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 Manuel Ygnacio Monteros, durante el período Septiembre - Diciembre 2014.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Narváez Jumbo, Iliana María.

DIRECTOR: Toledo Barrigas, Zorayda Patricia, Bq.

LOJA - ECUADOR

2015

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.

Bioquímica Farmacéutica.

Zorayda Patricia Toledo Barrigas.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración**:**

El presente trabajo de titulación denominado: **"Prevalencia de las especies termotolerantes de *Campylobacter (C. jejuni subsp. jejuni, C. coli, C. lari y C. upsaliensis)* en niños con y sin diarrea del Hospital Manuel Ygnacio Monteros, durante el período Septiembre - Diciembre 2014"** realizado por Narváez Jumbo Iliana María, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, 11 de septiembre de 2015.

……..

Bq. Zorayda Toledo.

Director

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo Narváez Jumbo Iliana María declaro ser autora del presente trabajo: **"Prevalencia de las especies termotolerantes de *Campylobacter (C. jejuni subsp. jejuni, C. coli, C. lari y C. upsaliensis)* en niños con y sin diarrea del Hospital Manuel Ygnacio Monteros, durante el período Septiembre - Diciembre 2014"** de la Titulación de Bioquímico Farmacéutico, siendo la Bq. Zorayda Toledo directora del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

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

……

Narváez Jumbo Iliana María.

C.I. 1104517162

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen del Cisne por sus bendiciones y permitirme cumplir esta meta.

A mi madre Amada que ha sido mi ángel y apoyo incondicional, a mi padre que siempre ha velado por mí y a mi hermana por ser un motor en mi vida; porque la confianza y el orgullo que sienten por mí ha sido mi motivación.

A ti amor, por tu paciencia por animarme a luchar por mis sueños y por tu apoyo incondicional

A todos quienes me han apoyado y han estado a mi lado en el transcurso de mi vida académica compañeros, amigos y docentes que me han dado una mano para seguir adelante.

Iliana.

AGRADECIMIENTO

A mi tutora Bq. Zorayda Toledo por brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto, por su gran apoyo y por la confianza que siempre me ha brindado.

Al Dr. Heriberto Fernández por compartir sus conocimientos y ser un pilar fundamental en el desarrollo de esta investigación.

A la Mgtr. Janneth Simaluiza por su valiosa asesoría en el desarrollo de este proyecto.

A la Bq. Sofía por su colaboración en el desarrollo del presente estudio.

A mis compañeros de investigación Pato, Vane, Andrea y a todos quienes colaboraron en el trascurso de este proyecto.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA i

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN. ii

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS iii

DEDICATORIA iv

AGRADECIMIENTO v

ÍNDICE DE CONTENIDOS vi

ABREVIATURAS ix

RESUMEN 1

ABSTRACT 2

INTRODUCCIÓN 3

1. CAPITULO I 5

MARCO TEÓRICO 5

1.1. *Campylobacter* spp. 6

1.1.1 Taxonomía. 6

1.2. Especies termófilas. 7

1.3. Epidemiología. 8

1.4. Fuentes de transmisión. 9

1.5. Patogenia. 10

1.5.1. Síndrome de Guillain Barré (SGB) 12

1.5.2. Síndrome de Miller Fisher (SMF) 13

1.5.3. Síndrome de Intestino Irritable (SII) 13

1.6. Actividad antimicrobiana. 14

1.7. Diagnóstico clínico. 16

1.7.1. Examen presuntivo. 16

1.7.2. Aislamiento e identificación. 16

1.7.3. Reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR - Multiplex). 18

2. CAPITULO II 19

METODOLOGÍA. 19

2.1. Recolección de las muestras 20
2.2. Aislamiento e identificación de especies termotolerantes de *Campylobacter.* 20
2.3. Pruebas complementarias para Identificación de *Campylobacter* spp. 21
2.4. Pruebas de sensibilidad. 22
2.5. PCR - Multiplex 22
3. CAPITULO III. 24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN. 24
CONCLUSIONES 31
RECOMENDACIONES 32
BIBLIOGRAFÍA 33
ANEXOS 37
PROTOCOLOS 38
Anexo 1: Tinción de Hucker 38
Anexo 2: Preparación de medio de cultivo Butzler. 39
Anexo 3: Aislamiento de *Campylobacter* spp. 40
Anexo 4: Filtración para eliminar flora acompañante 41
Anexo 5: Crioconservación de cepas aisladas 42
Anexo 6: Pruebas complementarias para identificación de *Campylobacter.* 43
Anexo 7: Determinación de actividad antimicrobiana. 44
Anexo 8: Extracción de ADN de células bacterianas. 45
Anexo 9: PCR - Multiplex para identificación de *Campylobacter.* 46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones para el crecimiento de especies termotolerantes de *Campylobacter.*. 17

Tabla 2. Características diferenciales de las especies de *Campylobacter* 17

Tabla 3. Puntos de corte para susceptibilidad de *Campylobacter* spp. 22

Tabla 4. Secuencias de primers usados para PCR- Multiplex. 23

Tabla 5. Determinación de *Campylobacter* spp..... 25

Tabla 6. Determinación de especies termotolerantes de *Campylobacter*. 27

Tabla 7. Matriz para PCR - Multiplex 46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características morfológicas de *Campylobacter* spp. 6

