bacterianas en los seres humanos (González et al., 2017).

Como se ha mencionado los porcentajes de resistencia y sensibilidad son variables entre los diferentes estudios, pero en lo que la mayoría coinciden es que la ampicilina es un antibiótico resistente a la mayoría de cepas de *Arcobacter* y que las fluoroquinolonas, macrólidos y tetraciclinas aún resultan eficaces frente a una enteritis causada por *Arcobacter*, no obstante es necesario encaminar estudios que permitan identificar el mecanismo de resistencia que permitan detener la indudable resistencia que podría a futuro llegar a tener esta bacteria.

CONCLUSIONES

- De la identificación de *Campylobacter* y *Arcobacter* en la población de Loja y Zamora Chinchipe, *Campylobacter* presentó una prevalencia del 3,63 % y *Arcobacter* el 7,27 %.
- En los centros de Salud del Distrito N°1 de la ciudad de Loja se identificó dos especies del género *Campylobacter* donde *C. jejuni* mostró una prevalencia del 2 % y *C. coli* el 4 %; en el centro infantil del Buen Vivir “Caritas de Ángel” de la provincia de Zamora Chinchipe se identificó como única especie a *C. coli* con una prevalencia del 3,3 % y no se evidenció ningún porcentaje de prevalencia de las especies de *Campylobacter* en adultos mayores de 65 años de la “Casa Hogar Betania” de la provincia de Zamora Chinchipe.
- Del estudio realizado en los centros de Salud del Distrito N°1 de la ciudad de Loja para el género *Arcobacter* se evidenció el aislamiento de la especie *A. butzleri* con una prevalencia del 6.0 %; en el centro infantil del Buen Vivir “Caritas de Ángel” de la provincia de Zamora Chinchipe para el género *Arcobacter* se observó una prevalencia de la especie *A. butzleri* del 6,7 % y en adultos mayores de 65 años de la “Casa Hogar Betania” de la provincia de Zamora Chinchipe la prevalencia de la especie aislada *A. butzleri* fue del 10 %.
- *Campylobacter* y las especies aisladas en este estudio presentaron una resistencia a ciprofloxacina y tetraciclina del 100 % y una sensibilidad para eritromicina y gentamicina del 75 % y para *Arcobacter* la especie aislada evidenció una resistencia a gentamicina y ampicilina del 62 % y una sensibilidad del 75 % a eritromicina y 62 % a ciprofloxacina y tetraciclina.

RECOMENDACIONES

- Seguir realizando más estudios tanto en medicina humana como veterinaria para dilucidar la prevalencia, la epidemiología, el papel patogénico y los posibles factores de virulencia de *Campylobacter* y *Arcobacter* ya que es evidente que estas bacterias están involucradas en enfermedades intestinales.
- Establecer políticas de salud pública en nuestro país a fin de que los géneros y especies de *Campylobacter* y *Arcobacter* formen parte de la rutina de diagnóstico de diarreas bacterianas en los laboratorios clínicos y poder así ir generando más datos estadísticos de estos dos enteropatógenos.
- Es necesario que nuestro país confronte la situación de resistencia a las drogas creando a nivel de Salud Pública una entidad capaz de controlar la resistencia antimicrobiana, que regule la comercialización de antimicrobianos, promueva su consumo racional y prudente con la finalidad de que no se desarrolle una multiresistencia antibiótica.

BIBLIOGRAFIA

- Atabay, H. I., y Aydin, F. (2001). Susceptibility of *Arcobacter butzleri* isolates to 23 antimicrobial agents. *Letters in Applied Microbiology*, 33(6), 430–433. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.01025.x>
- Banting, G., y Figueras, M. (2017a). Part three . specific excreted pathogens : environmental and epidemiology aspects Copyright : *Global Water Pathogen Project*.
- Banting, G., y Figueras, M. J. (2017b). Global Water Pathogen Project. *Arcobacter*. In: J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros, (Eds) *Global Water Pathogens*. <https://doi.org/http://www.waterpathogens.org/book/arcobacter>
- Bayas, I. (2016). *Aportaciones a la epidemiología de Arcobacter y Helicobacter spp.: aplicación de métodos moleculares a su detección e identificación en alimentos* (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Valencia. España
- Bücker, R., Krug, S. M., Moos, V., Bojarski, C., Schweiger, M. R., Kerick, M., ... Schulzke, J. D. (2017). *Campylobacter jejuni* impairs sodium transport and epithelial barrier function via cytokine release in human colon. *Mucosal Immunology*, (August), 1–12. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.66>
- Cabrera, C. M. (2016). *Especies de Campylobacter resistentes a fluoroquinolonas aisladas en niños con y sin diarrea del Hospital Manuel Ygnacio Monteros durante el período abril a junio del 2016*. (Tesis de pregrado) Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador
- Calvo, G., Arias, M. L., y Fernández, H. (2013). *Arcobacter*: un patógeno emergente de origen alimentario. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 63 (2), 164–172.
- Collado, L., y Figueras, M. J. (2011). Taxonomy , Epidemiology and Clinical Relevance of the Genus *Arcobacter*. <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>
- Cuenca, J. (2015). *Prevalencia de las especies termotolerantes de Campylobacter (C. jejuni subsp. jejuni, C. coli, C. lari y C. upsaliensis) en niños con y sin diarrea del Hospital Regional Isidro Ayora, durante el periodo Septiembre - Diciembre 2014*. (Tesis de pregrado). Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador
- Cuenca, V. (2014). *Prevalencia de las especies termotolerantes de Campylobacter (C. jejuni*

subsp. jejuni, C. coli, C. lari y C. upsaliensis) en niños con y sin diarrea del Hospital del Día, durante el periodo septiembre - diciembre 2014. (Tesis de pregrado). Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador

