



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

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.

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Cuenca Capa, Vanessa Alexandra

DIRECTOR: Toledo Barrigas, Zorayda Patricia, Bq.F.

LOJA – ECUADOR

2015

APROBACIÓN DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Bioquímica Farmacéutica

Zorayda Patricia Toledo Barrigas

DOCENTE DE LA TIULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: **“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”** realizado por: Cuenca Capa Vanessa Alexandra, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, abril de 2015

f).

Bq.F. Zorayda Patricia Toledo Barrigas

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Cuenca Capa Vanessa Alexandra declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: **“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”**, de la Titulación de Bioquímico Farmacéutico, siendo Bq.F. Zorayda Patricia Toledo Barrigas directora del presente trabajo; eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

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

f)

Autor: Cuenca Capa Vanessa Alexandra

Cédula: 1104284854

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios, a la Virgen Santísima, a mi Divino Niño quienes han guiado siempre mi camino, por las bendiciones recibidas por regalarme salud y fuerza para superar las adversidades que se presentaron en este trayecto permitiéndome culminar mi carrera universitaria.

A mi querida mamita Teresa, la mujer que me llena de motivación y valor para seguir siempre adelante, gracias a su ejemplo, su apoyo, sus consejos su fortaleza y sobre todo por su amor incondicional ¡Te amo mamita!

A mi hijita Melina Anahy, que desde su existencia se ha convertido en el motor de mi vida. Por ti todo Chiquita Mía.

A mis hermanos Diego y Andrés, quienes estuvieron presentes en todo este camino, con su protección, apoyo y compañía.

A ti.... Cariño, gracias por el apoyo, la paciencia y el amor que siempre me has dado.

Vane

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por regalarme la vida y la salud por estar siempre a mi lado bendiciéndome a lo largo de mi vida, por ser mi fortaleza en los momentos de dificultad.

Mi sincero e infinito agradecimiento a mi madre por su esfuerzo para sacarme adelante, por el apoyo que sabe darme, gracias por tus consejos, tus sacrificios y tu paciencia. Este logro es tuyo también. A TI TE DEBO LO QUE SOY.

A ti hijita mía, gracias por permitirme sacrificar nuestro tiempo como familia, para cumplir mi meta. ¡TODO SACRIFICIO TIENE SU RECOMPENSA! Y este logro es la prueba.

A mis hermanos Diego y Andrés, a mis primos Claudia, Jhuly, Gustavo, Dani, gracias por sus consejos por tenderme una mano amiga y por cuidar de mi hija durante mi ausencia.

A mi familia, por brindare su apoyo y cariño en todo momento, gracias de todo corazón.

Al Doctor Heriberto Fernández y a mi directora de tesis Bq.F. Zorayda Toledo, infinita gratitud por los conocimientos impartidos, por haberme guiado y orientado en el desarrollo de esta investigación. Gracias por su paciencia y constancia.

A las Bq.F. Andrea, Janeth, Paulina y Sofía gracias por el tiempo que dedicaron a mi formación profesional.

A mis amigas Jhomar y Yomaira, con quienes formamos una linda amistad, gracias por las alegrías y el apoyo en los momentos difíciles, gracias por la amistad sincera.

A mis compañeros de trabajo Iliana y Johnson, por el tiempo que compartimos durante el desarrollo del proyecto, gracias por los momentos inolvidables.

Vane

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDO	PÁGINA
APROBACIÓN DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE GRÁFICAS	xii
ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN.....	1
ABSTRAC	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I	5
MARCO TEÓRICO	5
1.1. Familia Campylobacteraceae	6
1.1.1. Género <i>Campylobacter</i>	6

1.1.1.1. <i>Campylobacter jejuni</i>	7
1.1.1.2. <i>Campylobacter coli</i>	8
1.1.1.3. <i>Campylobacter lari</i>	8
1.1.1.4. <i>Campylobacter upsaliensis</i>	8
1.2. Infección por <i>Campylobacter</i>	9
1.2.1. Campylobacteriosis.....	9
1.2.1.1. Epidemiología.....	10
1.2.1.2. Patogenia.	10
1.2.1.2.1. Motilidad bacteriana y flagelos.	11
1.2.1.2.2. Adherencia e Invasión.....	12
1.2.1.2.3. Citotoxinas de distensión.....	12
1.2.1.3. Incidencia y prevalencia.	13
1.2.1.4. Tratamiento.	14
1.3. Antibióticos.....	15
1.3.1. Clasificación.....	15
1.3.1.1. Antibióticos β -lactámicos.	16
1.3.1.1.1. Penicilinas.	16
1.3.1.2. Aminoglucósidos.	17
1.3.1.3. Tetraciclinas.	17
1.3.1.4. Macrólidos.	17
1.3.1.5. Quinolonas.	17
1.4. <i>Campylobacter</i> en Ecuador	18

1.5. Métodos de aislamiento de <i>Campylobacter</i> termofílicos	19
CAPÍTULO II	21
METODOLOGÍA.....	21
2.1. Recolección de muestras	22
2.2. Procesamiento de muestras	22
2.2.1. Siembra e incubación.....	22
2.2.2. Aislamiento y Purificación.	22
2.2.3. Análisis cualitativo.....	23
2.2.3.1. Tinción Hucker.....	23
2.2.3.2. Prueba de la hidrólisis de hipurato.....	24
2.2.3.3. Prueba de susceptibilidad bacteriana.	24
2.2.4. PCR-MULTIPLEX.	25
2.2.5. Conservación.	26
2.3. Análisis de resultados.....	26
CAPÍTULO III	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES.....	36
RECOMENDACIONES.....	37

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
ANEXOS	46
EXTRACCIÓN DE ADN DE CELULAS BACTERIANAS <i>CAMPYLOBACTER</i>.....	47
PROTOCOLO: M-PCR ESPECIE-ESPECÍFICO PARA <i>CAMPYLOBACTER</i>	49
PROTOCOLO: GEL DE AGAROSA 1.5%	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microfotografía electrónica de <i>Campylobacter spp.</i>	6
Figura 2. Rutas para la infección por <i>Campylobacter</i>	9
Figura 3. Crecimiento de colonias, apariencia típica de <i>Campylobacter</i>	23
Figura 4. Bacilos curvos sugerentes de <i>Campylobacter</i>	23
Figura 5. Hidrólisis de hipurato por colonias de <i>Campylobacter</i>	24
Figura 6. Especies de <i>Campylobacter</i> aisladas de muestras de origen humano.....	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de partidores usados para el ensayo de PCR multiplex.....	25
Tabla 2. Frecuencia de aislamiento de <i>Campylobacter</i>	28
Tabla 3. Frecuencia de los cultivos aislados según la especie de <i>Campylobacter</i>	30

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Perfil de susceptibilidad de las cepas aisladas de <i>Campylobacter</i> , frente a 6 antibióticos analizados.....	32
---	----

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AMC	Amoxicilina-ácido clavulánico
AMP	Ampicilina
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>C. fetus</i>	<i>Campylobacter fetus</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>C. lari</i>	<i>Campylobacter lari</i>
<i>C. upsaliensis</i>	<i>Campylobacter upsaliensis</i>
<i>CadF</i>	Gen que codifica una proteína de unión a fibronectina
CA-SFM	Comité de Antibiograma de la Sociedad Francesa de Infectología
CAT	Cefoperazona, Anfotericina y Teicoplanina
CDC	Center for Disease Control and Prevention
Cdc42	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>
CDT's	<i>Cytolethal distending toxins</i>
CdtA	Citotoxinas de Distensión tipo A
<i>cdtA</i>	Gen que codifica las citotoxinas de distensión tipo A
CdtB	Citotoxinas de Distensión tipo B
<i>cdtB</i>	Gen que codifica las citotoxinas de distensión tipo B
CdtC	Citotoxinas de Distensión tipo C
<i>cdtC</i>	Gen que codifica las citotoxinas de distensión tipo C
CIM	Concentración Mínima Inhibitoria

CIP	Ciprofloxacino
DNAasa	Enzimas Hidrolasas Desoxirribonucleasas
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ER	Eritromicina
ETA	Enfermedad de transmisión alimentaria
EUCAST	Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana
FlaA	Flagelina tipo A
<i>flaA</i>	Gen que codifica la Flagelina tipo A
FlaB	Flagelina tipo B
<i>flaB</i>	Gen que codifica la Flagelina tipo B
GCCLO-2	Gastric <i>Campylobacter</i> organisms type 2
GM	Gentamicina
GTPasas	Enzima guanosina trifosfatasa
INT-407	Células intestinales (epiteliales) tipo INT-407
LPS	Lipopolisacárido
NACMCF	<i>National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods</i>
NARTC	<i>Nalidixic Acid Resistant Thermophilic Campylobacter</i>
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCRm	Reacción en Cadena de la Polimerasa Múltiple

pH	Potencial de Hidrogeno
PHA	Public Health Assosiation
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
SGB	Síndrome Guillain Barré
spp.	Especies
SST3	Sistema de Secreción tipo III
SST4	Sistema de Secreción tipo IV
SUH	Síndrome Urémico Hemolítico
TE	Tetraciclina
WHO	<i>World Health Organization</i>

RESUMEN

Campylobacter, es una bacteria zoonótica, causante de campylobacteriosis, provoca aproximadamente un 5-14% de diarrea a nivel mundial siendo los más afectados niños, ancianos y personas inmunodeprimidas. Debido a la importancia clínica y socioeconómica de ésta bacteria se determinó la prevalencia de las especies termotolerantes de *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* y *C. upsaliensis*) en niños con y sin diarrea del Hospital del Día, durante el periodo septiembre - diciembre 2014. Se recolectaron 79 muestras fecales, obteniéndose 7 cultivos positivos; siendo *C. jejuni* y *C. coli*, las especies aisladas, correspondiendo a una frecuencia del 9%. La identificación de especies se realizó considerando las características metabólicas de *Campylobacter*, frente a la hidrólisis de hipurato. La susceptibilidad bacteriana, se determinó mediante el método de difusión en agar Mueller Hinton con 5% de sangre según las recomendaciones del CA-SFM/EUCAST, encontrándose resistencia a: tetraciclina y ciprofloxacina 71% y para ampicilina 14%. Posteriormente se realizó PCR-MULTIPLEX con la finalidad de complementar los resultados obtenidos según la bioquímica convencional. Los resultados muestran que la prevalencia de *Campylobacter*, en esta entidad de salud corresponde al 9%.

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

ABSTRAC

Campylobacter is a zoonotic bacteria, causes campylobacteriosis, provoking approximately 5-14% of diarrhea worldwide being most affected children, elderly and individuals immunocompromised. Due to the clinical and socioeconomic importance of this bacteria was determined prevalence of thermotolerant species of the Campylobacter (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* and *C. upsaliensis*) in children with and without diarrhea of the Day Hospital during the period September to December 2014. Were collected 79 Fecal samples, being obtained 7 positive cultures; being *C. jejuni* and *C. coli*, the isolated species, corresponding to a frequency of 9%. Species identification was made considering the metabolic characteristics of Campylobacter, against hydrolysis of hippurate. The Bacterial susceptibility was determined by the diffusion method in Mueller Hinton agar with 5% blood as recommended CA-SFM / EUCAST, Getting resistance to: ciprofloxacin tetracycline 71% and ampicillin 14%. Subsequently is conducted a MULTIPLEX-PCR in order to complement the results obtained by conventional biochemistry. The results show that the prevalence of Campylobacter in this health institution corresponds to 9%.

KEY WORDS: *Campylobacter*, *C. jejuni*, *C. coli*.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas continúan siendo una causa principal de morbilidad y una causa relativamente importante de muerte entre los niños del Ecuador. Es probable que cada niño sufra tres o cuatro ataques anuales de diarrea durante los primeros dos años de vida (Guderian, *et al.* 1987). La Organización Mundial de la Salud (OMS) (2011) estima que, cada año, en los países en vías de desarrollo (África y América Latina), se presentan 1 300 millones de episodios de diarrea en niños menores de cinco años, los cuales ocasionan cuatro millones de decesos, lo que ubica a la diarrea entre las principales causas de muerte en estos países.

Campylobacter, es una bacteria zoonótica, agente causal de la campylobacteriosis una enfermedad transmitida por los alimentos (ETA). Este microorganismo tiene una gran importancia socioeconómica tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, provocando casos de diarrea (OMS, 2011), siendo los más afectados los niños, ancianos y personas inmunodeprimidas (Silva, *et al.* 2011). El género *Campylobacter* consiste en un grupo grande y diverso de bacterias morfológicamente distintas. Estas bacterias son nutricionalmente exigentes (requiere entornos complejos nutricionales) y crecen en condiciones estrictamente microaeróbicas (Si, 2011).