Figura 2. Incubación bajo condiciones de microaerofilia. 20

Figura 3. Cultivo de *Campylobacter* spp**.**..... 21

Figura 4. Prueba de hidrólisis del hipurato. 21

Figura 5. Especies termotolerantes de *Campylobacter*. 27

Figura 6. Susceptibilidad antimicrobiana de *Campylobacter.* 29

Figura 7. Campylobacter spp aislado de muestras fecales..... 38

Figura 8. Medio selectivo Butzler. 39

Figura 9. Aislamiento de especies termotolerantes de *Campylobacter.*..... 40

Figura 10. Filtración para aislamiento de *Campylobacter* spp. 41

Figura 11. Crioconservación de *Campylobacter*. 42

Figura 12. Muestras positivas para prueba de hidrólisis de hipurato 43

Figura 13. Prueba de susceptibilidad para *Campylobacter*..... 44

Figura 14. Electroforesis en gel de Agarosa..... 47

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OPS: Organización Panamericana de la Salud.

PFE: Proyecto Franco-Ecuatoriano para el control de las enfermedades diarreicas y cólera.

UFC: Unidad Formadora de Colonias.

CadF: Proteína de unión a la Fibronectina.

CDT: *Cytolethal Distending Toxin.*

MFS: Síndrome de Miller Fisher.

GBS: Síndrome de Guillain Barré.

SII: Síndrome de Intestino Irritable.

FQ: Fluroquinolonas.

QRDR: *Quinolone Resistance Determining Region.*

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima.

EMA: Enzimas Modificantes de Aminoglucósidos.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

CA-SFM: Comité de Antibiogramas de la Sociedad Francesa de Infectología.

EUCAST: Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad.

RESUMEN

Campylobacter es una bacteria zoonótica de transmisión alimentaria causante de gastroenteritis, responsable del 5 al 14% de casos de diarrea a nivel mundial afectando principalmente a niños y personas inmunodeprimidas. Considerando su importancia dentro del diagnóstico clínico en el presente estudio se determinó la prevalencia de especies termotolerantes de *Campylobacter (C. jujuni, C. coli, C. lari* y *C. upsaliensis)* en niños con y sin diarrea del Hospital Manuel Ygnacio Monteros durante el período septiembre a diciembre del 2014. Se recolectó 176 muestras de materia fecal de las cuales el 6,8%(12) fueron positivas para *Campylobacter*. Entre las especies aisladas *C. jejuni* representó el 91,7%(11), *C. coli* 8,3%(1), mientras *C. lari* y *C. upsaliensis* no registraron datos. Al evaluar la actividad antimicrobiana de 6 drogas frente a *Campylobacter* se encontró una resistencia 91,7% para ciprofloxacina y tetraciclina.

Por lo tanto la determinación de prevalencia de las especies termotolerantes de *Campylobacter* en nuestra localidad brinda valiosa información epidemiológica de consideración clínica y sienta precedentes para futuras investigaciones.

PALABRAS CLAVE: *Campylobarter, C. jejuni, C. coli,* campilobacteriosis.

ABSTRACT

Campylobacter is zoonotic bacteria are a major cause of foodborne diarrhoeal illness in humans of 5 to 14% of cases and are the most common bacteria that cause gastroenteritis worldwide affecting mainly children and immunosuppressed individuals. Given its importance in the clinical diagnosis in Manuel Ygnacio Monteros Hospital during the period september to december 2014 was determined the prevalence of thermotolerant Campylobacter species (*C. jejuni, C. coli, C. lari and C. upsaliensis*) in children with and without diarrhea. Were collected 176 stool samples of which 6.8% were positive for *Campylobacter*. Among the isolated species *C. jejuni* represented 91.7%(11); *C. coli* 8,3%(1) whereas C. *lari* and *C. upsaliensis* no recorded data. In evaluating the antimicrobial activity of six drugs to 91.7% Campylobacter resistance to tetracycline and ciprofloxacin it was found.

Therefore the determination of prevalence of thermotolerant *Campylobacter* species in our town provides valuable epidemiological data of clinical consideration and gives precedents for future research.

KEYWORDS: *Campylobarter, C. jejuni, C. coli, campylobacteriosis.*

INTRODUCCIÓN

La campilobacteriosis es una infección causada por el género *Campylobacter*, las especies termotolerantes: *C. jejuni, C. coli, C lari y C. upsaliensis* son responsables de enfermedades gastrointestinales en humanos. Son bacterias zoonóticas de distribución mundial, gram negativas, microaerófilas en forma curva como alas de gaviota y tienen un crecimiento óptimo a 42°C. La infección causada por *Campylobacter* está asociada con la ingestión de alimentos contaminados. La enfermedad en los seres humanos causa diarrea acuosa, moderada y autolimitada, pero puede producir disentería sangrienta con moco y células blancas, seguida por dolor de cabeza y abdominal, fiebre, náuseas y vómito. La campilobacteriosis es una de las principales causas de enfermedades diarreicas de transmisión alimentaria en el mundo entero. En los países desarrollados como en vías de desarrollo provocan más casos de diarrea que *Salmonella* (WHO, 2011).

El principal reservorio de *Campylobacter* spp. son las aves de corral, en los últimos años a nivel mundial el consumo de carne de pollo y sus subproductos se ha indicado como responsable de un alto número de casos de campilobacteriosis en la población humana especialmente en pacientes con el sistema inmunológico comprometido (Arturo & Silva, 2007). No obstante, todos los casos de campilobacteriosis no pueden ser explicados por el consumo de carne de pollo. Estas bacterias se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, reconociéndose como portadores naturales a una gran variedad de animales de consumo humano como ganado bovino, porcino, ovino entre otros, a más de esto, los animales de compañía como los de vida silvestre representan una fuente importante de infección por *Campylobacter* (Collado, Gutiérrez, González, & Fernández, 2013).