Da Silva, M. (2011). Enfermedad diarreica aguda en niños. Agentes causales más comunes en una comunidad del Chaco Central. *Pediatría*, 38(1), 191–198. Recuperado de <http://scielo.iics.una.py/pdf/ped/v38n3/v38n3a03.pdf>

Dasti, J., Tareen, A. M., Lugert, R., Zautner, A. E., y GroB, U. (2010). *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(4), 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.07.002>

Domingo, D. (2003). Sensibilidad de *Campylobacter jejuni* de muestras clínicas de niños, 16 (Nº 2), 216–220.

Doudah, L., De Zutter, L., Vandamme, P., y Houf, K. (2010). Identification of five human and mammal associated *Arcobacter* species by a novel Múltiplex-PCR assay. *Journal of Microbiological Methods*, 80 (3), 281–286. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.01.009>

Elmalii, M., y Can, H. Y. (2017). Occurrence and antimicrobial resistance of *Arcobacter* species in food and slaughterhouse samples. *Food Science and Technology*, 37(2), 280–285. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.19516>

Fernández, H. (2012). Diseminación de especies de *Campylobacter* y *Arcobacter* por amebas de vida libre, 1110202. doi: 10.5354/0719-5273.2013.25979

Fernández, H. (2015). Género *Campylobacter*: un grupo de bacterias de importancia en Salud Pública. *Temas de Zoonosis*, 4, 205–214.

Fernandez, H., y Jaramillo, A. (2016). *Arcobacter butzleri*. *Revista Chilena de Infectología*, 33(800 X), 182–185. <https://doi.org/10.1128/AEM.02404-13>

Fernández, H., Ochoa, S., y Simaluiza, J. (2016). Bases Metodológicas para el diagnóstico bacteriológico de las infecciones por *Campylobacter*. Santiago de Chile, 97.

Fernández, H., y Pérez, G. (2016). *Campylobacter*: resistencia a fluoroquinolonas en países latinoamericanos. *Arch Med Vet*, 48, 255–259. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2016000300002>

Fernandez, H., Vera, F., y Villanueva, M. P. (2007). *Arcobacter* and *Campylobacter* species in birds and mammals from Southern Chile. *Archivos De Medicina Veterinaria*, 39(2), 163–

165. [https://doi.org/Doi 10.4067/S0301-732x2007000200011](https://doi.org/Doi%2010.4067/S0301-732x2007000200011)

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., Júlio, C., Queiroz, J. A., Domingues, F. C., y Oleastro, M. (2014). Molecular diagnosis of *Arcobacter* and *Campylobacter* in diarrhoeal samples among Portuguese patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 78(3), 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.11.021>

Gabaldón, L., Badía, C., y Salas, J. (2013). Papel del estudio neurofisiológico en el síndrome de Miller-Fisher. *Neurología*, 28(7), 451–452. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2012.04.014>

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>

Gomes, M. (2013). Género *Campylobacter* spp. Recuperado de <https://consultadogvet.files.wordpress.com/2017/03/gc3aanero20campylobacter204-2013-1.pdf>

González, A., Bayas Morejón, I. F., y Ferrús, M. A. (2017). Isolation, molecular identification and quinolone-susceptibility testing of *Arcobacter* spp. isolated from fresh vegetables in Spain. *Food Microbiology*, 65, 279–283. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.02.011>

González, A., Ferrús, M., González, R., y Hernández, J. (2007). Molecular fingerprinting of *Campylobacter* and *Arcobacter* isolated from chicken and. *International Microbiology*, 10(2), 85–90. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.12>

Hernández, C., Arreola, M., y Castro, G. (2013). *Campylobacter jejuni*: ¿una bacteria olvidada? Situación en México. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 33(2), 77–84. Recuperado de http://www.amimc.org.mx/revista/2013/33_2/campylobacter.pdf

Howell, S., Hazen, K., y Brandt, M. (2015). *Manual of Clinical Microbiology. Manual of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/9781555817381>

Humphrey, S., Chaloner, G., Kemmett, K., Davidson, N., Williams, N., Kipar, A., ... Wigley, P. (2014). *Campylobacter jejuni* is not merely a commensal in commercial broiler chickens and affects bird welfare. *mBio*, 5(4), 1–7. <https://doi.org/10.1128/mBio.01364-14>