Las especies termófilas del género *Campylobacter* son patógenas de interés en salud pública debido a que la mayoría de las enteritis que afectan a los pacientes pediátricos se deben a este enteropatógeno, siendo *C. jejuni* y *C. coli*, las más frecuentemente aisladas en casos de diarrea aguda en el hombre (Moore, *et al.* 2005).

Los retos que plantea esta enfermedad hacen necesario un conocimiento más profundo de los factores epidemiológicos, la distribución del patógeno en el medio ambiente y alimentos, la heterogeneidad de la población microbiana en diferentes puntos, para con ello ayudar en la evaluación de la eficacia de las medidas de reducción del patógeno (Prieto, 2012).

La distribución de este microorganismo en el ambiente y en hospedadores animales (mascotas) no ha sido ampliamente estudiada. Entre los años 2009 y 2010, *Campylobacter*, fue reconocido como el principal agente etiológico en pacientes con diarrea en el establecimiento asistencial “Dr. Lucio Molas” de Argentina (datos no publicados). (Tamborini, 2012).

En Ecuador el análisis rutinario de esta bacteria no se ha establecido, por lo tanto no se cuenta con datos sobre la infección prevalencia y distribución de éste enteropatógeno, como

causante de diarrea en niños, lo cual limita y omite una fuente importante de información para la evaluación y control de la morbimortalidad causada por la diarrea en niños de nuestro medio. Debido a la importancia que ha adquirido *Campylobacter* por su prevalencia en las últimas décadas como agente causal de diarrea infecciosa en los menores, y al no contar con investigaciones existentes a nivel local y nacional; se realizó este trabajo de investigación con el objetivo de determinar la prevalencia de *Campylobacter* identificando las especies causantes de enfermedades diarreicas en los menores y su frecuencia en nuestra localidad en pacientes del “Hospital del Día” durante el periodo Septiembre – Diciembre 2014, con la finalidad de obtener datos reales, confiables y actuales que sirvan para el tratamiento oportuno y eficaz, además de proporcionar información para el control de la infección por *Campylobacter*.

Para ello, se realizaron cultivos en medios selectivos para *Campylobacter*. La identificación de especies se realizó considerando las características metabólicas de *Campylobacter*, frente a la hidrólisis de hipurato. Adicionalmente el perfil de susceptibilidad se determinó de acuerdo a las recomendaciones del Comité de Antibiograma de la Sociedad Francesa de Infectología (CA-SFM) / Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) (CNRC, 2012). Posteriormente se realizó PCR-MULTIPLEX con la finalidad de complementar los resultados obtenidos según la bioquímica convencional.

Los datos obtenidos durante dicho periodo nos permitieron identificar que la prevalencia de las especies termotolerantes de *Campylobacter*, causales de enteritis en pacientes pediátricos de “Hospital del Día”, corresponde al 9%, estableciendo a esta bacteria como agente de relevante importancia clínica. La presente investigación representa un estudio actualizado y de información y datos clínicos en la búsqueda de este patógeno como causante de diarrea en este grupo etario.

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

1.1. Familia Campylobacteraceae

La Familia *Campylobacteraceae* comprende los géneros *Campylobacter* y *Arcobacter*, los cuales agrupan bacilos Gram negativos curvos, de carácter zoonótico, con amplia distribución en la naturaleza, reconociendo como reservorio natural a una gran variedad de aves y mamíferos (Vadamme 2000).

1.1.1. Género *Campylobacter*.

El género *Campylobacter* consiste en bacilos Gram negativos en forma de coma, pequeños (0,2 a 0,5 μ m longitud x anchura 0,5 a 5,0 μ m) que son móviles por medio de un flagelo polar. En cultivos antiguos pueden aparecer en forma cocoide (Murray, 2015). Es un grupo grande y diverso de bacterias que comprende actualmente 25 especies, dos especies provisionales y ocho subespecies. Los miembros del género *Campylobacter* tienen diversidad morfológica, incluyendo espiral, curvada o en forma de varilla. Estas bacterias son nutricionalmente exigentes (requiere entornos nutricionales complejos) y crecen en condiciones estrictamente anaerobias o microaeróbicas. Los miembros del género *Campylobacter* colonizan naturalmente a los seres humanos, otros mamíferos, aves, reptiles y crustáceos. El miembro más conocido es *C. jejuni*, la principal causa de gastroenteritis bacteriana en los seres humanos en todo el mundo, seguido por *C. coli*. En la última década, un número creciente de especies de *Campylobacter*, distintos de *C. jejuni* y *C. coli* han sido reconocidas como importantes patógenos en humanos y animales. Sin embargo, no todas las especies se consideran actualmente como patógenos emergentes, ya que son recién identificados o poco se sabe acerca de su relevancia clínica y potencial patogénico (Si, 2011).



Figura 1. Microfotografía electrónica de *Campylobacter* spp.

Fuente: (Fernández, 2008).

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

Varias especies de *Campylobacter* han sido reconocidas como patógenos intestinales en el ser humano (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis*) (Vandamme 2000).

1.1.1.1. *Campylobacter jejuni*.

En esta especie se reconoce como taxones independientes a las subespecies *C. jejuni* subsp. *jejuni* y *C. jejuni* subsp. *doylei* (Fernández, et al. 2008).

C. jejuni es un germen enteropatogénico que eventualmente invade el sistema circulatorio. Sin embargo, esto ocurre solamente en los inicios de la infección ya que, como es sensible al poder bactericida del suero humano, es eliminado rápidamente de la circulación. La infección intestinal se localiza en el intestino delgado y grueso, donde la bacteria se adhiere al epitelio y prolifera, expresando sus factores de virulencia, los que pueden ser componentes estructurales o toxinas. La adherencia es el paso inicial para que ocurra la infección (Fernández, et al. 2008).

C. jejuni subsp. *jejuni*, es agente causal de diarreas, siendo considerado el más virulento por su mayor resistencia a la fagocitosis (WHO, 2007).

C. jejuni carece de fimbrias y se ha demostrado que elementos estructurales como el flagelo, algunas proteínas de membrana externa y el lipopolisacárido (LPS) actúan como adhesinas que le permiten fijarse a la célula epitelial y al muco intestinal. La forma curva y el movimiento típico en "sacacorcho" de *Campylobacter*, como también la atracción quimiotáctica que ejerce el muco intestinal sobre la bacteria, facilitan el contacto de ésta con el epitelio (Fernández, et al. 2008).

C. jejuni subsp. *doylei* inicialmente denominada GCL0-2 (Gastric *Campylobacter* like organisms type 2) es un bacilo Gram-negativo curvo, con un único flagelo en uno o ambos extremos. Son microaerófilos, de desarrollo relativamente lento, cuya temperatura óptima de crecimiento es de 35-37°C (Fernández, et al. 2008). Esta especie ha sido aislada en baja frecuencia del epitelio de la región del antro gástrico en pacientes con úlcera gástrica y gastritis crónica activa, como también de niños con diarrea. Su importancia clínica,

frecuencia de aislamiento y mecanismos de patogenicidad aún no están bien establecidos (Fernández, *et al.* 2007)

1.1.1.2. *Campylobacter coli.*

Se considera que la diarrea que produce es más benigna. Esta especie es muy semejante a *C. jejuni* y su diferenciación fenotípica se basa en la hidrólisis del hipurato (*C. jejuni*: positiva; *C. coli*: negativa). No existen grandes diferencias entre ambas especies con respecto a su patogenicidad, composición antigénica, características epidemiológicas relacionadas con los mecanismos de transmisión y su distribución en animales. Entre estos últimos, *C. coli* reconoce al cerdo como su principal reservorio natural. En los países industrializados, es responsable de 3-5% de los casos de diarrea producidos por las especies termotolerantes del género. En los países en desarrollo esta frecuencia puede llegar al 25% (WHO, 2007).

1.1.1.3. *Campylobacter lari.*

Esta especie, denominada inicialmente NARTC (nalidixic acid resistant thermophilic *Campylobacter*), actualmente es reconocida como agente de diarrea y septicemia en el hombre. Su frecuencia de aislamiento es menor que la de *C. coli*. Ha sido asociada a brotes de diarrea producidos por ingesta de agua contaminada. Su reservorio más importante son aves marinas, principalmente gaviotas, aunque también puede ser aislada de otros animales (Fernández, *et al.* 2008).

1.1.1.4. *Campylobacter upsaliensis.*

Esta especie fue aislada en 1983 de perros con y sin diarrea, presentando como principales características fenotípicas su capacidad de crecer a 37-42°C y una débil o nula producción de catalasa. También ha sido aislado de gatos, patos, monos, pelícanos, gorriones y gallinas. En el hombre produce diarrea y bacteriemia en niños y adultos inmunocompetentes e inmunocomprometidos. Sus mecanismos de patogenicidad aún no están definidos aunque se le reconoce capacidad de adherencia a células de origen endotelial. Su frecuencia real de aislamiento en procesos infecciosos del hombre y su distribución ecológica, tanto en diferentes países como en animales no se conocen. Como muchas cepas pueden ser sensibles a algunos antibióticos incluidos en los medios selectivos para *Campylobacter*, se recomienda la filtración de suspensiones fecales a través de membranas de 0,45 µm para su aislamiento. El síndrome de Guillain Barré (SGB) y el síndrome urémico hemolítico (SUH) han sido descritos como secuelas postinfección (Fernández, *et al.* 2008).

1.2. Infección por *Campylobacter*

Campylobacter, se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, el reservorio natural es una gran variedad de animales domésticos y de vida silvestre, tales como ganado vacuno, cerdos, ovejas, aves de corral, cabras, perros, gatos y roedores, entre otros. Las aves de consumo y sus subproductos constituyen uno de los principales reservorios y fuente de infección humana (Cervantes & Cravioto, 2007).

El microorganismo se adquiere por vía oral (ingestión de comidas y bebidas contaminadas) o por contacto con animales infectados (Figura 2). *C. jejuni* es sensible al pH gástrico, por lo que debe ingerirse un inóculo de 10^4 para que se produzca la infección, sin embargo en algunos casos es altamente infectante, provocando la infección con dosis del orden de 500 microorganismos (Malbran, 2001).

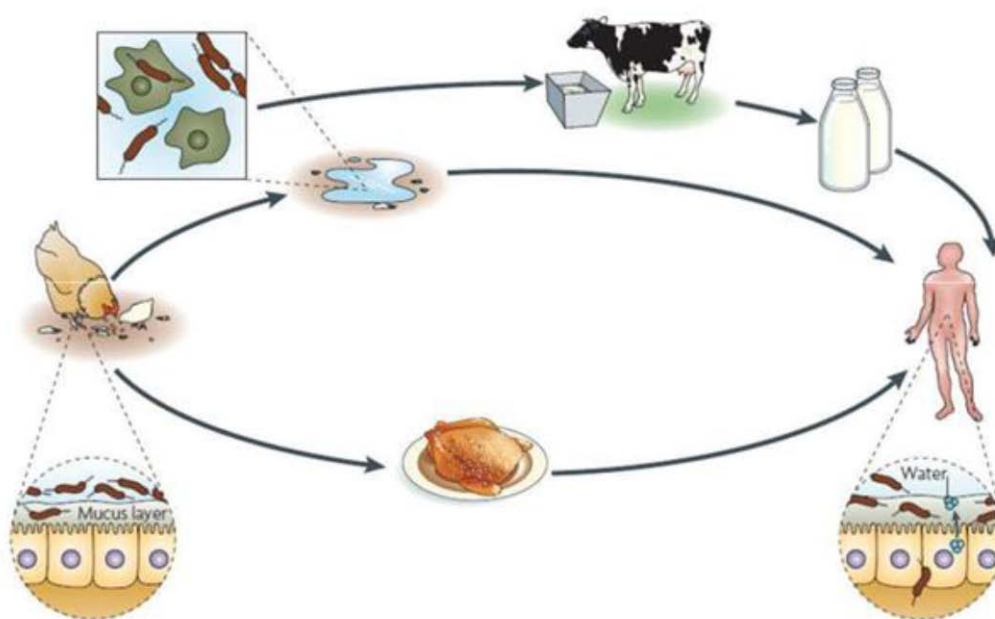


Figura 2. Rutas para la infección por *Campylobacter*.

Fuente: (Young, et al. 2007)

1.2.1. Campylobacteriosis.

La campylobacteriosis es considerada una zoonosis mundial, *C. jejuni* y *C. coli*, son considerados como agentes importantes de diarrea en el ser humano, y *C. fetus*, como agente de infección sistémica en pacientes inmunocomprometidos.