The Global Burden of Diseases señala que el porcentaje que ocupa *Campylobacter* frente al total de enfermedades diarreicas a nivel mundial es de 8,4%, representando el cuarto lugar por debajo de rotavirus, fiebre tifoidea y criptosporidiosis (Murray *et al*., 2013).

En los países industrializados los casos de campilobacteriosis a menudo superan a los de la salmonelosis siendo más frecuente en los meses de verano, viéndose afectados todos los grupos étnicos de ambos sexos. En Estados Unidos en el 2012 la Red de Vigilancia de Enfermedades Transmitidas por Alimentos estimó una recurrencia de 14,3 casos de campilobacteriosis por cada 100.000 habitantes.

The Centers of Disease Control and Prevention estima que la campilobacteriosis afecta a más de 1,3 millones de personas cada año, siendo el grupo de edad más afectado los niños menores de 5 años y los adultos jóvenes; aunque la infección por *Campylobacter* comúnmente

no causa la muerte, se ha estimado que alrededor de 76 personas con infecciones por *Campylobacter* mueren cada año (CDC, 2012).

Por su parte la Organización Panamericana de la Salud (OPS) estima que *C. jejuni* es el agente causal de hasta el 15% de los casos de diarrea en lactantes de todo el mundo, sin embargo debido a que este patógeno se encuentra en muchos pacientes asintomáticos se desconoce el verdadero porcentaje de casos (Bhan *et al*., 2008).

En nuestro país los datos sobre la presencia de *Campylobacter* spp, son escasos. En un estudio realizado en el 2014 en dos comunidades ecuatorianas encontraron una prevalencia de 5,5% y 1,3% en Guamaní y Borbón respectivamente. Lastimosamente en la mayoría de los países en vías de desarrollo la campilobacteriosis no es de notificación obligatoria, con la consecuente subestimación de su importancia clínica. En los laboratorios clínicos no es un patógeno de aislamiento rutinario para el diagnóstico de gastroenteritis de origen bacteriano como *Salmonella* y *Escherichia coli* debido principalmente a la falta de recursos y de personal capacitado.

La infección por *Campylobacter* representa en la actualidad un problema creciente pudiéndose convertir en una enfermedad endémica de los países en vías de desarrollo. Un diagnóstico oportuno permitiría la instauración de un tratamiento adecuado, evitando la evolución de especies antibioresistentes y la reducción del grupo portador asintomático que actualmente es una importante fuente de contagio. Lastimosamente en nuestro país la Dirección Nacional de Vigilancia y Control Sanitario no cuenta con normativas ni políticas para la vigilancia de *Campylobacter* mucho menos ha instaurado este género dentro del sistema de alertas sanitarias.

La falta de datos sobre prevalencia y distribución de las especies de *Campylobacter* dificultan establecer fuentes de contagio y señalarlas como causalidad de morbilidad en niños; por lo anteriormente expuesto y conociendo que en Loja no existe información epidemiológica de las especies termotolerantes de *Campylobacter* el presente estudio pretende establecer la prevalencia de las especies termotolerantes *C. jejuni, C. coli, C. lari* y *C. upsaliensis* en niños con y sin diarrea del hospital Manuel Ygnacio Monteros en el período Septiembre - Diciembre 2014 con la finalidad de obtener información epidemiológica de relevancia clínica y con ello resaltar la importancia de este género para que sea incorporado dentro del diagnóstico rutinario en las entidades de salud. La presencia de *Campylobacter* en muestras clínicas sugiere la existencia de múltiples fuentes de contagio que deberían ser tomadas en cuenta para futuros estudios.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. *Campylobacter* spp.

Campylobacter spp. (kampulos, curvo y bacter, bacteria) es un bacilo gramnegativo, curvo en forma de S o de alas de gaviota de 0,2 - 0,9 µm de ancho y 0,5 - 5 µm de largo, no esporulados, móvil gracias a la presencia de un flagelo polar en uno o ambos extremos **(Figura 1)**; en cultivos viejos se transforman en cuerpos esféricos considerados formas viables no cultivables. Con metabolismo de tipo respiratorio, es la menaquinona su única quinona respiratoria. No crecen en aerobiosis ni en anaerobiosis, siendo microaerófilos estrictos que necesitan de 5-6% de O^2 para multiplicarse (Fernández, 2008).

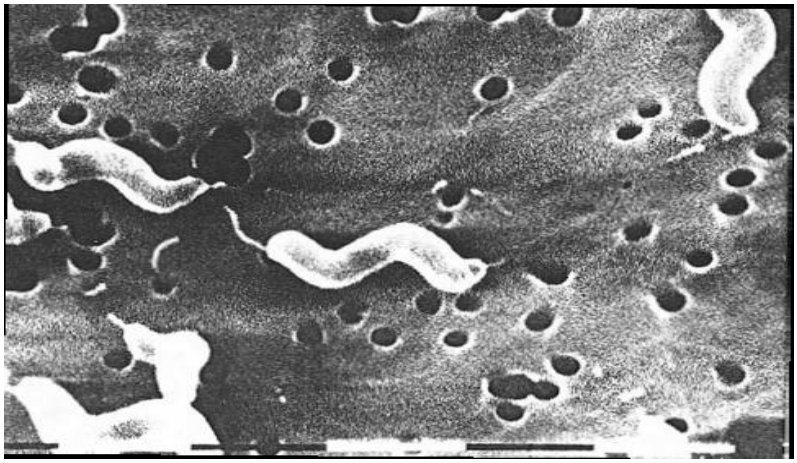


Figura 1. Características morfológicas de *Campylobacter* spp.
Fuente: Altekruse & Tollefson, 2003.