- Jara, M. (2006). Especies del género *Campylobacter* y del género *Arcobacter* en muestras de deposiciones humanas y animales. *Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias*, 3, 1–23. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.myaccess.library.utoronto.ca/pubmed/11720961>
- Kaakoush, N. O., Castaño, N., Hazel, M., y Ming, S. (2015). Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection, 28(3), 687–720. <https://doi.org/10.1128/CMR.00006-15>
- Kamei, K., Hatanaka, N., Asakura, M., Somroop, S., Samosornsuk, W., Hinenoya, A., ... Yamasaki, S. (2015). *Campylobacter hyointestinalis* isolated from pigs produce multiple variants of biologically active cytolethal distending toxin. *Infection and Immunity*, 83(11), 4304–4313. <https://doi.org/10.1128/IAI.00997-15>
- Kimberlin, D., Brady, M., Jackson, M., y Long, S. (2015). American Academy of Pediatrics. *Campylobacter* Infections. In *Informe del Comité sobre Enfermedades Infecciosas*. (Red Book, pp. 273–275). Recuperado de <https://redbook.solutions.aap.org/chapter.aspx?sectionid=106690485&bookid=1659#PurchaseChapterBox>
- Larrauri, R. Z., Villaverde, J. O. A., Vigo, P. E. L., Gabriel, L. P., Dioses, A. R., Ramírez, A. M. V., y Velásquez, J. (2014). Comunicación corta Identificación de *Arcobacter* en heces de niños y adultos con / sin diarrea y en reservorios animales. *Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión"*, 75(2), 185–187.
- Levican, A., Rubio, S., Martínez, A., Collado, L., y Figueras, M. (2015). new species isolated from marine environment. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(1), 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.10.011>
- Ley, J. D. E. (2017). Proposal for a New Family, *International journal of systematic bacteriology*, July 1991, pag 451-455
- Mardones, G., y López, J. (2017). Revisión Implicancias de *Campylobacter spp.* como patógeno alimentario. *Chilean J. Agric. Anim. Sci., Ex Agro-Ciencia*, 33(1), 73–83. Recuperado en <http://www.scielo.cl/pdf/chjaasc/v33n1/0719-3890-chjaasc-02005.pdf>
- Martínez, K. J. (2008). *Prevalencia de especies de Campylobacter spp en niños menores de 10 años con diarrea aguda en la ciudad de Talca*. México
- Miller, W. G., y Parker, C. T. (2011). *Campylobacter* and *Arcobacter*. *Genomes of Foodborne and Waterborne Pathogens*, 49–65.
- Miller, W., Yee, E., y Chapman, M. (2016). Complete Genome Sequences of *Campylobacter*

- hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* Strain LMG 9260 and *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii* Strain LMG 15993. *Genome Announcements*, 4(4), e00665-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00665-16>
- 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 múltiplex PCR detection. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. <https://doi.org/10.3923/ajava.2014.452.466>
- Mota. (2010). Bacterial pathogens associated with bloody diarrhea in Uruguayan children. *National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine*. <https://doi.org/10.1590/S0325-75412010000200009>.
- Narvaez, I. M. (2014). *Prevalencia de las especies termotolerantes de Campylobacter (C. jejuni subsp. jejuni, C. coli, C. lari y C. upsaliensis) en niños con y sin diarrea del Hospital Manuel Ygnacio Monteros, durante el período Septiembre - Diciembre 2014*. (Tesis de pregrado) Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador
- Notario, R., Borda, N., Gambande, T., Bermejo, J., Ponessa, A., y Toledo, V. (2011). Cepas de *Campylobacter jejuni* resistentes a quinolonas aisladas de humanos, gallinas y pollos. *Medicina*, 71(4), 331–335.
- Nuñez, A. C. (2016). *Estudio de prevalencia de Especies de Campylobacter (C. jejuni subsp. jejuni, C. coli) en animales de corral y perros en el Sur del Ecuador*. (Tesis de pregrado). Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador
- Ochoa, S., Simaluiza, R. J., Toledo, Z., y Fernández, H. (2016). Frequency and antimicrobial behaviour of thermophilic *Campylobacter* species isolated from ecuadorian backyard chickens. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 48(3), 311–314. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2016000300011>
- OMS. (2016). Organización Mundial de la Salud. Recuperado en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/es/>
- OMS. (2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Recuperado en <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>
- Pérez, A. (2017). Antimicrobial susceptibility, virulence potential and sequence types associated with *Arcobacter* strains recovered from human faeces. *Microbiology Society*. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000638>