La infección gastrointestinal por *Campylobacter*, generalmente es autolimitada. Se caracteriza por diarrea acuosa, fiebre y dolor abdominal. Sin embargo, los síntomas y signos

no son distintos a otras infecciones causadas por otras bacterias, lo que dificulta el diagnóstico etiológico. El periodo de incubación es de 2 a 5 días, pero puede extenderse hasta los 10 días. Las infecciones extraintestinales por *Campylobacter* como meningitis, osteomielitis y sepsis neonatal son raras, pero se han reportado casos (Cervantes & Cravioto, 2007).

1.2.1.1. Epidemiología.

Muchos de los casos de enteritis humana han sido asociados al contacto con animales, agua contaminada o alimentos de origen animal.

Se considera que un alto porcentaje de infecciones es provocado por consumo de carne de ave mal cocida (WHO, 2007).

Se cree que el origen primario de las infecciones por *C. jejuni* y *C. coli* en humanos está en la manipulación y/o el consumo de carne contaminada, especialmente la carne de aves de corral. No obstante, también se cree que el contacto con los animales domésticos y el ganado, el consumo de agua contaminada o leche cruda y el desplazamiento en zonas de alta prevalencia también son factores de riesgo para la enfermedad humana (Friedman, *et al.* 2000).

Este padecimiento es más frecuente en los niños, en los pacientes inmunocomprometidos o en personas con padecimientos crónicos.

Existe evidencia de que *C. jejuni* tiene preferencia por algunos huéspedes, ya que predomina en aves de corral (particularmente en pollos), aves migratorias (patos) y en ganado, mientras que *C. coli* se presenta sobre todo en los cerdos (Romero, 2007).

1.2.1.2. Patogenia.

Campylobacter, es una bacteria patógena que afecta al hombre, causando diarrea y otras enfermedades como septicemia, meningitis o complicaciones, como artritis reactivas y el SGB (Hughes, *et al.* 2009). El conocimiento de la naturaleza, de la regulación y de los mecanismos de acción de los factores de virulencia de *Campylobacter* son elementos indispensables para la prevención y el tratamiento de esta enfermedad (Lapierre, 2013).

En los últimos años, se han identificado muchos factores de virulencia que podrían estar involucrados en la patogenia que produce *Campylobacter* en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, la asociación entre factores de virulencia y patogenicidad, aún no está totalmente

clara debido fundamentalmente a la heterogeneidad de las cepas existentes (Cróinin & Backert, 2012).

Los factores de virulencia, que más se han relacionado con patogenicidad son la motilidad por la presencia de flagelos, la capacidad de adherencia e invasión a la célula eucarionte y la producción de citotoxinas (Janssen, *et al.* 2008).

1.2.1.2.1. Motilidad bacteriana y flagelos.

Campylobacter es una bacteria móvil por flagelación anfítrica y esta característica es esencial para la colonización de células humanas. El flagelo está compuesto por una flagelina mayor FlaA y una menor FlaB. Existe una clara asociación entre motilidad e invasión en las cepas de *Campylobacter* (Cróinin & Backert, 2012).

Existen estudios que han mostrado que el flagelo posee un rol complejo en la patogenicidad que incluye la secreción de proteínas, esto se cree fundamentalmente ya que las especies de *Campylobacter* no poseen sistemas de secreción tipo 3 o tipo 4 (SST3 y SST4), que son cruciales en otras especies patógenas entéricas (Guerry, 2007).

Konkel *et al.* (2001), han descrito la secreción de 8 proteínas Cia (*Campylobacter* invasión *antigen*s) cuando *Campylobacter* es incubado junto a células de cultivo. Sólo se ha identificado una de estas proteínas CiaB, la mutación del gen *ciaB* produce una reducción de un 50% en la capacidad de invasión de *Campylobacter* a células epiteliales.

La secreción de proteínas CiaB requiere la estructura flagelar, es así como la secreción se produce en cepas con mutaciones en el gen *flaA* o en el gen *flaB* pero no en cepas con ambos genes mutados a las cuales les falta todo el flagelo (Guerry, 2007).

La flagelina de *Campylobacter* es una estructura altamente glicosilada y la glicosilación es muy importante en cepas de *C. jejuni* ya que no se puede ensamblar el flagelo si esta proteína no está adecuadamente glicosilada. Por otra parte la formación de biofilms es mediada por los glicanos de la flagelina. Entonces la formación de biofilms podría facilitar la sobrevivencia de bacterias en el agua y en el medioambiente. Interesantemente hay estudios que indican la formación de biofilms requiere de la presencia del flagelo (Lapierre, 2013).

1.2.1.2.2. Adherencia e Invasión.

Existe una correlación entre el grado de adherencia e invasión de cepas de *Campylobacter* a células epiteliales de cultivo *in vitro*, con el grado de severidad de los síntomas clínicos en pacientes infectados con dichas cepas.

Un factor importante que ha sido investigado es *CadF* (gen que codifica una proteína de unión a fibronectina) que es expresado en todas las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* y se sabe que participa en la adhesión celular uniéndose a fibronectina. Es interesante señalar que el gen *CadF* de las cepas de *C. coli* es diferente del gen *CadF* de las cepas de *C. jejuni* por una secuencia de inserción de 39 bp y se ha demostrado en experimentos realizados en cultivos *in vitro* que *C. jejuni* se une e invade células epiteliales INT-407 mucho más eficientemente que cepas de la especie *C. coli*. *CadF* juega un rol doble, por un lado su papel en la adherencia tipo "tiggers" a la célula hospedera por unión a la fibronectina, que está localizada en la superficie celular y por otro lado esta unión entonces produce procesos de señalización para la adherencia tipo tiggers los cuales conducen a la activación de pequeñas GTPasas Rac1 y Cdc42 y que inducen la propia internalización de la bacteria en la célula hospedera (Dasti, *et al.* 2010).

1.2.1.2.3. Citotoxinas de distensión.

Muchos patógenos Gram negativos producen citotoxinas de distensión o CDT's, que causa arresto del ciclo celular y muerte celular en cultivos celulares humanos y está compuesta en el caso de *Campylobacter* por 3 subunidades codificadas por los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*. Se sabe que la proteína CdtB ingresa a la célula hospedera y se une en la superficie celular con las proteínas CdtA y CdtC produciendo daño en el DNA celular. La subunidad que tiene el efecto es CdtB debido a su actividad DNAasa rompe el DNA y entonces comienza en la célula el mecanismo de reparación que concluye con el arresto celular y la muerte de la célula (Ge, *et al.* 2008).

Existe evidencia que la producción de CDT contribuye a aumentar la patogenicidad de las cepas de *C. jejuni*, ya que prolonga la persistencia de la enfermedad gastrointestinal, aumentando la inflamación de la mucosa gastrointestinal y el daño hepático esto observado en ratones susceptibles. Sin embargo, el conocimiento actual del rol de las toxinas CDT es aún muy limitado. Respecto de la epidemiología, en cepas de *Campylobacter* la toxina CDT es altamente prevalente, sin embargo el efecto citopático *in vivo* varía notablemente desde

un efecto muy importante hasta incluso estar ausente en algunos aislados (que poseen los genes pero no expresan la citotoxina) (Lapierre, 2013).

1.2.1.3. Incidencia y prevalencia.

Campylobacter, se ha convertido en una de las causas más frecuentes de gastroenteritis bacteriana transmitida por alimentos (Prieto, 2012). Las especies de *Campylobacter* asociadas con la enfermedad gastrointestinal incluyen *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. fetus* y *C. upsaliensis*. De entre ellos *C. jejuni* y *C. coli* son los más frecuentemente aislados de muestras clínicas en el hombre.

Probablemente, el estado de portador sano de *Campylobacter* en países de América del Sur se relaciona con aspectos ligados a bajas condiciones de saneamiento básico, las que pueden promover mayores oportunidades de transmisión de las especies diarreogénicas de *Campylobacter*, especialmente a niños de corta edad, desde sus reservorios y fuentes de contaminación (Oberhelman, *et al.* 2003)

Se cree que el consumo de carne de aves de corral poco cocida es una de las fuentes principales de infección con *Campylobacter*. Las aves son portadoras de *C. jejuni* y constituyen el principal reservorio de este patógeno, pero no muestran signos clínicos de enfermedad. Es posible encontrarla en heces, canales de aves recién sacrificadas y en los huevos (Farace & Viñas, 2007).

En países que adoptaron estrategias específicas para reducir la prevalencia de *Campylobacter*, en las aves de corral vivas, se ha observado una reducción similar en los casos humanos (OMS, 2011).

Varias especies de *Campylobacter* han sido reconocidas como patógenas para el ser humano y su transmisión se realiza vía oral-fecal, a través del consumo de alimentos o agua contaminada, o bien por contacto directo con los animales reservorios. Dentro del grupo *Campylobacter* hay veinticinco especies, pero las especies *C. jejuni*, *C. lari* y *C. coli* son las que causan más enfermedad en humanos (Fernández, *et al.* 2007).

En un gran número de países desarrollados, se ha observado que la incidencia de infecciones por *Campylobacter*, notificadas se ha incrementado enormemente. Reportes realizados por la European Food Safety Authority (EFSA) y el European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), indican que en los últimos años la campylobacteriosis ha sido la zoonosis más notificada. Por otra parte, cabe destacar, que existe un alto número de

casos que no son notificados, por lo que la tasa de infección real es aún mayor. Con estos antecedentes se han realizado estimaciones en las que la prevalencia de campylobacteriosis sería entre un 7,6 y 100 veces más alta que los valores oficiales declarados en cada país (CDC, 2013).

Por su incidencia, duración y secuelas, la diarrea por *Campylobacter* tiene gran importancia socioeconómica. En los países en desarrollo, las infecciones por *Campylobacter* en menores de 2 años son especialmente frecuentes y a veces mortales (OMS, 2011). El papel de las especies enteropatógenicas de *Campylobacter* en la etiología de la enfermedad entérica humana ha sido bien establecida tanto en los países industrializados como en los que se encuentran en desarrollo. Sin embargo, en estos últimos todavía no se conocen bien sus vías de transmisión, existiendo consenso que el medio ambiente y el nivel de saneamiento básico tienen importancia en la transmisión de estos agentes (WHO, 2007)

1.2.1.4. Tratamiento.

La mayoría de los casos de enteritis por *Campylobacter* no requieren tratamiento, ya que generalmente se trata de eventos de corta duración y autolimitados. No obstante, cuando los síntomas son prolongados o muy graves es necesaria la terapia antimicrobiana. Para estas ocasiones la eritromicina es el antibiótico de elección. Algunas especies de *Campylobacter* son resistentes a la penicilina, la ampicilina y las cefalosporinas. El incremento de la resistencia a las fluoroquinolonas coincide con la administración de éstas en aves de corral y en medicina veterinaria en general. La mayoría de las cepas del *C. jejuni* son aún susceptibles a: eritromicina, azitromicina, gentamicina, tetraciclina y cloranfenicol. La eritromicina y la azitromicina acortan la duración de la enfermedad cuando se administran en etapas tempranas de la infección gastrointestinal (Hernández, *et al.* 2013).

Algunos pacientes con gastroenteritis asociada a *C. lari* se recuperan sin necesidad de tratamiento antibiótico. Por lo tanto, si el tratamiento antibiótico es sumamente esencial para la gastroenteritis asociada con *Campylobacter*, no está clara (Krause, 2002) Sin embargo, un estudio ha demostrado que el riesgo de muerte es mayor en pacientes con bacteriemia asociadas con *Campylobacter*. (Si, 2011).

Una preocupación particular es que la resistencia a la ciprofloxacina en *Campylobacter*, principalmente de *C. jejuni* y *C. coli* aislado de los seres humanos, es cada vez mayor, que parece coincidir con el uso de fluoroquinolonas en la cría de animales. Se requieren esfuerzos adicionales para controlar el patrón de resistencia a antibióticos en las especies

emergentes (Cody, *et al.* 2010). En conjunto, a pesar de los beneficios del tratamiento con antibióticos se han documentado tanto para las infecciones gastrointestinales y extragastrointestinales asociados con las especies de *Campylobacter*, la caracterización adicional de sus perfiles de susceptibilidad a los antibióticos, como un requisito previo para la formulación del tratamiento más adecuado para cada paciente y sus condiciones (Si, 2011).

Por lo tanto, el contar con métodos que permitan el estudio de sensibilidad a antimicrobianos en este género, permitirá la instauración de tratamientos antibióticos efectivos.