Son oxidasa positiva, no utilizan azúcares, obteniendo su energía de aminoácidos o intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico no derivados de hidratos de carbono. Estas bacterias son sensibles a los aniones superóxido y peróxido de hidrógeno producido en los medios, para neutralizar estos productos tóxicos del oxígeno y aumentar la aerotolerancia de los organismos se puede añadir sangre lisada a los caldos de enriquecimiento y agares selectivos (Cervantes & Cravioto, 2007).

1.1.1 Taxonomía.

En un inicio *Campylobacter* fue clasificado dentro del género *Vibrio*. Sin embargo, más tarde, debido a que presentan diferencias fundamentales con relación a la constitución del ADN (ácido desoxirribonucleico) y por su incapacidad para fermentar hidratos de carbono, fueron agrupados en un nuevo género bacteriano denominado *Campylobacter* (Butzler, 2004).

Actualmente el género *Campylobacter* pertenece a la familia Campylobacteraceae, orden Campylobacterales, clase Epsilonproteobacteria, filo Proteobacteria y dominio Bacteria. Hoy dentro de éste género encontramos 24 potenciales especies que son: *C. fetus, C. coli, C.*

concisus, C. curvus, C. gracilis, C. helveticus, C. hominis, C. hyointestinalis, C. jejuni, C. lanienae, C. lari, C. mucosalis, C. rectus, C. showae, C. sputorum, C. upsaliensis, C. insulaenigrae, C. peloridis, C. avium, C. subantarticus, C. canadensis, C. cunicolurum, C. volucris y *C. ureoliticus* (Lapierre, 2013).

1.2. Especies termófilas.

Son aquellas especies pertenecientes al género *Campylobacter* capaces de crecer a 42- 43°C pero no a 25°C, comprende *C. jejuni* (subespecies *jejuni* y *doylei*), *C. coli, C. lari* y *C. upsaliensis.*

- ***Campylobacter jejuni subespecie jejuni.***

Comúnmente conocida como *C. jejuni,* representa el taxón descrito por primera vez en 1931 como *Vibrio jejuni* encontrada en el contenido intestinal bovino. Desde la década de 1970, este organismo ha sido ampliamente conocido como el agente causal más aislado de gastroenteritis humana en todo el mundo considerado el más virulento por su mayor resistencia a la fagocitosis; esta especie bacteriana utiliza una amplia gama de huéspedes como pollos, vacas, cerdos, ovejas, perros y avestruces; debido a su predominio en animales destinados al consumo lo convierten actualmente en uno de los patógenos más importantes transmitidos por los alimentos (Ketley & Konkel, 2005).

- ***Campylobacter coli.***

Fue aislado inicialmente de cerdos afectados con disentería infecciosa, en la actualidad sigue siendo encontrada en cerdos, aunque generalmente no es una causa de la enfermedad en estos animales algunas cepas pueden ser patógenas. *C. coli* también puede encontrarse en un amplio grupo de animales entre éstos aves de corral, avestruces, vacas, ovejas, cabras, gatos y perros, asociándola en ocasiones con la hepatitis en las aves. En los humanos, la infección causa una diarrea más benigna que la producida por *C. jejuni; C. coli* es considerado como la segunda especie de *Campylobacter* más común como agente causal de gastroenteritis en humanos; en algunas regiones, la especie representa hasta el 50% de campilobacteriosis humana. El pariente genético más cercano a *C. coli* es *C. jejuni,* existiendo una concordancia de 21-63% en los valores de hibridación ADN-ADN. Estas dos especies son fenotípicamente homogéneas y su diferenciación es problemática siendo la prueba determinante para este propósito la hidrólisis de hipurato que en *C. coli* da un resultado negativo (Ketley & Konkel, 2005).

- ***Campylobacter lari.***

Ha sido aislado inicialmente del intestino de gaviotas, además las cepas han sido identificadas del tracto intestinal de aves silvestres, aves de corral, ganado, mariscos y agua no tratada; se los distingue de las especies morfológicamente similares *C. coli y C. jejuni* en virtud de su resistencia "clásica" al ácido nalidíxico y negativo para la prueba de indoxyl acetato (Fernández, 2008).

- ***Campylobacter upsaliensis.***

Es el nombre dado a un grupo de campylobacterias catalasa negativo o catalasa débil, aisladas inicialmente de heces caninas donde puede producir diarrea. *C. upsaliensis* se ha aislado también de brotes de gastroenteritis en seres humanos; son más resistentes al poder bactericida del suero que las otras especies termófilas, por lo que puede sobrevivir en sangre causando bacteriemias en huéspedes inmunocomprometidos. Si bien su fuente de infección no está bien definida, se ha relacionado con gatos, perros, leche no pasteurizada y sus derivados (Fernández, 2008).