- Pianta, C., Passos, D. T., Hepp, D., y Oliveira, S. J. (2007). Isolation of *Arcobacter spp* from the milk of dairy cows in Brazil. *Ciência Rural*, 37(1), 171–174. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782007000100027>
- Pitkanen, T., y Hanninen, M.-L. (2015). Members of the family Campylobacteraceae: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*. *Global Water Pathogens Project*.
- Poma, V. (2014). *Aislamiento y tipificación molecular de campylobacter jejuni y campylobacter coli en contenido cecal de pollos faenados en camales industriales en la provincia de pichincha*. Universidad Central. Ecuador.
- Pulgar, D. E. (2016). *Campylobacter jejuni y Campylobacter coli AISLADAS DE BOVINOS DE CARNE Y CERDOS*. Recuperado de <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/140660/Determinacion-de-la-sensibilidad-antimicrobiana-en-cepas-de-Campylobacter-jejuni-y-Campylobacter-coli-aisladas-de-bovinos-de-carne-y-cerdos.pdf?sequence=1>
- Ramees, T., Dhama, K., Karthik, K., Rathore, R., Kumar, A., Saminathan, M., ... Singh, R. (2017). *Arcobacter*: an emerging food-borne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control – a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, 37(1), 136–161. <https://doi.org/10.1080/01652176.2017.1323355>
- Ramees, T., Dhama, K., Karthik, K., Rathore, R., Kumar, A., Saminathan, M., y Tiwari, R. (2017). *Arcobacter*: an emerging food-borne zoonotic pathogen , its public health concerns and advances in diagnosis and control – a comprehensive review, 2176(July). <https://doi.org/10.1080/01652176.2017.1323355>
- Rivera, N., Bustos, R., Montenegro, S., Sandoval, M., Castillo, J., Fernández, H., ... Quevedo, I. (2011). Genotipificación y resistencia antibacteriana de cepas de *Campylobacter spp* aisladas en niños y en aves de corral. *Revista Chilena de Infectología*, 28(6), 555–562. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182011000700008>
- Rojas, Z. (2011). *Evaluación de la especificidad de dos métodos moleculares para la identificación de especies pertenecientes al género Arcobacter*. (Tesis de pregrado). Universidad Austral. Chile
- Rovetto, C., Van den Abeele, I., Van Nieuwerburgh, C., y Houf, K. (2017). Characterization of the emerging zoonotic pathogen *Arcobacter thereius* by whole genome sequencing and comparative genomics. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180493>
- 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>
- SFM, y EUCAST. (2017). Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recuperado de http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFMV1_0_MARS_2017.pdf
- Sheppard, S. K., y Maiden, M. C. J. (2015). The evolution of *campylobacter jejuni* and *campylobacter coli*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(8), 1–14. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018119>
- 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>
- Silha, D., Pejchalová, M., y Silhová, L. (2017). Susceptibility to 18 drugs and multidrug resistance of *Arcobacter* isolates from different sources within the Czech Republic. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 9(2010), 74–77. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.01.006>
- Son, I., Englen, M., Berrang, M., Fedorka, P., y Harrison, M. (2007). Antimicrobial resistance of *Arcobacter* and *Campylobacter* from broiler carcasses. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29(4), 451–455. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.10.016>
- Sons, y Wiley, J. (2017). Bergeys Manual of Systematics of Archae and Bacterias. Recuperado de <http://www.bacterio.net/arcobacter.html>
- Tamborini, A., Casanova, L., Viñas, M., Asato, V., Hoffer, A., Lucero, M., ... Pichel, M. (2012). *Campylobacter spp.*: Prevalencia y caracterización fenotípica de aislamientos de pacientes con diarrea y de sus mascotas en la provincia de La Pampa, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 44(4), 266–271.
- Van den Abeele, A. M., Vogelaers, D., Van Hende, J., y Houf, K. (2014). Prevalence of *Arcobacter* species among humans, Belgium, 2008–2013. *Emerging Infectious Diseases*, 20(10), 1731–1734. <https://doi.org/10.3201/eid2010.140433>
- 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>

- Vasco, K., Graham, J. P., y Trueba, G. (2016). Detection of zoonotic enteropathogens in children and domestic animals in a semirural community in Ecuador. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(14), 4218–4224. <https://doi.org/10.1128/AEM.00795-16>
- Villavicencio, J. S. (2016). *Especies de Campylobacter resistentes a fluoroquinolonas aisladas en niños con y sin diarrea en el Hospital Isidro Ayora de la provincia de Loja, durante el periodo abril-junio de 2016*. (Tesis de pregrado). Universidad Técnica particular de Loja. Ecuador
- Vliet, A. H. M. Van, Pearson, B. M., Williams, N. J., Pascoe, B., Ashton, P., Jenkins, C., ... Wain, J. (2016). Generating tools for the molecular epidemiology of *Campylobacter coli* by next generation genome sequencing, (October).
- WHO. (2012). *The global view of Campylobacteriosis*. [https://doi.org/ISBN 978 92 4 156460 1](https://doi.org/ISBN%20978%2092%204%20156460%201)
- Wijdicks, E. F. M., y Klein, C. J. (2017). Guillain-Barré Syndrome. *Mayo Clinic Proceedings*, 92(3), 467–479. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.12.002>
- Yamazaki, W., Taguchi, M., Seto, K., Kawahara, R., Kawatsu, K., Kumeda, Y., ... Tsukamoto, T. (2007). Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. *Journal of Medical Microbiology*, 56(11), 1467–1473. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47363-0>
- Zerpa, R., Alarcón, J. O., Vigo, L., Percy, E., Patiño, L., Reyes, A., y Alarcón, M. J. (2014). Identificación de *Arcobacter* en heces de niños y adultos con/sin diarrea y en reservorios animales. *Anales de La Facultad de Medicina*. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1025-55832014000200017&script=sci_arttext&lng=pt

ANEXOS

a. Protocolos de identificación de *Campylobacter*.

Anexo 1. Preparación de medios de cultivo.

Agar sangre modificado con suplemento selectivo Butzler.