1.3. Antibióticos

Los antibióticos son sustancias producidas por diversas especies de microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos) (Brunton, *et al.* 2007), que en bajas concentraciones es capaz de inhibir e, incluso, destruir otros microorganismos sin producir efectos tóxicos en el hospedador. Una propiedad común de todos los antibióticos es la toxicidad selectiva: presentan una toxicidad hacia los organismos invasores superior a la que muestran frente a animales o seres humanos (Lorenzo, *et al.* 2013).

1.3.1. Clasificación.

- Por su estructura química: los antibióticos se agregan en familias, con propiedades generales similares.
- Por su espectro de acción:
 - De amplio espectro: tetraciclinas, cloranfenicol y algunos β -lactámicos
 - De espectro intermedio: macrólidos y aminoglucósidos
 - De espectro reducido: glucopeptidos.
- Por su efecto antimicrobiano:
 - Bacteriostáticos (Bloquean el desarrollo de las bacterias): tetraciclinas, sulfamidas, trimetropina, cloranfenicol, macrólidos y lincosamidas.
 - Bactericidas (provocan la muerte bacteriana): β -lactámicos, aminoglucósidos, fosfomicina, nitrofurantoína, polipéptido, quinolonas, rifampicina y vancomicina.

- Por su mecanismo de acción:
 - Inhibidores de la síntesis de pared celular: β -lactámicos (p.ej., penicilinas, cefalosporinas y carbapenem) y otros medicamentos como cicloserina, vancomicina y bacitracina.
 - Inhibidores de la permeabilidad de la membrana plasmática: aumentando la permeabilidad y provocando la salida de compuestos intracelulares, como detergentes del tipo polimixina; antibióticos de tipo polieno (p.ej., niostatina y anfotericina B) que se adhieren a los esteroides de la pared celular y el polipéptido daptomicina.
 - Inhibidores de la síntesis proteica: alteran la función de las subunidades ribosómicas 30S o 50S para inhibir de forma reversible la síntesis de proteínas, que suelen ser bacteriostáticos (p.ej., cloranfenicol, tetraciclinas, eritromicina, clindamicina, estreptograminas y linezólido).
 - Inhibidores de la síntesis o función de ácidos nucleicos: estos agentes antimicrobianos pueden actuar interfiriendo en la replicación del DNA (quinolonas), impidiendo la transcripción (rifamicinas y nitroimidazoles) o inhibiendo la síntesis de metabolitos esenciales (sulfamidas, trimetropina, ácido paraaminosalicílico, sulfonas) (Brunton, *et al.* 2007)

1.3.1.1. Antibióticos β -lactámicos.

Constituyen uno de los grupos más importantes dentro de la terapéutica anti-infecciosa, puesto que continúan siendo el tratamiento de primera elección en numerosos procesos infecciosos (Lorenzo, *et al.* 2013).

Se caracterizan por poseer en su estructura química el anillo β -lactámico que resulta de la unión de alanina y β -dimetilcisteína. Actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana. Este grupo comprende las penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, monobactams y los inhibidores de β -lactamasas (Lorenzo, *et al.* 2013).

1.3.1.1.1. Penicilinas.

Son un grupo de antibióticos de origen natural semisintético que poseen en su estructura un anillo tiazolidínico unido a un anillo β -lactámico. La cadena lateral del anillo β -lactámico

determina las propiedades farmacológicas concretas de las diferentes penicilinas. Los microorganismos sensibles tienen proteínas fijadoras de penicilinas a las que se une el antibiótico. Esta interacción inhibe la formación de enlaces cruzados peptídicos dentro de la pared de la célula microbiana y activa indirectamente las enzimas autolíticas. El resultado de todo esto es la lisis del microorganismo (Yassin, 2011).

1.3.1.2. Aminoglucósidos.

Son sustancias producidas por los actinomicetos (bacterias) *Streptomyces* ssp., y *Mycromonospora* ssp. Los aminoglucósidos son bactericidas rápidos, inhiben la síntesis proteica bacteriana y alteran la integridad de la membrana citoplasmática, se unen de manera irreversible a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Esta unión interfiere con la elongación de la cadena peptídica de la bacteria. (Brunton, *et al.* 2007).

1.3.1.3. Tetraciclinas.

Las tetraciclinas son congéneres de la naftacenecarboxamida policíclica, están formadas por la fusión de cuatro anillos bencénicos con diversos sustituyentes. Al igual que otros agentes que afectan la función ribosomal, las tetraciclinas se consideran “antimicrobianos de amplio espectro”, al ser un bacteriostático, inhibe la síntesis proteica bacteriana (Brunton, *et al.* 2007).

1.3.1.4. Macrólidos.

Los macrólidos son productos metabólicos de una cepa de *Streptomyces erythaeus*. Son bases débiles, compuestas de lactonas de 14 - 16 miembros, unidas a azúcares aaminadas o neutrales por medio de enlaces glicosídicos. Son bacteriostáticos que inhiben la síntesis de proteínas al unirse de manera reversible a las subunidades Ribosómicas 50S de los microorganismos sensibles. Básicamente, los macrólidos son activos contra cocos Gram positivos, pero también tienen acción contra anaerobios y algunos bacilos Gram positivos (Brunton, *et al.* 2007).

1.3.1.5. Quinolonas.

Las quinolonas son antibióticos de amplio espectro de actividad obtenidos por síntesis. Penetran a través del canal acuoso de las porinas. Son los únicos agentes antibacterianos que ejercen su actividad bactericida uniéndose a topoisomerasas bacterianas e inhibiéndolas. La inhibición de la actividad de estas enzimas impide a la célula

bacteriana producir las proteínas necesarias para su reparación, crecimiento y reproducción. Una inhibición prolongada conduciría así a la muerte de la célula. Las quinolonas actúan también a nivel de ADN-girasa (también llamada topoisomerasa tipo II) y de la topoisomerasa tipo IV (Brunton, *et al.* 2007).

1.4. *Campylobacter* en Ecuador

La enfermedad diarreica aguda en nuestro país se encuentra entre los principales motivos de consulta de niños en las diferentes casas de salud, siendo la principal etiología la infecciosa, siendo *Campylobacter*, uno de los agentes causales de esta enfermedad (Andrade, *et al.* 2013).

En un estudio realizado en Ecuador por Vasco, *et al.* (2013) acerca de agentes etiológicos causantes de diarrea en diferentes comunidades, estableció que:

- En Ecuador la incidencia de enfermedades diarreicas se incrementó de 17 / 1.000 habitantes en 1994 a 46 / 1.000 habitantes en el año 2012, describiendo diversidad de patógenos causantes de diarrea.
- *C. jejuni* y *C. coli* han sido aislados en mayor frecuencia, siendo en muchos de los casos el portador asintomático por varios factores, incluyendo la patogenicidad de la cepa, la inmunidad del huésped contra los factores patógenos, la microbiota intestinal y la inmunidad de grupo. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que el *Campylobacter*, está presente en los ambientes donde la gente vive en estrecha proximidad con los animales y en malas condiciones de saneamiento.

Guderian, *et al.* (1987), en su estudio realizado en Quito, reporta una frecuencia relativamente alta de *Campylobacter* (35,3%) como causante de diarrea aguda en niños de entre 19 y 24 meses de edad. Para lo cual señala que la infección por *Campylobacter* puede deberse a condiciones sanitarias deficientes y al contacto directo con animales y heces contaminadas. Estableciendo así que *Campylobacter* fue la causa conocida más frecuente de la enteritis bacteriana en niños de Quito. Además reconoce que al no usar métodos específicos para aislar *Campylobacter* y otros agentes patógenos de muestras fecales en Ecuador, se está omitiendo una fuente importante de información para los clínicos.

1.5. Métodos de aislamiento de *Campylobacter* termofílicos

C. jejuni y *C. coli* son bacterias termófilas que necesitan condiciones microaerófilas a 37-42°C para su crecimiento óptimo. Se emplean medios de cultivo selectivos con antibióticos para aislar los microorganismos de muestras fecales y de alimentos, por la existencia de flora competidora (Kim, *et al.* 2009). A pesar de que los medios de cultivo tienen limitaciones ya que requieren de un tiempo adicional para la incubación y su capacidad de detección es variable, son imprescindibles si se quiere aislar el microorganismo para caracterizar y confirmar la identidad de las cepas aisladas por métodos fenotípicos o genotípicos. Para el análisis de muestras de alimentos o ambientales en las que el número de células de *Campylobacter*, suele ser bajo y/o existe flora acompañante, se requieren etapas de enriquecimiento previas a la siembra en el medio selectivo (Prieto, 2012).

No existe un método estándar aceptado universalmente para el aislamiento de *Campylobacter*, y se considera que los medios de cultivo disponibles en la actualidad no son óptimos para la recuperación de *Campylobacter* de muestras de diverso tipo (Kim, *et al.* 2009). En el 2007, el National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF), señala que existen numerosos métodos de aislamiento de *Campylobacter*, pero la metodología no está suficientemente normalizada.

La mayor parte de los medios están disponibles comercialmente. La selectividad de los medios viene determinada por los antibióticos utilizados. La principal diferencia entre los medios es el grado de inhibición de la flora contaminante.

Todos los agentes selectivos permiten el crecimiento de *C. jejuni* y *C. coli*. No existe ningún medio disponible que permita el crecimiento de *C. jejuni* e inhiba el de *C. coli* o viceversa. Hasta cierto punto, otras especies de *Campylobacter* (por ejemplo *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus*, *C. fetus* y *C. hyointestinales*) crecerán en la mayoría de los medios, especialmente a la temperatura menos selectiva de 37°C.

La filtración pasiva, es un método que evita la necesidad de medios selectivos; de modo que resulta muy útil para el aislamiento de especies de *Campylobacter* sensibles a antimicrobianos (OIE, 2008). La especificación bioquímica puede completarse o incluso sustituirse por métodos moleculares. Se han descrito pruebas de identificación basadas en una variedad de sondas de ADN y en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la especie *Campylobacter* (On, *et al.* 2009)

El objetivo de las técnicas moleculares es el diagnóstico rápido y seguro en alimentos, así como a la tipificación de *Campylobacter*, prestando especial atención las especies termófilas *C.jejuni* y *C.coli* por su mayor implicación en las infecciones humanas transmitidas por esta vía. (Al, *et al.* 2007).

El empleo de métodos serológicos y moleculares como PCR y una de sus variantes, la PCR múltiple (PCRm), son otras herramientas útiles en la epidemiología el diagnóstico y la investigación. Estos métodos identifican la bacteria, ya sea a partir de cultivos puros o bien directamente de heces humanas o de pollos (Al, *et al.* 2007).

CAPÍTULO II
METODOLOGÍA

2.1. Recolección de muestras

Se recolectaron 79 muestras de heces obtenidas de pacientes pediátricos del “Hospital del Día” durante el período septiembre - diciembre 2014.

Las muestras que se consideraron para el estudio fueron aquellas que cumplieron los siguientes criterios:

- Edad de los pacientes comprendida entre 0 -13 años
- No haber sido sometidos a terapia con antibiótico en los 15 días previos a la toma de muestra

Las muestras que cumplieron los criterios fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica Particular de Loja.

2.2. Procesamiento de muestras

2.2.1. Siembra e incubación.

La siembra se realizó en medios de cultivo para *Campylobacter*, agar sangre suplementado con antibióticos (Butzler, CAT, Blasser) (OXOID LTD).

La incubación se realizó en jarras de anaerobiosis con sobres *CampyGen™ 2.5L* (Thermo SCIENTIFIC), con las siguientes condiciones: Temperatura comprendida entre 42-43 °C, durante 48 horas.

2.2.2. Aislamiento y Purificación.

Del crecimiento bacteriano obtenido en el cultivo primario se seleccionó aquellas colonias con crecimiento y apariencia típica de *Campylobacter* (colonias planas, brillantes, bordes redondos y/o irregulares de color gris), se realizó tinción, con la finalidad de confirmar la presencia de *Campylobacter*, mediante microscopia observándose bacilos Gram negativos curvos de forma espiralada o en alas de gaviota teñidos de violeta (tinción Hucker).

Con la finalidad de obtener cultivos bacterianos puros se realizó resiembra mediante estriado por agotamiento en medios selectivos y en las condiciones antes señaladas.



Figura 3. Crecimiento de colonias, apariencia típica de *Campylobacter*.

Fuente: La autora.

2.2.3. Análisis cualitativo.

Se realizaron con la finalidad de identificar la especie de *Campylobacter* aislada, para ello se consideraron las características metabólicas de *Campylobacter*.