1.3. Epidemiología.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la campilobacteriosis como una infección del tracto gastrointestinal cuya sintomatología incluye dolor abdominal, malestar general, fiebre, náuseas, vómitos y diarrea que en ocasiones presenta moco y sangre. La enfermedad normalmente dura de 2 a 5 días, pero puede prolongarse por recaídas, especialmente en los adultos aunque algunas de las personas infectadas pueden no mostrar síntomas convirtiéndose en portadores asintomáticos (WHO, 2011).

El primer reconocimiento de la infección por *Campylobacter* fue reportado a principios del siglo XX, inicialmente conocido como *Vibrio fetus,* siendo agente causal de abortos sépticos en ovejas y vacuno. En 1947 *V. fetus* fue reportado como causa de aborto en tres mujeres hospitalizadas por fiebre de origen desconocido, posterior a esto se aisló como patógeno oportunista en huéspedes inmunocomprometidos (Butzler, 2004). En los años 70 se desarrollaron medios selectivos adecuados para su aislamiento, siendo reconocido desde los años 80 como una causa importante de enfermedad gastrointestinal (Chanqueo, García, León, & Blu, 2005).

Los datos con respecto a la campilobacteriosis en Latinoamérica son escasos reportando una frecuencia relativa de aislamiento de *Campylobacter* spp. en gastroenteritis aguda de 5-20% (Prado & O'Ryan, 1994).

En Ecuador los datos son limitados, el primer estudio realizado en 1984 en niños menores de 2 años se reporta una prevalencia de 23% (Guderian, Ordoñez, & Bossano, 1984). En 1994 el plan Atucucho del Proyecto Franco Ecuatoriano para el Control de las Enfermedades Diarreicas y el Cólera (PFE) realizó un estudio en niños menores de 5 años con diarrea aguda encontrando como germen causal bacterias patógenas en un 10,9% siendo *Campylobacter* spp, el responsable del 31% de estos casos (Briand, Escalante, & Martine, 1994). En el 2014 se analizaron muestras de personas con una edad promedio de 14 años en dos comunidades ecuatorianas Guamaní 5.5% y Borbón 1.3% (Vasco *et al*., 2014).

1.4. Fuentes de transmisión.

La infección por *Campylobacter* constituye una zoonosis encontrándose habitualmente como comensal del tracto gastrointestinal de vacas, ovejas, cerdos, cabras, perros, gatos, roedores silvestres o domésticos y toda variedad de aves de corral; a menudo es difícil rastrear las fuentes de exposición a *Campylobacter* debido a la naturaleza esporádica de la infección, y el importante papel de la contaminación cruzada (WHO, 2012).

Se considera que un alto porcentaje de infecciones es provocado por consumo de carne de ave mal cocida, leche no pasteurizada y productos lácteos, nadar en lagos contaminados y no menos importante la transmisión persona - persona (Sangaré *et al*., 2012).

- **Reservorios animales**

Los principales reservorios los constituyen el ganado bovino y ovino, roedores, aves silvestres y de corral, animales de compañía como perros y gatos. El espectro de reservorios varía con la especie: *C. jejuni* tiene un reservorio amplio, mientras que *C.coli* es más frecuentemente aislado en ganado porcino. La adquisición primaria del germen por los animales ocurre generalmente a una edad temprana y puede ser causa de morbimortalidad en estos animales, la mayoría de las veces la colonización conduce a un estado de portador de por vida siendo difícil incriminar a este agente como causa de enfermedad diarreica en estos animales (WHO, 2012).

C. jejuni y en menor medida *C. coli*, son comensales habituales del aparato digestivo del ganado vacuno; la enteritis por *C. jejuni* en terneros da un cuadro clínico diferenciado con fiebre moderada, y diarrea que puede durar hasta 14 días pudiendo excretar aproximadamente 106 bacterias por gramo de heces, constituyendo una importante fuente de contaminación del ambiente; además es posible que este agente pueda causar mastitis en las vacas; *C. jejuni* también es una importante causa de abortos en los ovinos, las ovejas abortan

en el último período de la preñez o dan nacimiento a corderos muertos o débiles que pueden morir a los pocos días (Acha & Szyfres, 2001; F. García, Pérez, & Echeita, 2006).

Por otro lado los animales de compañía principalmente los perros cachorros con diarrea constituyen una fuente de infección para sus dueños, la diarrea es el síntoma predominante y el vómito parece frecuente siendo el principal agente aislado *C. upsaliensis.* La enfermedad es más frecuente en cachorros, pero puede aparecer en animales adultos (Chaban, Ngeleka, & Hill, 2010).

- **Reservorios humanos.**

Como sucede con otras infecciones entéricas, la vía de transmisión fecal-oral entre individuos infectados es posible, en los países en desarrollo la mayoría de los niños se inmunizan a lo largo del primer año de vida encontrándose el agente patógeno con frecuencia en las heces de los niños mayores sanos (Bhan *et al*., 2008).

La transmisión a partir de personas infectadas asintomáticas que manipulan los alimentos es extremadamente rara, pero es frecuente cuando la infección es sintomática, lo que justifica la exclusión de tales trabajadores del entorno laboral mientras se encuentran afectados; otra forma de infección del hombre puede producirse en la cocina por contaminación cruzada de carnes con *Campylobacter* a otros alimentos que no requieren cocción, o por cocción insuficiente (WHO, 2012).

- **Reservorios ambientales.**

El microorganismo se transmite principalmente a través de alimentos de origen animal mal cocinado, leche no pasteurizada y contacto con animales enfermos; el agua contaminada con heces puede ser la fuente de brotes de campilobacteriosis, sobre todo por el consumo de la misma y en vinculación con actividades recreacionales. También bajo condiciones que favorecen la replicación del germen, la contaminación fecal del suelo puede ser origen de infección humana principalmente por el consumo de vegetales cosechados en ellas (Fernández, 2008).