Volumen 500 ml

1. Pesar:

Nutriente Broth N2	12.5 gr
Agar Extracto de levadura	11.5 gr
Extracto de levadura	3.5 gr

2. Agregar:

Agua Destilada	470.0 ml
----------------	----------

3. Mezclar y ajustar el pH a 7.0 utilizando ácido clorhídrico diluido al 25 %.

4. Autoclavar a 121 °C por 20 minutos.

5. Cuando el medio este a 50 °C adicionar el vial *Campylobacter* Selective Supplement Butzler y homogenizar.

Composición de *Campylobacter* Selective Supplement Butzler en 5ml de agua estéril

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

6. Agregar:

Sangre	25 ml
--------	-------

Homogenizar

7. Dispensar 20 ml aproximadamente en las cajas Petri de 94 x 16 mm y esperar que solidifique el medio.

8. Rotular y almacenar las cajas de forma invertida a 4 °C.

Anexo 2. PCR- Múltiplex para identificación de especies de *Campylobacter*

REACTIVOS

- Buffer de carga
- dNTPs
- MgCl₂
- Taq Polimerasa
- Agua destilada desionizada estéril
- Primers

MATERIALES Y EQUIPOS

- Tubos de microcentrífuga (eppendorf) 1,5 ml estériles
- Puntas y micropipetas
- Tubos y tapas de PCR de 0,2 ml estériles
- Vórtex
- Microcentrífuga
- Termociclador

PROCEDIMIENTO

1. Preparar todos los reactivos, materiales y equipos a utilizar, dejar que los reactivos se descongelen mientras son mantenidos en frío.
2. En un tubo eppendorf de 1,5 ml hacer el master mix con las cantidades establecidas en la tabla (Master MIX para PCR-Múltiplex) a excepción del ADN.

Nota: la Taq Polimerasa debe mantenerse todo el tiempo en frío, además se recomienda agregarla al mix al final

3. Invertir cuidadosamente para homogenizar el mix sin crear burbujas. Centrifugar por 5 segundos a máxima velocidad para juntar las gotas esparcidas.
4. A partir del master mix, tomar alícuotas con el volumen de reacción establecido y repartir en tubos de PCR, luego a cada tubo el volumen final de muestra (ADN) para un volumen final de reacción, en este caso 25 ul. Mantener en hielo hasta llevar al Termociclador.

Nota: trabajar con un blanco (mix sin ADN para verificar que la reacción está libre de contaminantes) con un control positivo cuyo patrón de bandas amplificado sea conocido y un control negativo

Master MIX para PCR-Múltiplex *Campylobacter*

Género y especies	Componentes	Volumen (ul)
	H2O	16,22
	Buffer	5.0
	dNTPs	0.50
	Cl ₂ Mg	1.50
Primers		
Género <i>Campylobacter</i>	C412 F	0,05
Género <i>Campylobacter</i>	C1228 R	0,05
<i>C. Jejuni</i>	C1	0,05
<i>C. Jejuni</i>	C2	0,05
<i>C. coli</i>	CC18F	0,05
<i>C. coli</i>	CC519R	0,05
<i>C. upsaliensis</i>	CU61F	0,05
<i>C. upsaliensis</i>	CU146R	0,05
<i>C. fetus</i>	MG3F	0,05
<i>C. fetus</i>	CF359R	0,05
<i>C. lari</i>	CLF	0,05
<i>C. lari</i>	CLR	0,05
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>Hyointestinalis</i>	HYO1F	0,05
	HYOFET235R	0,05
	Taq	0,125
	DNA	1.0
Volumen final		25,00

5. Condiciones del Termociclador para la identificación de *Campylobacter*.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	N° de ciclos
Desnaturalización inicial	95	2	-
Desnaturalización	95	0,5	
Anillamiento	68-56	1,5	6
Extensión	72	1,0	
Desnaturalización	95	0,5	
Anillamiento	56	1,5	30
Extensión	72	1	
Extensión final	72	10	-
Mantenimiento	4	-	-

6. Una vez finalizado el proceso en el Termociclador, almacenar el producto final a 4 °C.

b. Protocolos de identificación de *Arcobacter*.

Anexo 3. Preparación de medios de cultivo.

Agar sangre modificado

Sin antibióticos

Volumen 500 ml

1. Pesar:

Nutriente Broth N2	12.5 gr
Agar Extracto de levadura	11.5 gr
Extracto de levadura	3.5 gr

2. Agregar:

Agua Destilada	475.0 ml
----------------	----------

3. Mezclar y ajustar el pH a 7.0 utilizando ácido clorhídrico diluido al 25 %.

4. Autoclavar a 121 °C por 20 minutos.

5. Cuando el medio de cultivo esté a 50 °C agregar:

Sangre	25 ml
--------	-------

Homogenizar

6. Dispensar 20 ml aproximadamente en las cajas Petri de 94 x 16 mm y esperar que solidifique el medio.

7. Rotular y almacenar las cajas de forma invertida a 4 °C.



Figura 11. Agar sangre modificado sin antibióticos.

Fuente: El autor.

Elaborador por: El autor.

Caldo de enriquecimiento
Con antibióticos

Volumen 500 ml

1. Pesar:

Nutriente Broth N2	12.5 gr
Agar-Agar	0.25 gr
Extracto de levadura	3 gr

2. Agregar:

Agua Destilada	475.0 ml
----------------	----------

3. Mezclar y ajustar el pH a 7.0 utilizando ácido clorhídrico diluido al 25 %.
4. Autoclavar a 121 °C por 20 minutos.
5. Cuando el caldo de enriquecimiento esté a 50 °C adicionar la mezcla de la solución antibiótica.