2.2.3.1. Tinción Hucker.

La tinción con cristal violeta de Hucker, presenta una sensibilidad de 80% y valor predictor positivo de 56%. Se realizó el extendido del cultivo puro en portaobjetos, la fijación se realizó por calor, mientras que para el proceso de tinción se usó partes iguales de cristal violeta y bicarbonato de sodio al 1% durante 1-2 minutos. Las láminas fueron leídas con un aumento de 100X y se consideró positiva la presencia de formas espirilares semejantes a gaviotas.

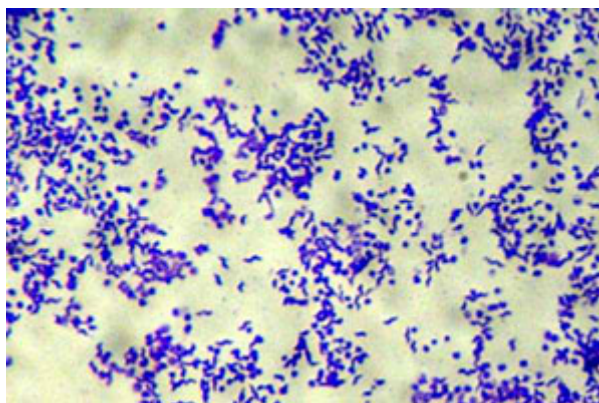


Figura 4. Bacilos curvos sugerentes de *Campylobacter*.

Fuente: (Chanqueo, *et al.* 2005)

2.2.3.2. Prueba de la hidrólisis de hipurato.

Esta prueba demuestra la capacidad que presenta *C. jejuni* para hidrolizar el hipurato de sodio a ácido benzoico y glicina por la acción de la enzima hipuricasa: Se suspendió una asada de la cepa en 400µl de hipurato de sodio al 1%, se incubó a 37°C durante 2 horas, luego se agregó 200µl de solución de ninhidrina al 3,5% se dejó en reposo a 37°C durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo la aparición de una coloración azul-púrpura indica una reacción positiva que revela la presencia de glicina, siendo ésta, el producto final de la hidrólisis del hipurato.



Figura 5. Hidrólisis de hipurato por colonias de *Campylobacter*.

Fuente: La autora.

Adicionalmente se realizó la prueba de susceptibilidad bacteriana así como un estudio molecular con la finalidad de complementar los resultados obtenidos.

2.2.3.3. Prueba de susceptibilidad bacteriana.

La susceptibilidad bacteriana de *Campylobacter* se determinó mediante el método de difusión en agar Muller Hinton con 5% de sangre según lo establecido en la técnica del CA-SFM (Comité de Antibiograma de la Sociedad Francesa de Infectología)/ EUCAST (Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana) con una turbidez equivalente a 0,5 de la escala de McFarland a una temperatura de 37 ± 1 °C durante 24 horas siguiendo las recomendaciones del Centro Nacional de Referencia de *Campylobacter* (CNRC, 2012).

Los antibióticos analizados fueron: amoxicilina-ácido clavulánico (AMC-20/10 µg), ampicilina (AMP-10 µg), tetraciclina (TE-30 µg), ciprofloxacino (CIP-5 µg), eritromicina (ER-15 µg), gentamicina (GM-10 µg)

2.2.4. PCR-MULTIPLEX.

La extracción de ADN, se realizó usando el kit de extracción EZNA*Tissue ADN Protocolo Kit – Células Cultivadas (OMEGA bio-tek.).

Se realizó PCR-MULTIPLEX, al ADN extraído de los cultivos de *Campylobacter*, utilizando los primers que se muestran en la Tabla 1.

La amplificación se efectuó en un termociclador VERITI 96 Well-THERMAL CYCLER PCR. Los productos de amplificación se corrieron en gel de agarosa usando un marcador de peso molecular de 100 bp (TrackIt™ 100bp DNA Ladder INVITROGEN). El análisis de las bandas se realizó de acuerdo al peso molecular correspondiente a cada especie de *Campylobacter*.

ESPECIE	TAMAÑO (bp)	Gen Diana	Primer	SECUENCIA (5'a 3')
Género <i>Campylobacter</i>	816	16S rRNA	C412F	5'-GGATGACACTTTTCGGAGC-3'
			C1228R*	5'-CATTGTAGCACGTGTGTC-3'
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>Hyointestinalis</i>	611	23S rRNA	HYO1F	5'-ATAATCTAGGTGAGAATCCTAG-3'
			HYOFET235R	5'-GCTTCGCATAGCTAACAT-3'
<i>C. coli</i>	502	<i>askr</i>	CC18F	5'-GGTATGATTCTACAAAGCGAG-3'
			CC519R	5'-ATAAAAGACTATCGTCGCGTG-3'
<i>C. fetus</i>	359	<i>cstA</i>	MG3F	5'-GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT-3'
			CF359R	5'-AGCCAGTAACGCATATTATAGTAG-3'
<i>C. lari</i>	251	<i>glyA</i>	CLF	5'-TAGAGAGATAGCAAAAGAGA-3'
			CLR	5'-TACACATAATAATCCCACCC-3'
<i>C. jejuni</i>	161	<i>cj0414§</i>	C-1	5'-CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT-3'
			C-3	5'-CCATAAGCACTAGCTAGCTGAT-3'
<i>C. upsaliensis</i>	86	<i>lpxa</i>	CU61F	5'-CGATGATGTGCAAATTGAAGC-3'
			CU146R	5'-TTCTAGCCCCTTGCTTGATG-3'

Tabla 1. Secuencias de partidores usados para el ensayo de PCR multiplex.

Fuente: (Yamazaki-Matsune *et al.* 2007).

2.2.5. Conservación.

Una vez obtenidos los cultivos puros en los medios usados, se tomó una asada con la cual se inoculó en criotubos CRIOBANK™ MIXED (COPAN Diagnostics, Inc.), se mantuvo en reposo alrededor de 20 minutos, se eliminó la glicerina y se almacenó a -70°C de temperatura.

2.3. Análisis de resultados

El análisis estadístico de los resultados y la determinación de los porcentajes de resistencia y sensibilidad de los antibiogramas se realizó utilizando estadística descriptiva, tablas y figuras con la frecuencia y porcentajes correspondientes, usando el programa Microsoft Excel 2013 para Windows.

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de muestras analizadas (79), 9% corresponde al género *Campylobacter*, los resultados se muestran a continuación.

Tabla 2. Frecuencia de aislamiento de *Campylobacter*.

RESULTADOS	F	%
Negativo	72	91
Positivo	7	9
TOTAL	79	100

Fuente: La autora.

En América Latina, se han realizado diversos estudios sobre la prevalencia de *Campylobacter*; así, en Perú la prevalencia corresponde al 9,13% (Hurtado, *et al.* 2008), datos que son similares a los obtenidos en nuestra investigación. En otros países como Bolivia la prevalencia es del 10% (Orrietta, 2009), en Argentina 15,2% (Tamborini, *et al.* 2012) y en Paraguay 16% (Orrego *et al.* 2014). De igual manera en Europa los informes reportados por la EFSA (2013), notifican que la prevalencia e *Campylobacter* representa el 10,6% siendo 2,2% más que en 2010 y en África la prevalencia de *Campylobacter* es de 21,6% (Komba, *et al.* 2013).

Cabe mencionar que en países desarrollados y en algunos en vías de desarrollo *Campylobacter* es reconocido como patógeno gastrointestinal, siendo una bacteria de análisis y búsqueda establecida en los laboratorios clínicos, por lo tanto considerando los datos publicados por diferentes estudios y los obtenidos en nuestra investigación además de que en nuestro medio la búsqueda de esta bacteria no está establecida por el Ministerio de Salud Pública, se establece que *Campylobacter* es un agente de gran importancia clínica puesto que la tasa de prevalencia de esta bacteria está comprendida entre 9 y 21%.

Sangaré *et al.* (2013), menciona que la asociación entre el género y la campylobacteriosis puede variar de acuerdo con el comportamiento, el área geográfica y la población y puede ser diferente dentro del mismo país.

Lapierre (2013) indica que un alto consumo de tiempo, recursos y requerir personal calificado, en la búsqueda de *Campylobacter* representa una desventaja, razón por la cual la notificación y derivación desde hospitales de cepas de *Campylobacter*, hacia los laboratorios

de referencia es baja. Así mismo, Camas (2008), menciona que uno de los factores que afectan el aislamiento de *Campylobacter* es no contar con una ficha de vigilancia epidemiológica específica para campylobacteriosis, por lo que muchas muestras pueden ser descartadas y otras no ser tomadas en cuenta durante una investigación.

Según Chai *et al.* (2008), la infección gastrointestinal puede producirse directamente por ingestión de carnes crudas o insuficientemente cocinadas o indirectamente por contaminación cruzada con alimentos preparados listos para consumir a través de las superficies y el material de la cocina como cubiertos, platos, etc. La European Food Safety Authority (EFSA) (2009-2010), señala a las aves como un importante reservorio de *Campylobacter*, siendo la carne procedente de ellas la que presenta niveles elevados de contaminación 80% por este patógeno.

Fernández (2011), menciona que en América del Sur, se presentan frecuentemente portadores sanos cuya causa puede relacionarse a aspectos ligados a bajas condiciones de saneamiento básico, las que pueden promover mayores oportunidades de transmisión de las especies diarrogénicas de *Campylobacter*, especialmente a niños de corta edad, desde sus reservorios y fuentes de contaminación, mientras que en países industrializados, el estado de portador sano es raro y de muy baja presentación. Así mismo en el 2008, recalca que la elevada frecuencia de aislamiento y la presencia de más especies de *Campylobacter* entre los niños podrían estar relacionados con una condición inmunológica alterada, considerando la malnutrición como un predisponente a la infección por un impacto negativo que tiene ésta en la barrera de protección de la membrana mucosa intestinal y por la inducción de cambios en las funciones inmunes de acogida, pues los niños con esta condición muestran mayores fracciones de linfocitos y fracciones bajas de linfocitos de memoria en comparación con los niños infectados bien nutridos.

Morore *et al.* (2005) señalan que *C. jejuni* y *C. coli*, son las especies más frecuentemente aisladas en casos de diarrea aguda en el hombre, siendo los niños los más vulnerables a la infección por estos enteropatógenos. Según Hernández *et al.* (2013), de las infecciones entéricas causadas por *Campylobacter*, *C. jejuni* es el responsable de entre 80% y 85% y en segundo lugar se encuentra *C. coli*, con 10% a 15% de infección. Considerando la frecuencia de aislamiento de *Campylobacter*, en el "Hospital del Día", se presenta a continuación las especies aisladas.

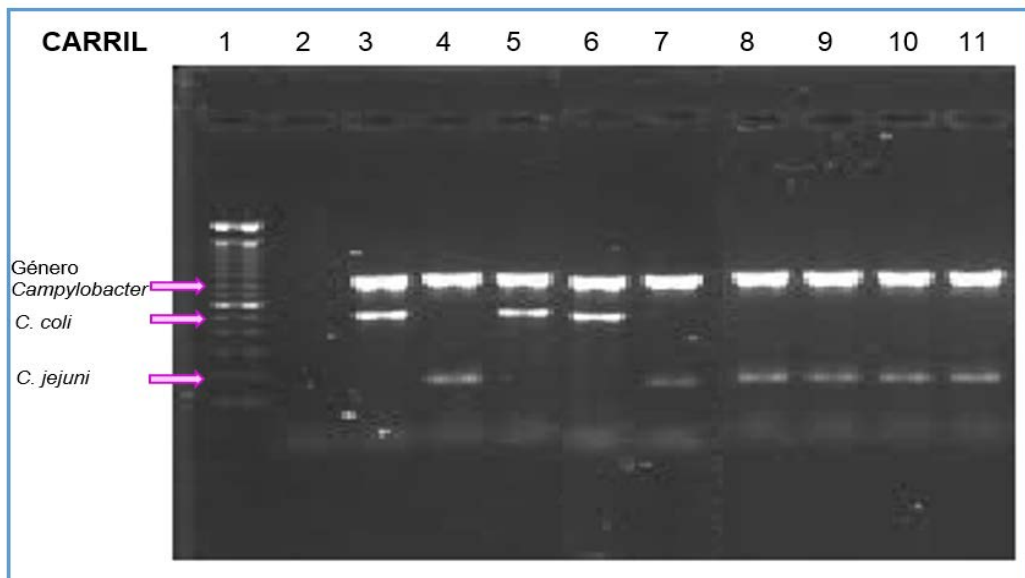
Tabla 3. Frecuencia de los cultivos aislados según la especie de *Campylobacter*.