1.5. Patogenia.

Las especies termófilas de *Campylobacter* son bacterias patógenas que causan infección gastrointestinal denominada campilobacterosis, las manifestaciones clínicas dependen principalmente del inóculo ingerido y el estado inmunológico del hospedero por lo que no todas las infecciones son sintomáticas; la dosis infectante mínima es de 500 unidades formadoras

de colonia (UFC), el cuadro clínico se caracteriza por diarrea acuosa, fiebre, dolor abdominal, calambres y retortijones (Butzler, 2004).

La campilobacteriosis es una enfermedad autolimitante y generalmente no requiere tratamiento excepto la reposición hidroelectrolítica, dependiendo de la patogenicidad de la cepa y el estado inmune del paciente se pueden dar complicaciones y ser necesario un tratamiento antimicrobiano. En personas con el sistema inmune alterado como en el embarazo, nacimientos prematuros, alcoholismo crónico, neoplasias, enfermedades cardiovasculares y ancianos ocasionalmente se produce bacteriemia con riesgo para la vida del individuo, siendo la tasa de mortalidad en estos casos inferior al 1% (Acha & Szyfres, 2001; García *et al*., 2006).

El periodo de incubación de *Campylobacter* es de 2 a 5 días pero puede extenderse hasta los 10 días, y una vez que se presenta la diarrea puede durar 2 o 3 días, su severidad oscila desde materia fecal blanda hasta líquida o sanguinolenta pudiendo haber más de 10 evacuaciones en el peor día de la enfermedad. En el análisis de las heces al microscopio se puede observar un exudado inflamatorio con infiltrado de leucocitos, así como un gran número de campilobacterias, las cuales pueden reconocerse por sus características morfológicas. La diarrea causada por *Campylobacter* es autolimitada y el dolor abdominal puede persistir después de la resolución de la diarrea y se puede dar una pérdida de peso de 5 kg o más. Los organismos pueden ser excretados en las heces hasta 38 días después de la recuperación clínica y la infección puede reaparecer en el 5 al 10% de los pacientes (Cervantes & Cravioto, 2007).

En los últimos años, se han identificado características de las especies de *Campylobacter* que podrían estar involucradas directamente en la patogenia, entre ellas están la motilidad, la capacidad de adherencia a la célula y la producción de citotoxinas; la presencia de 1 o 2 flagelos polares es esencial para la colonización de células, los genes flaA y flaB sintetizan la flagelina componente principal del flagelo. El flagelo marca la motilidad bacteriana y por ende la invasión en las cepas de *Campylobacter*; una de las principales característica de la flagelina de *Campylobacter* es su estructura altamente glicosilada, la glicosilación es muy importante en cepas de *C. jejuni* debido a que no se puede ensamblar el flagelo si esta proteína no está adecuadamente glicosilada (Konkel, Monteville, Rivera, & Joens, 2001; Putten, Alphen, Wösten, & Zoete, 2009). Se cree que la alta velocidad que presenta *Campylobacter* en medios viscosos, cuando se compara con otras bacterias móviles, se debe a su forma helicoidal y a la presencia del flagelo que le permiten realizar un movimiento que imita al de un sacacorchos (Galkin *et al*., 2008).

Otro de los factores asociados a la patogenicidad es la adherencia, existiendo una correlación entre la adhesión e invasión de las cepas de *Campylobacter* con el grado de severidad de los síntomas clínicos en pacientes infectados; la proteína CadF que es expresada en todas las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* participa en la adhesión celular, 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 pb (pares de bases), se ha demostrado 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 es importante en la adhesión a la célula hospedera, al unirse a la fibronectina que está localizada en la superficie celular produce procesos de señalización para la adhesión que conducen a la activación de pequeñas GTPasas Rac1 y Cdc42 que inducen la propia internalización de la bacteria en la célula hospedera (Dasti, Tareen, Lugert, Zautner, & Gross, 2010).

Además de los factores descritos anteriormente, *Campylobacter* secreta la toxina distensora citoletal (CDT, Cytolethal Distending Toxin), esta toxina en cultivos celulares humanos causa detención del ciclo celular y muerte. Esta proteína está formada por 3 subunidades, CdtA, CdtB y CdtC, siendo las 3 necesarias para la funcionalidad de la proteína. En concreto, CdtA y CdtC son esenciales para la unión a la célula, mientras que la CdtB es internalizada y translocada hasta el núcleo donde induce la detención del ciclo celular en la fase G2 (Lapierre, 2013). El papel del CDT en la patogénesis de la enfermedad aún no ha sido descrito, sin embargo, podría actuar en la modulación del sistema inmune ya que estimula la vía proinflamatoria del NFκB e induce la producción de IL8, atrayendo al sitio de infección a células dendríticas, macrófagos y neutrófilos; en ratones la producción de CDT contribuye a aumentar la patogenicidad de las cepas de *C. jejuni*, ya que prolonga la persistencia de la enfermedad gastointestinal, aumentando la inflamación de la mucosa gastrointestinal y el daño hepático (Hickey, Baqar, Bourgeois, Ewing, & Guerry, 1999; Lapierre, 2013)

Pese a que la mayoría de casos de campilobacteriosis no son fatales, una infección aguda puede tener graves consecuencias a largo plazo incluyendo las neuropatías periféricas como síndrome de Guillain Barré y el síndrome de Miller Fisher (MFS), y enfermedades intestinales funcionales como el Síndrome de intestino irritable (IBS).