Preparación de la solución antibiótica:

(Solución antibiótica de Houf)

Trimetropin	900 ul (500 ml)
5-Fluoracilo	900 ul (500 ml)
Noboviocina	500ul (500 ml)
Cefoperazona	500 ul (500 ml)

6. Agregar:

Sangre	25 ml	10 ml (250 ml)
--------	-------	----------------

Homogenizar

7. Dispensar en tubos cónicos de 7 a 8 ml aproximadamente.
8. Rotular y almacenar los tubos a 4 °C.

Agar MacConkey

Volumen 500 ml

1. Pesar:

Agar MacConkey	26 gr
----------------	-------

2. Agregar:

Agua Destilada	500 ml
----------------	--------

3. Mezclar y homogenizar la mezcla.

4. Medir y ajustar el pH a 7.0.

5. Autoclavar a 121 ° por 20 minutos.

6. Cuando el medio de cultivo esté a 50 °C dispensar 20 ml aproximadamente en las cajas Petri de 94 x 16 mm y esperar que solidifique.

7. Rotular y almacenar las cajas de forma invertida a 4 °C.

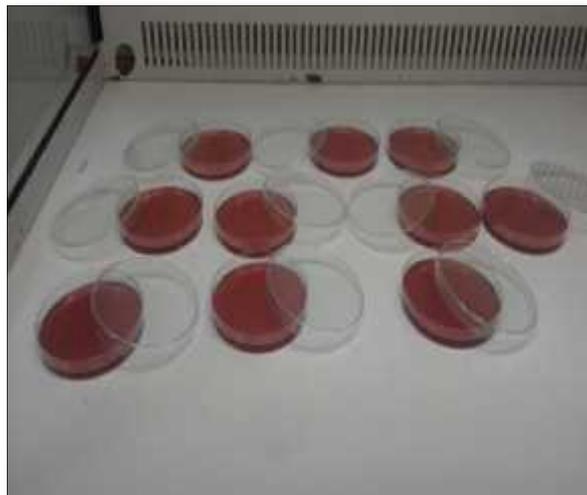


Figura 12. Medios de Agar MacConkey.

Fuente: El autor.

Elaborador por: El autor.

Anexo 4. PCR- Múltiplex para identificación de especies de *Arcobacter*.

REACTIVOS

- Buffer de carga
- dNTPs
- MgCl₂
- Taq Polimerasa
- Agua destilada desionizada estéril
- Primers

MATERIALES Y EQUIPOS

- Tubos de microcentrífuga (eppendorf) 1,5 ml estériles
- Puntas y micropipetas
- Tubos y tapas de PCR de 0,2 ml estériles
- Vórtex
- Microcentrífuga
- Termociclador

PROCEDIMIENTO

1. Preparar todos los reactivos, materiales y equipos a utilizar, dejar que los reactivos se descongelen mientras son mantenidos en frío.
2. En un tubo eppendorf de 1,5 ml hacer el master mix con las cantidades establecidas en la tabla (Master MIX para PCR-Múltiplex) a excepción del ADN.

Nota: la Taq Polimerasa debe mantenerse todo el tiempo en frío, además se recomienda agregarla al mix al final

3. Invertir cuidadosamente para homogenizar el mix sin crear burbujas. Centrifugar por 5 segundos a máxima velocidad para juntar las gotas esparcidas.
4. A partir del master mix, tomar alícuotas con el volumen de reacción establecido (20 ul) y repartir en tubos de PCR, luego a cada tubo el volumen final de muestra (5 ul ADN) para un volumen final de reacción, en este caso 25 ul. Mantener en hielo hasta llevar al Termociclador.

Nota: trabajar con un blanco (mix sin ADN para verificar que la reacción está libre de contaminantes) con un control positivo cuyo patrón de bandas amplificado sea conocido y un control negativo

Master MIX para PCR-Múltiplex *Arcobacter*

Género y especies	Componentes	Volumen (ul)
		1x
	H ₂ O	9,375
	Buffer	5
	dNTPs	0,5
	Cl ₂ Mg	1,5
Primers		
Género <i>Arcobacter</i>	Arco F	0,5
<i>A. thetelus</i>	Ther R	0,5
<i>A. cibarius</i>	Cib R	0,5
<i>A. skirrowii</i>	SKi R	0,5
<i>A. Butzleri</i>	But R	0,5
<i>A. Cryaerophilus</i>	Gyras F	0,5
<i>A. Cryaerophilus</i>	Gyras R	0,5
	Taq	0,125
	DNA	5
Volumen final		25,00

5. Condiciones del Termociclador para la identificación de *Arcobacter*.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	N° de ciclos
Desnaturalización inicial	95	2 min	1
Desnaturalización	95	45 seg	8
Anillamiento	61	45 seg	
Extensión	72	2,0	27
Desnaturalización	95	45 seg	
Anillamiento	56	45 seg	
Extensión	72	2 min	1
Extensión final	72	10 min	

6. Una vez finalizado el proceso en el Termociclador, almacenar el producto final a 4 °C.

c. Protocolos de identificación de *Campylobacter* y *Arcobacter*.

Anexo 5. Preparación de caldo de Tioglicolato.