ESPECIES	F	%
<i>C. jejuni</i>	5	71
<i>C. coli</i>	2	29
TOTAL	7	100

Fuente: La autora.

De los 7 cultivos positivos para *Campylobacter*, se aisló las especies que corresponden a: *C. jejuni* 71% (5) y *C. coli*. 28% (2) (Tabla 3). Mientras que en la figura 6 se observa los resultados obtenidos de PCR-MULTIPLEX amplificados, los cuales corroboran los resultados obtenidos según la especie de *Campylobacter* aislada.

Figura 6. Especies de *Campylobacter* aisladas de muestras de origen humano.



CARRIL. 1 Marcador de peso molecular, 2 control negativo, 3 control positivo *C. coli* control positivo *C. jejuni*, 5-11 muestras. Las flechas del costado izquierdo de la Figura 4, de abajo hacia arriba indican 161 bp (*C. jejuni*), 502 bp (*C. coli*) y 816 bp (género *Campylobacter*).

Fuente: La autora.

Yamazaki-Matsune *et al.* (2007) describe al estudio molecular como un ensayo adicional que compensa el bajo poder diferencial de los ensayos bioquímicos basados en las características metabólicas de *Campylobacter*, para su identificación en cuanto a especie. Además, menciona que los resultados de los ensayos de PCR múltiple complementan los resultados obtenidos según la bioquímica convencional.

El conocimiento de las especies prevalentes, así como la individualización e identificación de las cepas aisladas proveen información epidemiológica y permite relacionar las fuentes de contagio y el modo de transmisión. Los métodos de tipificación convencionales, basados en pruebas bioquímicas, resistencia a varios agentes, tolerancia a diferentes temperaturas y serotipificación, son pruebas fenotípicas que se utilizan para caracterizar las cepas aisladas mientras que las pruebas genotípicas que permiten hacer una mejor caracterización de las cepas (Rivera, *et al.* 2011). Yamazaki-Matsune *et al.* (2007) describe al estudio molecular como un ensayo adicional que compensa el bajo poder diferencial de los ensayos bioquímicos basados en las características metabólicas de *Campylobacter*, para su identificación en cuanto a especie.

Los resultados del aislamiento de *Campylobacter* de acuerdo a la especie, en diferentes países de América Latina representan: En Argentina *C. jejuni* 96% *C. coli* 4% (Tamborini, *et al.* 2012), en Chile, 79,2% *C. jejuni* y 15,2% *C. coli* (Instituto de Salud Pública de Chile, 2014), en Bolivia 63% *C. jejuni* y 30 % *C. coli* (Orrieta, 2009), en Barbados 63.6% *C. jejuni* y 31.8% *C. coli* (Workman, *et al.* 2012).

En la Unión Europea un estudio sobre datos epidemiológicos indica que aproximadamente el 80- 90% de campylobacteriosis es causado por *C. jejuni*, seguido de *C. coli* con un 5-10% (EFSA 2010). Así mismo en Madrid se reportan porcentajes de prevalencia equivalentes al 83,6% en *C. jejuni* y 3,7% en *C. coli* (Red Nacional de Vigilancia Epidemiología, 2008). Siendo estos datos corroborantes a los obtenidos en nuestra investigación, pues la prevalencia obtenida fue mayor en *C. jejuni* (71%), seguido por *C. coli* (29%).

Según Inglis *et al.* (2005), las especies termotolerantes o termófilas asociadas a procesos gastroentéricos son *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* y *C. upsaliensis*. De entre ellos *C. jejuni* y *C. coli* son los más frecuentemente aislados de muestras clínicas en hombre, ubicando a *Campylobacter*, como una de las causas más frecuentes de gastroenteritis bacteriana transmitida por alimentos en muchos países industrializados (EFSA, 2009-2010). Sin embargo, en Sudamérica, aunque *C. jejuni* es aislado con mayor frecuencia, *C. coli* ha presentado un elevado nivel de aislamiento en comparación al aislamiento en países

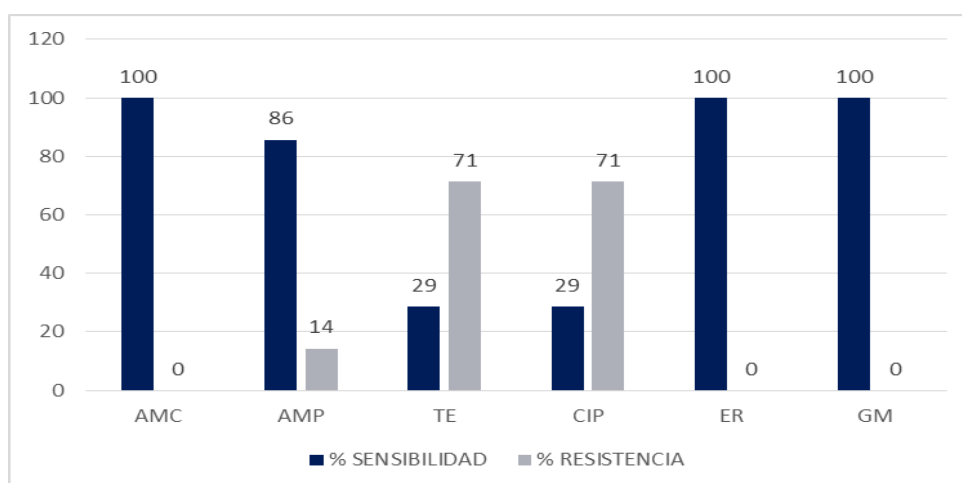
industrializados, representando cerca del 25% de los casos de diarrea producidos por especies del género (Fernández, 2011)

La vigilancia epidemiológica sistemática y la publicación de informes de antibiorresistencia en *C. jejuni* y *C. coli* y otros patógenos entéricos se considera un aspecto de particular importancia en salud pública por su utilidad (Belanger & Shryock, 2007), pues, Regula *et al.* (2005), menciona que uno de los objetivos principales de la monitorización y vigilancia de la resistencia antimicrobiana en los patógenos entéricos es proporcionar a los gestores de riesgos información sobre tendencias, posibles estrategias de intervención y sobre la eficacia de las medidas tomadas, y a los clínicos datos que permitan seleccionar pautas de tratamiento adecuadas. La EFSA (2008) manifiesta que el fenómeno de la antibiorresistencia se ha detectado en muchos grupos de bacterias y para muchos compuestos antibióticos.

Fernández (2011) menciona que el estudio del comportamiento de *Campylobacter* a diferentes antimicrobianos ha sido motivo de interés de investigadores de varios países sudamericanos, quienes han puesto en evidencia la aparición de cepas de origen humano y animal, resistentes a eritromicina, tetraciclina, ampicilina y a quinolonas, encontrándose que la resistencia a estas últimas ha sido explosiva, alcanzando tasas superiores al 60%.

Por lo tanto para analizar el perfil de susceptibilidad del género *Campylobacter* se usaron los antibióticos recomendados por el CA-SFM/EUCAST, CNRC, obteniéndose los siguientes resultados:

Gráfica 1 Perfil de susceptibilidad de las cepas aisladas de *Campylobacter*, frente a 6 antibióticos analizados.



Fuente: La autora.

Se observó elevados niveles de resistencia a tetraciclina y ciprofloxacino equivalentes al 71%, mientras que la resistencia a ampicilina fue del 14%. Así la sensibilidad a amoxicilina-ácido clavulánico, eritromicina y gentamicina representó el 100%.

En Argentina, Tamborini, *et al.* (2012) determinó que la resistencia del género *Campylobacter* representa: ciprofloxacino 65%, tetraciclina 32%, en Bolivia ciprofloxacino 70,5%, tetraciclina 65,9%, eritromicina 61,4%; mientras que el porcentaje de sensibilidad fue del 100% para gentamicina, y amoxicilina/clavulánico (Orrietta, 2009), así también en Australia los porcentajes de resistencia corresponden a; eritromicina 3,3%, tetraciclina 15,5%, ampicilina 96,6% (Alfredson, *et al.* 2003); resultados que son similares a los obtenidos en nuestro estudio, pues la resistencia es mayor en tetraciclina y ciprofloxacino, mientras que para gentamicina y amoxicilina/clavulánico la sensibilidad es del 100%, como en nuestros resultados.

Estos resultados indican que las resistencias obtenidas en la presente investigación son similares a los resultados obtenidos en los estudios mencionados, lo cual permite establecer que *Campylobacter*, presenta mayor resistencia a ciprofloxacina y tetraciclina, seguida por la resistencia a ampicilina y eritromicina.

Rivera *et al.* (2011), considera que la resistencia bacteriana a antimicrobianos se debe principalmente al uso descontrolado de los mismos en seres humanos. Como asociación a esta situación, plantea que el incremento de la resistencia de *Campylobacter*, a quinolonas tetraciclinas y macrólidos en los reservorios animales puede conducir a fallos en el tratamiento de las diarreas producidas por estos microorganismos en el hombre, pues el uso de macrólidos en la producción avícola puede ser causante de mutaciones puntuales cromosómicas que confieren resistencia en *Campylobacter*.

Prieto (2012), menciona que el alto grado de resistencia de *Campylobacter* frente a fluoroquinolonas y macrólidos puede verse facilitado por producirse una sola mutación genética, no requiriendo para ello DNA externo y dependiendo su diseminación únicamente de una transferencia vertical a partir del clon resistente, mientras que para otros antibióticos relevantes, es debida a la adquisición de genes de resistencia mediante elementos genéticos móviles tales como plásmidos de resistencia, transposones (elemento genético transponible) e integrones. También se conocen genes que participan conjuntamente en fenómenos de virulencia y de antibiorresistencia, como las bombas de expulsión. Además señala que para *C. jejuni* existen mutaciones silenciosas sin efecto sobre la resistencia a las quinolonas.

Orrego *et al.* (2014), señala que la resistencia a los antimicrobianos por el género *Campylobacter* aumenta significativamente, especialmente la resistencia a las fluoroquinolonas cuya mutación se observa en el ADN girasa así como a tetraciclina que presenta una resistencia mediada principalmente por plásmidos. También menciona que la resistencia a ciprofloxacina podría deberse a que *Campylobacter* no posee uno de los sitios blanco de acción topoisomerasa IV debido a una mutación puntual, lo que permite presentar resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas (ciprofloxacina).

En *C. jejuni* la resistencia a fluoroquinolonas se genera por mutaciones puntuales en la región determinante de resistencia a quinolonas del gen *gyrA*. La bomba de eflujo CmeABC también se ha sido identificada como un sistema de resistencia a fluoroquinolonas y la sobre-expresión del gen *mfd* (que codifica para la proteína Mfd que participa en el mecanismo de reparación del ADN en el proceso de la transcripción), podría incrementar la aparición espontánea de mutantes resistentes a fluoroquinolonas. Para la resistencia a eritromicina, se describe en *Campylobacter*, una mutación cromosomal que genera una modificación en el sitio blanco del ribosoma (A2075 → G del gen 23S ARNr). La bomba de eflujo CmeABC actuaría sinérgicamente con las mutaciones de la zona 23S ARNr aumentando drásticamente las CIMs para eritromicina y tilosina en *C. coli* (González, *et al.* 2013).

Al ser la campylobacteriosis un proceso autolimitado que necesita de terapia de reposición de líquidos y electrolitos, así como también de un tratamiento antibiótico en pacientes debilitados o inmunocomprometidos, el aumento de las resistencias antibióticas en *Campylobacter* es motivo de alarma ya que este fenómeno ha aparecido de manera conjunta al empleo de antibióticos en producción animal. Frente a la campylobacteriosis, macrólidos como la eritromicina, las fluoroquinolonas y la tetraciclina son los antibióticos de elección mientras que el cloranfenicol y la doxiciclina serían antibióticos de empleo alternativo. La emergencia de resistencia antibiótica es uno de los retos más acuciantes que se plantean en Salud Pública, pues al no contar con una red de monitorización y vigilancia de la resistencia antimicrobiana en los patógenos entéricos se estaría limitando la obtención de estrategias de intervención, control epidemiológico así como el uso adecuado de un tratamiento. *Campylobacter* constituye uno de los géneros bacterianos más frecuentemente asociado con la generación de antibiorresistencias (Prieto, 2012).