1.5.1. Síndrome de Guillain Barré (SGB)

Es una polineuropatía desmielinizante inmunomediada del sistema nervioso periférico (SNP) que se caracteriza por debilidad aguda o subaguda ascendente simétrica motor, arreflexia y anomalías sensoriales. Entre las numerosas infecciones microbianas, sólo *C. jejuni* está firmemente establecido como un agente causal de SGB, entre un 25% a 40% de los pacientes con SGB tienen antecedentes de infección por *C. jejuni* de 1 a 3 semanas antes de la

enfermedad. Sin embargo sólo 1 de cada 1.000 pacientes expuestos a la infección por *Campylobacter* desarrollan el síndrome (Nyati & Nyati, 2013).

El SGB se puede originar por respuesta autoinmune a antígenos extraños (agentes infecciosos) que son mal dirigidos al tejido nervioso causando daño en los gangliósidos (glucoesfingolípidos presentes en el tejido nervioso humano). Un ejemplo es el gangliósido GM1, que puede estar afectado en el 20 a 50% de los casos, especialmente en aquellos con una infección por *C. jejuni.* El resultado final de estos ataques autoinmunes en los nervios periféricos es la pérdida de mielina y consecuentemente el bloqueo en la conducción nerviosa. *C. jejuni* genera anticuerpos antigangliósidos GM1, GQ1b y GD1. Los sueros de los pacientes en la fase aguda de SGB asociado a *C. jejuni* contiene altos títulos de anticuerpos frente a diversos gangliósidos que reaccionan de forma cruzada con *C. jejuni,* con esto se puede establecer el mimetismo entre los antígenos microbianos *C. jejuni* y estructuras en tejido huésped que desencadenan la activación de una reacción cruzada o respuesta inmune en este caso GBS después de la infección bacteriana (Godschalk *et al*., 2004).

1.5.2. Síndrome de Miller Fisher (SMF)

Es una neuropatía asociada con ataxia, arreflexia, y oftalmoplejía y se considera como una variación de la forma SGB. El diagnóstico en este síndrome se basa en la detección de anticuerpos anti GQ1b, los antígenos respectivos se encuentran en muy altas concentraciones en los nervios oculomotores y otros nervios craneales, de ahí su correlación clínica; más del 85% de los pacientes con este síndrome presentan este anticuerpo. En gran parte de los pacientes se detecta antecedentes de infecciones en las vías aéreas superiores o por infecciones intestinales debido a *C. jejuni* (G. García & Cacho, 2005).

1.5.3. Síndrome de Intestino Irritable (SII)

Es un trastorno heterogéneo funcional del intestino delgado y grueso que se caracteriza por dolor abdominal, meteorismo con distensión abdominal y alteración en las evacuaciones intestinales con predominio de diarrea, estreñimiento o alternancia de estos signos; estos síntomas se desarrollan generalmente posterior a una gastroenteritis bacteriana aguda siendo *Campylobacter* uno de los principales organismos causales, en el SII se evidencia una alteración en las células inflamatorias principalmente el incremento en la expresión de citoquinas inflamatorias como es el caso de la interleucina-1 beta (IL- 1β) además se ha demostrado la existencia de un aumento en la permeabilidad intestinal (Leighton, Lam, Mehta, & Spiller, 2013).

1.6. Actividad antimicrobiana.

La resistencia a los antimicrobianos se originó en los alimentos de procedencia animal, *Campylobacter* no es la excepción convirtiéndose últimamente en un problema de salud pública para los países. Hasta hace algunos años, se consideraba a las fluroquinolonas como uno de los fármacos de elección en el tratamiento frente a *Campylobacter*; no obstante, en los últimos años se ha detectado una proporción creciente de cepas resistentes (Butzler, 2004).

- **Resistencia a fluroquinolonas (FQ).**

A principio de 1990 la resistencia a estos antibióticos era inusual pero, el uso indiscriminado de FQ en seres humanos y en la crianza de aves de corral ha contribuido a un aumento de cepas resistentes (Iovine, 2013).

Las FQ tienen dos sitios blanco en las bacterias gramnegativas: un sitio principal topoisomerasa II codificada por gyrA y gyrB y un sitio secundario topoisomerasa IV codificada por parC y parE, las FQ forman un complejo estable con estas enzimas con una consiguiente disminución en la replicación y transcripción del ADN con una consecuente muerte celular. *C. coli y C. jejuni* carecen de los genes parC y parE por lo que el blanco secundario está ausente por que lo excluye como blanco de resistencia. La resistencia a FQ está dada por una mutación puntual en la QRDR (*Quinolone Resistance-Determining Region*) del gen gyrA que determina un cambio aminoacídico (Thr-86 a Ile) en la región blanco de la topoisomerasa II. La no existencia del blanco secundario permite que esta modificación sea suficiente para que *Campylobacter* presente resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas (CIM ≥ 16 µg/mL) (Iovine, 2013; Wieczorek & Osek, 2013).

- **Resistencia a tetraciclinas.**

Las tetraciclinas fueron descubiertas en la década de 1940 y debido a su amplio espectro tiene actividad frente a microorganismos gram negativos y gram positivos. En la década de los 50 se popularizó su uso tanto en humanos como en veterinaria que ha desencadenado una resistencia generalizada limitando su uso (Iovine, 2013).