Volumen 100 ml

6. Pesar:

Tioglicolato	2.98 gr
Extracto de levadura	1 gr

7. Agregar:

Agua Destilada	100 ml
----------------	--------

8. Mezclar y ajustar el pH a 7.0 utilizando ácido clorhídrico diluido al 25 %.

9. Autoclavar a 121 °C por 20 minutos.

10. Cuando el medio de cultivo cuando esté a 50 °C dispensar en tubos cónicos de 7 a 8 ml aproximadamente.

11. Rotular y almacenar los tubos a 4 °C.



Figura 13. Caldo de Tioglicolato.

Fuente: El autor.

Elaborador por: El autor.

Anexo 6. Medio de cultivo para evaluar la actividad antimicrobiana.

Agar Mueller Hinton

Volumen 500 ml

1. Pesar:

Agar Mueller Hinton	26 gr
---------------------	-------

2. Agregar:

Agua Destilada	475 ml
----------------	--------

3. Mezclar y homogenizar la mezcla.

4. Medir y ajustar el pH a 7.0

5. Autoclavar a 121 °C por 20 minutos.

6. Cuando el medio de cultivo esté a 50 °C agregar 5 % de sangre al medio.

Sangre	25 ml
--------	-------

7. Homogenizar y dispensar 20 ml aproximadamente en las cajas Petri de 94 x 16 mm y esperar que solidifique.

8. Rotular y almacenar las cajas de forma invertida a 4 °C.

Anexo 7. Pruebas fenotípicas y bioquímicas.

A. Tinción de Hucker (*Campylobacter* y *Arcobacter*).

1. De las colonias sospechosas un frotis en una placa porta objetos y fijar a calor.
2. Colocar de una gota de colorante violeta y una gota de bicarbonato de sodio al 1 % por 2 min.
3. Lavar con agua y dejar secar la placa.
4. Finalmente observar al microscopio con el lente de inmersión de 100X.

B. Tinción de Gram (*Campylobacter* y *Arcobacter*).

1. Tomar las colonias sospechosas y ponerlas en un portaobjetos, dejar secar a temperatura ambiente o con la ayuda de un mechero.
2. Cubrir durante 1 minuto la superficie donde están las bacterias con unas pocas gotas del colorante cristal violeta (lavar con agua eliminando el exceso).
3. Cubrir durante 1 min con Lugol (lavar con agua eliminando el exceso).
4. Cubrir durante 1 min con alcohol acetona (lavar con agua eliminando el exceso).
5. Añadir Safranina o Fushina básica durante 30 segundos y volver a lavar.
6. Finalmente dejar secar y observar al microscopio con el lente de inmersión de 100X.

C. Catalasa (*Campylobacter*).

1. Agregar en una placa porta objetos colonias puras.
2. Colocar una gota de peróxido de hidrogeno al 3 %.
3. Si hay la presencia de burbujas se considera POSITIVO, la ausencia es NEGATIVO.

D. Oxidasa (*Campylobacter*).

1. Tomar con la ayuda de un palillo colonias puras.
2. Colocar el inculo en las tiras Oxistrip de Hardy Diagnostics.
3. Si se presenta una coloración violeta de 10 a 30 seg se considera POSITIVO, la ausencia de color es NEGATIVO.

E. Hidrolisis de hipurato (*Campylobacter*).

1. Adicionar colonias puras en un tubo con 400 ul de solución de hipurato de Na al 1 %.
2. Incubar a 37 °C durante 2 horas.
3. Agregar 200 ul de ninhidrina y reposar por 10 minutos.
4. Si se presenta una coloración azul-purpura se considera POSITIVO, la ausencia de color es NEGATIVO.

Anexo 8. Criopreservación de cepas.

1. Tomar con un hisopo estéril las colonias del cultivo fresco e inocular dentro del vial criopreservante con perlas porosas de Microbank™.
2. Homogenizar por inversión y dejar los tubos invertidos por 20 minutos.
3. Aspirar el exceso de criopreservante y eliminar.
4. Almacenar los tubos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.



(A)

(B)

Figura 14. Criopreservación. Cepas de *Campylobacter* (A), cepas de *Arcobacter* (B).

Fuente: El autor

Elaborador por: El autor

Anexo 9. Protocolo de extracción de ADN genómico de bacterias gram negativas.

El siguiente protocolo está basado en el empleo del kit de purificación del ADN genómico de Wizard® diseñado para el aislamiento de ADN procedente de células blancas de la sangre, cultivos celulares (tejidos en general, tejidos animales), tejido vegetal, levaduras y bacterias gram positivas y gram negativas. Este Kit se basa principalmente en 4 pasos: 1) Lisado o rotura de la membrana celular, así como de la membrana nuclear. 2) Digestión enzimática mediante el uso de RNasas. 3) Las proteínas celulares son eliminadas por un paso de precipitación salina, dejando únicamente el ADN genómico de alto peso molecular en la solución. 4) El ADN genómico es concentrado y desalinizado mediante precipitación con isopropanol.

Nota: Almacenar el Kit a temperatura ambiente (15-30°C).