El predominio global de *Campylobacter* comprende rasgos epidemiológicos, ya visibles en edades tan tempranas de la vida, que probablemente denotan factores patogénicos, inmunológicos y mecanismos de transmisión particulares (Bellido, *et al.* 2003). Así mismo

Reed *et al.* (1996) menciona que las series exclusivamente pediátricas son curiosamente más frecuentes en población de países en desarrollo donde la inmunodeficiencia y el compromiso de la mucosa intestinal secundaria a la malnutrición se postula como un factor de riesgo para la bacteriemia por *Campylobacter*.

CONCLUSIONES

- ✓ El porcentaje de aislamiento de *Campylobacter* correspondió al 9% del total de muestras analizadas.
- ✓ Las especies de *Campylobacter* identificadas correspondieron a: *C. coli* 29% y *C. jejuni* 71%.
- ✓ El 71% de las especies de *Campylobacter* aisladas mostraron resistencia a tetraciclina y ciprofloxacino, mientras que para ampicilina la resistencia fue del 14%.
- ✓ *C. jejuni* y *C. coli* mostraron sensibilidad del 100% para amoxicilina/ácido clavulánico, eritromicina y gentamicina.

RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar investigaciones acerca de la prevalencia de *Campylobacter* como agente causal de diarrea (gastroenteritis) en humanos (niños, adultos mayores y pacientes inmunodeprimidos), con la finalidad de obtener datos actuales que describan la magnitud de la prevalencia de *Campylobacter* en nuestro medio.
- ✓ Incorporar el aislamiento rutinario de *Campylobacter* en el análisis clínico, como uno de los agentes causantes de Enfermedad Diarreica Aguda en humanos, así como el seguimiento de la resistencia a los antimicrobianos de elección para establecer el control del uso indiscriminado de antimicrobianos.
- ✓ En futuros estudios se debería incluir a todos los centros hospitalarios de la provincia de Loja, en diferentes periodos de investigación con la finalidad de obtener estudios prospectivos que permitan evaluar la prevalencia de *Campylobacter*.
- ✓ Realizar investigaciones en el resto del país, para obtener datos actuales, vigentes y veraces de la zoonosis por *Campylobacter* en el Ecuador

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al, A. A., Senok, A. C., Ismaeel, A. Y., Al-Mahmeed, A. E., & Botta, G. A. (2007). *Multiplex PCR for direct identification of Campylobacter spp. in human and chicken stools*. Journal Medic of Microbiology. Volumen 56, pp. 1350-1355.
- Andrade, D., Castillo, N., & Chávez, V. (2013). Tesis de Grado. *Conocimientos y prácticas maternas para prevenir la deshidratación en los niños con EDA del Centro de Salud N°1 Pumapungo*. Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Médicas
- Belanger, A., and Shryock, T. (2007). *Macrolide-resistant Campylobacter: the meat of the matter*. J. Antimicrob. Chemother. 60, 715-723.
- Bellido, J., Galiano, J., Tirado, M., González-Cano, J., & Safont, L. (2003). *Incidencia de casos esporádicos de las infecciones intestinales más frecuentes en Castellón*. Rev Esp Salud Pública. Volumen 77, pp. 629-638.
- Brunton, L., Lazo, J., & Parker, K. (2007). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. (11^{va} Ed). España: MxGraw-Hill Interamericana.
- Butzler, J. (2004). *Campylobacter from obscurity to celebrity*. Clinical Microbiology and Infection Journal (CMI). Volumen 10, pp. 868-76.
- Camas, M. (2006). Tesis de grado. *Aislamiento e identificación de Campylobacter spp. en muestras de heces referidas al laboratorio nacional de salud, provenientes del área de salud del departamento de Guatemala*. Universidad de San Carlos De Guatemala. Facultad De Ciencias Químicas y Farmacia.
- Cardinale, E., Rose, V., Perrier, J., Tall, F., Rivoal, K., & Mead, G. (2006). *Genetic characterization and antibiotic resistance of Campylobacter spp. isolated from poultry and humans in Senegal*. J Appl Microbiol. Volumen 100, pp. 209-17.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). (2013). *Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through foodfoodborne diseases active surveillance network, 10 US, sites, 1996-2012*. MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report. Volumen 19, pp 283-287.

Cervantes, E., & Cravioto, A. (2007). *Campylobacter y enfermedades asociadas*. Revista Facultad de Medicina (UNAM). Volumen 50, pp. 31-35.

Chai, L. C., Robin, T., Ragavan, U. M., Gunsalam, J. W., Bakar, F. A., Ghazali, F. M., Radu, S. & Kumar, M. P. (2007). *Thermophilic Campylobacter spp. in salad vegetables in Malaysia*. Int. J. Food Microbiol. Volumen 117, pp. 106-111.

Chanqueo, L., García, P., León, E., & Blu, A. (2005). *Evaluación de la tinción de Hucker para la búsqueda rutinaria de Campylobacter sp en el estudio de un síndrome diarreico agudo*. Rev Chil Infect. Volumen 22, pp. 242-246.

Cody, A., Clarke, L., Bowler, I., & Dingle, K. (2010) *Ciprofloxacin-resistant campylobacteriosis in the UK*. Lancet. Volumen 376, pp. 987.

Comité de antibiograma de la Sociedad Francesa de infectología (CA-SFM) / European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2014). *Recomendaciones 2014*. Francia. Volumen 1, pp. 3-6,100.

Cróinin, T., & Backert, S. (2012). *Host epithelial cell invasion by Campylobacter jejuni: trigger or zipper mechanism*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology Journal. Volumen 2, pp. 1-13.

Dasti, J., Tareen, AM., Lugert, R., Zautner, AE., & Gross, U. (2010). *Campylobacter jejuni: a brief over view on pathogenicity- associated factors and disease- mediating mechanisms*. International Journal Medic of Microbiology. Volumen 300, pp. 205-211.

Dingle, K., Clarke, L., Bowler, I. (2005). *Ciprofloxacin resistance among human Campylobacter isolates 1991-2004: an update*. J Antimicrob Chemother. Volumen 56, pp. 435-7.

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2008). *Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard*. The EFSA Journal. Volumen 765, pp. 1-87.

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2009). *Joint Opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections*. The EFSA Journal 7, 1372.

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2010). *Scientific Opinion on Quantification of the risk posed by broiler meat to human campylobacteriosis in the EU*. The EFSA Journal. Volumen 8, pp. 1437.

EFSA. (2009). *The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007*. The EFSA Journal. Volumen 223, pp.1-312.

Engberg, J., Neimann, J., Nielsen, E., Aerestrup, F., & Fussing, V. (2004) *Quinolone-resistant Campylobacter infections: risk factors and clinical consequences*. Emerg Infect Dis Volumen 10, pp. 1056-63.

Farace, M., & Viñas, M. (2007). *Manual de procedimientos para el aislamiento y caracterización de Campylobacter spp.*, pp. 34 [en línea]. Disponible en: <<http://fos.panalimentos.org/LinkClick.aspx?fileticket=Q0RBGlqsQOk%3D&tabid=120&mid=460&language=es-ES>>.

Fernández, H. (2008). *Género Campylobacter: un Grupo de Bacterias Zoonóticas de Importancia en Salud Pública*. Cacchione Ra, Durlach R, Martino P. Temas de Zoonosis. (5^{ta}. Ed.) Asociación Argentina de Zoonosis. Buenos Aires. pp. 205-214.

Fernández, H. (2011). *Campylobacter y campylobacteriosis: una mirada desde américa del sur*. Rev Peru Med Exp Salud Pública. Volumen 28, pp. 121-27.

Fernández, H., Vera, F., & Villanueva, MP. (2007). *Especies de Arcobacter y Campylobacter en aves y mamíferos del sur de Chile*. Archivo Médico Veterinario. Volumen 39, pp. 163-165.

Fernández, H., Vera, F., Villanueva, M., & García, A. (2008). *Occurrence Of Campylobacter Species In Healthy Well-Nourished And Malnourished Children*. Brazilian Journal of Microbiology. Volumen 39, pp. 1-3.

Friedman, C., Neimann, J., Wegener, H., & Tauxe, R. (2000). *Epidemiology of campylobacter jejuni infections in the United States and other industrialized nations*. In: *Campylobacter*, (2^{da} Ed). Nachamkin I. & Blaser M.J, Washington, DC, USA. ASM Press pp. 121–138.

Ge, Z., Schauer, D., & Fox, J. (2008). *In vivo virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin*. Cellular Microbiology Journal. Volumen 10, pp. 1599-1607.

González, G., Cordero, N., García, P., & Figueroa, G. (2013). *Análisis molecular de la resistencia a fluoroquinolonas y macrólidos en aislados de Campylobacter jejuni de humanos, bovinos y carne de ave*. Rev Chilena Infectol. Volumen 30, pp. 135-139

Guerry, P. (2007). *Campylobacter flagella: not just for motility*. Trends in Microbiology Journal. Volumen 15, pp. 45-61.

Hariharan, H., Sharma, S., Chikweto, A., Matthew, V., & DeAllie, C. (2008) *Antimicrobial drugresistance as determined by the E-test in Campylobacter jejuni, C. coli, and C. lari isolates from the ceca of broiler and layer chickens in Grenada*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. Volumen 32, pp. 21-8.

Hernández, C., Aguilera, A., & Castro, G. (2013). *Campylobacter jejuni: ¿una bacteria olvidada? Situación en México*. Enf Inf Microbiol. Volumen 33, pp. 77-84.

Hughes, L., Bennett, M., Coffey, P., Elliott, P., Jones, T., Jones, R., Lahuerta-Marin, A., Leatherbarrow, A., Mc Niffe, K., Norman, D., Williams, N., & Chantrey, J. (2009). *Molecular Epidemiology and Characterization of Campylobacter spp. Isolated from Wild Bird Populations in Northern England*. Applied and Environmental Microbiology Journal. Volumen 75, pp. 3007–3015.

Hurtado, L., & Rojas, R. (2008). Tesis de grado. *Incidencia de Campylobacter spp., en pacientes ambulatorios menores de cinco años con diarrea aguda en dos hospitales de Lima: octubre 2005-enero 2006*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica

Inglis, G. D., Kalischuk, L. D., Busz, H. W. and Kastelic, J. P. (2005). *Colonization of cattle intestines by Campylobacter jejuni and Campylobacter lanienae*. Applied and Environmental Microbiology Journal. Volumen 71, 5145-5153.

Instituto de salud Pública de Chile. (2014). *Vigilancia de laboratorio de spp. Chile, 2005 – 2013*. Boletín. Volumen 4, pp. 1-17.

Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. (2001) *Manual de Procedimientos Campylobacter*. Subsecretaría de Investigación y Tecnología. ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. Departamento Bacteriología.

- Janssen, K., Cawthraw, S., Van Pelt, W., Wagenaar, J., & Owen, R. (2008). *Host-pathogen interactions in Campylobacter infections: the host perspective*. *Clinic Microbiology Journal*. Volumen 21, pp. 505-18.
- Komba, E., Mdegela, R., Msoffe, P., & Ingmer, H. (2013). *Human and animal Campylobacteriosis in Tanzania: A review*. *Tanzania Journal of Health Research*. Volumen 15, pp. 1-13.
- Konkel, M., Monteville, M., Rivera-Amill, V., & Joens, L. (2001). *The pathogenesis of Campylobacter jejuni-mediated enteritis*. *Journal Current Issues in Intestinal Microbiology*. Volumen 2, pp. 55–71.
- Krause, R. (2002). *Recurrent septicemia due to Campylobacter fetus and Campylobacter lari in an immunocompetent patient*. *Infection*. Volumen 30, pp. 171–174.
- LaGier, M. J., Joseph, L. A., Passaretti, T. V., Musser, K. A., & Cirino, N. M. (2004). *A real time multiplex ed PCR assay for rapid detection and differentiation of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli*. *Journal Molecular and Cellular Probes* 18, pp. 275-282.
- Lapierre, L. (2013). *Factores de Virulencia asociados a especies zoonóticas de Campylobacter spp.* *Avances en Ciencias Veterinarias*. Volumen 28, pp. 25
- Lorenzo, P., Moreno, A., Leza, J., Lizasoain, I., Moro, M., & Portolés, A. (2013). *Manual de farmacología básica y clínica*. Madrid: Medica Panamericana.
- Moore, J., Corcoran, D., Dooley, J., Fanning, S., Lucey, B., Matsuda, M., Mcdowell, D., Megraud, F., Millar, B., O'mahony, R., O'riordan., O'rourke., Rao, J., Rooney, P., Sails, A., & Whyte, P. (2005) *Campylobacter*. *Vet. Res*. Volumen 36, pp. 351-382.
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2015). *Microbiología Médica*. (7^{ma}. Ed.) Brasil. Elsevier.
- Nachamkin, I., Bohachick, K., Patton, M. (1993). *Flagellin gene typing of Campylobacter jejuni by restriction fragment length polymorphism analysis*. *J. Clin. Microbiol.* 31:1531-1536.
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF). (2007). *Analytical utility of Campylobacter methodologies*. *Journal of Food Protection*. Volumen 70, pp. 241-250.