REACTIVOS

- Solución de lisis Nuclear (kit)
- Solución de precipitación proteica (kit)
- Solución de Rehidratación de ADN (kit)
- RNasa A (kit)
- Isopropanol (T° ambiente)
- Etanol al 70 % (T° ambiente)
- Agua destilada estéril

MATERIALES Y EQUIPOS

- Tubos de microcentrífuga (eppendorf) de 1,5 ml
- Baño maria o termobloque
- Centrífuga
- Vórtex
- Puntas y micropipetas
- Hielo

PROCEDIMIENTO

1. Tomar una asada de colonias de un cultivo de bacteriano puro sembrado en medio sólido y colocarlo en 600 ul de agua destilada estéril, dar vórtex.
2. Centrifugar a 13.000 - 16.000 rpm durante 5 min hasta obtener un sedimento celular o pellet. Eliminar el sobrenadante.
3. Añadir 600 ul de Solución de Lisis Nuclear. Resuspender las células con movimientos suaves hasta que se disuelva el pellet.
4. Incubar a 80 °C durante 5 min para lisar las células, luego enfriar hasta temperatura ambiente.

5. Añadir 3 ul de RNasa al lisado celular. 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 (5 min).
7. Añadir 200 ul de la Solución de Precipitación Proteica al lisado celular tratado con RNAasa. Dar vórtex vigorosamente a alta velocidad durante 20 segundos para mezclar.
8. Incubar la(s) muestra(s) en hielo durante 5 min.
9. Centrifugar de 13.000 - 16.000 rpm durante 3 - 6 min.
10. Transferir el sobrenadante que contiene el ADN hacia un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril que contenga 600 ul de isopropanol.

Nota: Se recomienda dejar un poco de sobrenadante en el tubo original para evitar contaminar la solución de ADN con residuos de proteínas.

Además, de no obtenerse un pellet de proteínas puede deberse a que la muestra no fue enfriada hasta temperatura ambiente por lo que se debe temperar al menos por 5 min, o colocar en hielo por el mismo tiempo, dar vórtex por 20 seg y centrifugar durante 3 min de 13.000 a 16.000 rpm.

11. Mezclar suavemente invirtiendo los tubos hasta que las hebras de ADN formen un conglomerado visible.
12. Centrifugar a 13.000 - 16.000 durante 2 - 5 min.
13. Cuidadosamente eliminar el sobrenadante (isopropanol) y conservar el pellet (ADN). Añadir 600 ul de etanol al 70 % y mezclar suavemente invirtiendo el tubo varias veces para lavar el pellet de ADN.
14. Centrifugar a 13.000 - 16.000 rpm durante 2 - 5 min. Cuidadosamente aspirar el etanol y desechar.
15. Conservar el pellet y dejar secar al aire durante 10 -15 min o dejar unos segundos a 60 °C para evaporar el etanol.
16. Añadir 100 ul de solución rehidratante de ADN al tubo e incubar a 65 °C durante una hora. Periódicamente mezclar la solución con ligeros golpecitos en el tubo y alternativamente rehidratar el ADN incubando la solución toda la noche a temperatura ambiente o a 4 °C.

17. Mezclar con ligeros golpes y conservar el ADN obtenido a 2-8 °C.



Figura 15. Kit de extracción Wizard® Genomic DNA Purification.
Fuente: El autor.
Elaborado por: El autor.

Anexo 10. Protocolo de Electroforesis en Gel de Agarosa.

REACTIVOS

- Agarosa Ultrapura
- Buffer TBE 1X (para gel y corrida)
- GEL RED 3X en agua
- Marcador de peso molecular

MATERIALES Y EQUIPOS

- Micropipetas y puntas de 1 – 10 ul
- Matraz Erlenmeyer 250 ml
- Probeta de 50 ml
- Espátula
- Cámara de electroforesis horizontal
- Balanza analítica
- Plancha térmica/microondas
- Transiluminador UV

PROCEDIMIENTO

Gel de Agarosa al 1,5 % (*Campylobacter*) y 2,0 % (*Arcobacter*) en 35 ml

1. Medir con una probeta (11,6 ml de GEL RED más 3,5 ml de TBE 10X) y aforar a 35 ml con agua destilada.
2. Pesar, para una concentración del 1,5 % (0,525 gr de Agarosa Ultrapura) y para el 2 % (0,7 gr de Agarosa Ultrapura) y agregar a la solución antes medida.
3. Disolver con la ayuda del calor.

Nota: Evitar el exceso de ebullición ya que puede evaporarse demasiado y alterar la concentración final de la agarosa.
4. Homogenizar suavemente sin formar burbujas y dejar enfriar hasta aproximadamente 60 °C, luego verter la solución sobre el contenedor del gel y colocar el peine.
5. Una vez solidificado el gel, colocarlo en la cubeta de electroforesis y añadir el buffer de corrida (TBE 1X) de modo que cubra completamente el gel. Retirar cuidadosamente el peine para formar los pocillos.
6. Cargar los pocillos con los productos de PCR, las muestras (3 ul), controles (3ul) y el marcador de peso molecular de 100 pb (1,5 ul).
7. Programar la corrida: 120 V, 30 min, 300 mA.

8. Mediante un transiluminador UV visualizar y hacer un registro fotográfico de las bandas obtenidas.



Figura 16. Electroforesis en gel de Agarosa.

Fuente: El autor.

Elaborador por: El autor.