Oberhelman, A., Gilman, R., Sheen, P., Cordova, J., Taylor, D., & Zimic, M. (2003). *Campylobacter Transmission in a Peruvian Shantytown: A Longitudinal Study Using Strain Typing of Campylobacter Isolates from Chickens and Humans in Household Clusters*. Journal of Infectious Diseases. Volumen 187, pp. 260-9.

On, S., & Jordan, P. (2003). *Evaluation of 11 PCR assays for species-level identification of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli*. J. Clin. Microbiol. Volumen 41, pp. 330–336.

Organización Mundial de la Salud (OMS) (2009). *Evaluación de Riesgos de Campylobacter spp. de pollos para asar*, Roma.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2011). Centro de Prensa. Nota descriptiva nº 255: Campylobacter, Notas descriptivas [en línea]. Disponible en: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/es/index.html>> [Consulta: febrero de 2015].

Orrego, M., Weiler, N., Portillo, R., Lird, G., Acosta, L., Ortiz, F., Mereles, E., Rodríguez, G., Menacho, C., Fernández, P., Melgarejo, N., Zarate, N., Huber, C., & Alvarez, M. (2014). *Síndrome diarreico agudo causado por Campylobacter spp., en pacientes menores de 11 años y su resistencia antimicrobiana a las drogas de elección para tratamiento 2010-2012*, Paraguay. Pediatr. (Asunción), Volumen 41, pp. 127-130.

Orrietta, L. (2009). Tesis de Grado. *Monitoreo de la resistencia Antimicrobiana de Campylobacter spp., en cuatro hospitales de la ciudad de la Paz – Bolivia 2005-2006*. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas.

Prieto, J. (2012). Tesis de grado. *Prevalencia, caracterización quimiotaaxonómica mediante espectroscopía de Infrarrojos e identificación con redes neuronales artificiales y análisis multivariante de especies termofílicas de campylobacter aisladas de aves y productos avícolas*. Universidad de León. Departamento De Higiene Y Tecnología De Los Alimentos. España.

Public Health Assosiation (PHA). (2008). *Control of Communicable Disease Manual. Campylobacter enteritis*. (19ª Ed). Washington: American. Heymann DL. pp. 94-98.

Red Nacional de Vigilancia Epidemiología. (2008) Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual 2008. Madrid.

- Reed, R., Wegerhoff, F., & Rothberg, A. (1996) *Bacteraemia in malnourished rural african children*. Ann Trop Paediatr. Volumen 16, pp. 8.
- Regula, G., Lo Fo Wong, D. M., Ledergerber, U., Stephan, R., Danuser, J., Bissig-Choisat, B. and Stark, K. D. (2005). Evaluation of an antimicrobial resistance monitoring program for *Campylobacter* in poultry by simulation. Prev. Vet. Med. 70, 29-43.
- Rivera, N., Bustos, R., Montenegro, S., Sandoval, M., Castillo, J., Fernández J., Maturana, M., Delgado, L., Contreras, A., Chávez, D., & Quevedo, I. (2011). *Genotipificación y resistencia antibacteriana de cepas de Campylobacter spp aisladas en niños y en aves de corral*. Rev Chil Infect. Volumen 28, pp. 555-562.
- Romero, R. (2007). *Microbiología y parasitología: Bases etiologicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. (3^a Ed). Argentima. Ed. Médica Panamericana.
- Sangaré, L., Nikiéma, A.K., Zimmermann, S., Sanou, I., Congo-Ouédraogo, M., Diabaté, A., Diandé, S., & Guissou, P.I. (2012). *Campylobacter spp. Epidemiology and antimicrobial susceptibility in a developing country, Burkina Faso (West Africa)*. African journal of clinical and experimental microbiology. Volumen 13, pp. 106-111.
- Si Ming Man. (2011). *The clinical importance of emerging Campylobacter species*. Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology. Volumen 8, pp. 669-685
- Silva, J., Leite, D., Fernnades, M., Mena, C., Gibbs, P., & Teixeira, P. (2011). *Campylobacter spp. as a foodborne pathogen: a review*. Front Microbiol. Volumen 2, pp. 1-12.
- Tamborini, A., Casabona, L., Viñas, M., Asato, V., Hoffer, A., Farace, M., Lucero, M., Corso, A., & Pichel, M. (2012). *Campylobacter spp.: prevalencia y caracterización feno-genotípica de aislamientos de pacientes con diarrea y de sus mascotas en la provincia de La Pampa, Argentina*. Revista Argentina de Microbiología. Volumen 44, pp. 266-271.
- Tremblay, C., Gaudreau, C. & Lorange, M. (2003). *Epidemiology and antimicrobial susceptibilities of 111 Campylobacter fetus subsp. fetus strains isolated in Quebec, Canada, from 1983 to 2000*. J. Clin. Microbiol. Volumen 41, pp. 463–466.
- Vandamme, P. (2000). *Taxonomy of the Family Campylobacteraceae*. En: Nachamkin, I., & Blaser, MJ. *Campylobacter* (2^{da} Ed). Washington, DC, USA. ASM Press pp. 3-26.

Vasco, G., Trueba, G., Atherton, R., Calvopiña, M., Cevallos, W., Andrade, T., Eguiguren, M., & Eisenberg, J. (2013). *Identifying Etiological Agents Causing Diarrhea in Low Income Ecuadorian Communities*. Am. J. Trop. Med. Hyg. Volumen 91, pp. 563–569.

Workman, S., Sorbers, S., Mathison, G., & Lavoie, M. (2006). *Human Campylobacter associated enteritis on the Caribbean Island of Barbados*. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Volumen 74, pp. 623-627.

World Health Organization (WHO). (2007). *Manual de Procedimientos Para el Aislamiento y Caracterización de Campylobacter spp.* Descargado el 5 de enero de 2015 de, http://bvs.panalimentos.org/local/file/Manual_Campylobacter_31-08-2007.pdf

World Health Organization (WHO). (2013). *Fact sheet on Diarrheal disease*. No. 330. Consultado el 17 de enero de 2015 en, <http://www.who.int>.

World Organization For Animal Health (OIE). (2008). *Manual de la OIE sobre animales terrestres. Campylobacter jejuni y campylobacter coli*. Capítulo 2.9.3

Yamazaki-Matsune, W., Taguchi, M., Seto, K., Kawahara, R., Kawatsu, K., Kumeda, K., Kitazato, M., Nukina, M., Misawa, N., 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*. J Med. Microbiol. Volumen 56, pp. 1467–1473.

Yassin, G. (2011). *Lo esencial en farmacología*. España: Elsevier.

Young KT, Davis LM, DiRita VJ. (2007) “*Campylobacter jejuni: molecular biology and pathogenesis*”. Nature Rev. Microbiol. Volumen 5, pp. 665-679.

ANEXOS

EXTRACCIÓN DE ADN DE CELULAS BACTERIANAS *CAMPYLOBACTER*

Paso 1. PREPARACION DE LA MUESTRA

- Colocar 200 μ L de PBS en un tubo de 1,5 ml libres de nucleasas.
- Colocar en el tubo que contiene PBS de tres a cuatro asadas del cultivo y dar vortex.
- Centrifugar por 30 segundos a velocidad máxima (13000 rpm).
- Eliminar el sobrenadante y colocar 200 μ L de PBS y dar vortex.
- Centrifugar por 30 segundos a velocidad máxima (13000 rpm).
- Eliminar el sobrenadante y colocar 200 μ L de PBS y seguir al paso 2

Paso 2. Añadir 25 μ L de OB proteasa Solution dar vortex para mezclar bien.

Paso 3. Añadir 220 μ L de BL Buffer

Paso 4. Incubar a 70°C durante 10 minutos, dar vortex durante la incubación, (a los 5 min una vez).

Paso 5. Añadir 220 μ L de etanol al 100% dar vórtex para mezclar bien

Paso 6. Insertar una mini columna en un tubo de recogida de 2 ml.

Paso 7. Transferir toda la muestra a partir del paso 5 a la columna HiBind DNAMini incluyendo cualquier precipitado que pueda haberse formado (proceso se lo hace con la pipeta).

Paso 8. Centrifugar a velocidad máxima durante 1 minuto.

Paso 9. Desechar el filtrado y reutilizar el tubo de recogida.

Paso 10. Añadir 500 μ L de HBC Buffer.

Paso 11. Centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos

Paso 12. Descartar el tubo de recolección y colocar la columna en un nuevo tubo de 2 ml.

Paso 13. Añadir 700 μ L de ADN wash buffer

Paso 14. Centrifugar a máxima velocidad durante 30 s.

Paso 15. Descartar el filtrado y reutilizar el tubo de recogida

Paso 16. Repetir los pasos 13 y 15 para una segunda etapa de lavado de ADN tampón de lavado.

Paso 17. Centrifugar la columna a la velocidad máxima durante 2 minutos para secar.

Paso 18. Transferir la columna en un tubo de 1,5 ml libre de nucleasa.

Paso 29. Añadir 100-200 μ L del tampón de elución caliente a 70°C

Paso 21. Dejar reposar a temperatura ambiente 2 min.

Paso 22. Centrifugar a la velocidad máxima durante 1 minuto.

Paso 23. Repita los pasos 20 a 22 para la segunda etapa de elución.

PROTOCOLO: M-PCR ESPECIE-ESPECÍFICO PARA *CAMPYLOBACTER*

Colocar bajo campana UV todos los materiales utilizados para realizar la PCR:

- Micropipetas
- Tubos eppendorf
- Guantes

- Puntas para micropipetas
- Tubos para PCR
- Caja con hielo

- Gradilla para tubos
- Lápiz marcador

Mix PCR

Componentes	Volumen (µl)	Concentración inicial	Concentración final
Buffer 10X	5	5X	1X
dNTPs 10 Mm	1	10Mm	0.2 mM
MgCl₂ 50 Mm	1.5	25mM	1.5 mM
Primers 50 µM			
C412F	1	100 µM	1 µM
C1228R*	1	100 µM	1 µM
HYO1F	1	100 µM	1 µM
HYOFET235R	1	100 µM	1 µM
CC18F	1	100 µM	1 µM
CC519R	1	100 µM	1 µM
MG3F	1	100 µM	1 µM
CF359R	1	100 µM	1 µM
CLF	1	100 µM	1 µM
CLR	1	100 µM	1 µM
C-1	1	100 µM	1 µM
C-3	1	100 µM	1 µM
CU61F	1	100 µM	1 µM
CU146R	1	100 µM	1 µM
Taq pol 5U/µl	0.3		1.5 U/µl
H₂O	25.2		
Templado	5 (estándar)		

Volumen final: 50 μ l

Los primers pueden venir en stock de 100 μ M y ser utilizados en concentraciones 50 μ M o 25 μ M.

Condiciones para PCR

ETAPAS	TEMPERATURA (OC)	TIEMPO (MIN)	
Desnaturalización inicial	95	4	
Desnaturalización	95	0.5	25 ciclos
Hibridación	58	1	
Extensión	72	1	
Extensión final	72	7	

PROTOCOLO: GEL DE AGAROSA 1.5%

Preparación del gel

- Pesar 0.525 de agarosa
- Disolver con buffer TBE 1X (35 mL)
- Agregar 3 μ l de SYBR Safe DNA (INVITROGEN)
- Colocar la solución en la bandeja de electroforesis hasta la señal
- Colocar las peinetas para la formación de los pocillos en la parte superior
- Una vez polimerizado se deben retirar las peinetas cuidadosamente

Al cargar las muestras

- Colocar la bandeja con el gel en la cubeta de electroforesis
- Llenar la cubeta con buffer TBE 1X hasta cubrir completamente el gel
- Con micropipeta se colocará en los pocillos: 1 μ l el marcador de peso molecular de 100 bp (TrackIt™ 100bp DNA Ladder INVITROGEN), 2 μ l de : control negativo y control positivo, seguido de las muestras a analizar
- Tapar la cubeta, verificando que las muestras se encuentren del lado del cátodo (polo negativo)

Condiciones de corrida

- 128 Volt
- 300 mA
- 45 minutos

Revelado

- El gel se reveló mediante luz UV 300 nm. Los resultados se almacenaron para su análisis.