Las tetraciclinas actúan inhibiendo la síntesis proteica de las bacterias, se fijan con gran afinidad a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, de manera que impiden la unión del sitio aminoacil del ARNt a la subunidad 30S ribosomal, y de esta forma se paraliza la incorporación de aminoácidos durante la síntesis proteica (Brunton, Chabner, & Knollman, 2012). La resistencia a las tetraciclinas en *Campylobacter* es conferida por el gen tet(O) que codifica la proteína de protección ribosomas Tet(O) que está ampliamente distribuida en *C. coli* y *C.*

jejuni, la proteína interactúa con el ribosoma bacteriano; en condiciones normales los ribosomas tienen una configuración estándar y funcionan normalmente, lo que se altera al penetrar el antibiótico. La unión de la proteína al ribosoma produce un cambio conformacional que impide la unión con la tetraciclina. El gen tet (O) confiere altos niveles de resistencia a la tetraciclina (512mg/L) (Wieczorek & Osek, 2013).

- **Resistencia a macrólidos.**

Los macrólidos inhiben la síntesis de proteínas bacterianas; la eritromicina es el macrólido de elección para el tratamiento de la campilobacteriosis (Brunton *et al*., 2012), los macrólidos ejercen su actividad antimicrobiana inhibiendo la síntesis de proteínas mediante la unión reversible al sitio P de la subunidad 50S de los ribosomas bacterianos impidiendo la translocación proteica. Los principales mecanismos de resistencia a macrólidos son la modificación del sitio diana, de flujo de salida y la permeabilidad alterada de la membrana (Iovine, 2013). La resistencia a macrólidos en *Campylobacter* es el resultado de la modificación del sitio de unión al ribosoma por una mutación en el gen 23S ARNr que confiere un nivel de resistencia a eritromicina (128 mg/L) (Wieczorek & Osek, 2013).

- **Resistencia a aminoglucósidos.**

Los aminoglucósidos son inhibidores de la síntesis de proteínas de muchos gram positivos y gram negativos, siendo su sitio intracelular de acción la subunidad ribosómica 30S, que provoca error de lectura del ARNm con producción de una proteína anómala que provoca la muerte bacteriana (Iovine, 2013). La resistencia en *Campylobacter* es mediada por modificación enzimática, este mecanismo corresponde a la inactivación de los compuestos por enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMA). Estas enzimas catalizan la modificación covalente de grupos aminos e hidroxilos de la molécula, generando modificaciones químicas que llevan al aminoglucósido a unirse débilmente a los ribosomas bacterianos y, por lo tanto afectan el ingreso del antibacteriano (Mella *et al*., 2004).

- **Resistencia a Beta - lactámicos.**

Los antibióticos β-lactámicos son una clase diversa de compuestos, incluyen penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes y monobactamas, que contienen el anillo de β-lactama requerida para la actividad antimicrobiana (Iovine, 2013).

Los betalactámicos son agentes bactericidas que producen su efecto a través de 2 mecanismos: inhibición de la síntesis de la pared bacteriana e inducción de la autólisis bacteriana. La resistencia en *Campylobacter* se da por la producción de lactamasas que son

enzimas que catalizan la hidrólisis del anillo β-lactámico inactivando el antibiótico antes de su unión con las proteínas ligadas a la penicilinas, indispensables para la formación de la pared celular bacteriana (Suárez & Gudiol, 2009).

1.7. Diagnóstico clínico.

No se requiere consideraciones especiales para la recolección, el transporte y el procesamiento de las muestras clínicas para la detección de las especies de *Campylobacter;* las muestras más comunes con las que se trabaja son las heces, sin embargo, en pacientes inmunodeprimidos que se presume septicemia se usa muestras sanguíneas. El esquema de identificación convencional para *Campylobacter* se basa en características fenotípicas clásicas, como la apariencia morfológica, reacciones bioquímicas y temperatura de crecimiento (Farance & Viñas, 2007).

1.7.1. Examen presuntivo.

El examen directo de las heces es una herramienta útil para el diagnóstico temprano, utilizando diferentes tinciones como gram modificado, Vagó y Hucker. El gram modificado usa carbolfucsina (fucsina fenicada al 0.8%) como coloración de contraste debido a que este microorganismo no se tiñe bien con safranina. La tinción de Hucker contiene cristal violeta para reactivo de Hucker (cristal violeta 2 g, alcohol etílico 20 ml, oxalato de amonio 0,8 g y agua destilada 80 ml) y bicarbonato de sodio al 1% **(Anexo 1)**, la tinción de Vagó consta de mercurio cromo al 2% y cristal violeta (solución de cristal violeta al 0.2%); estas tinciones permiten identificar las características morfológicas de *Campylobacter* (Zamudio & Fernández, 2003).

1.7.2. Aislamiento e identificación.

El cultivo de las especies termotolerantes de *Campylobacter* es más estricto que los cultivos rutinarios; sin embargo, una vez que se hayan establecido y seguido ciertos parámetros su aislamiento e identificación se hacen factibles. Existen varios medios comerciales empleados para el aislamiento de *Campylobacter* spp, que contienen suplementos proporcionando los nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano, antibióticos y antimicóticos que inhiben la flora acompañante, además el medio de cultivo necesita la adición del 5% de sangre que proporciona aminoácidos, la principal fuente de energía para *Campylobacter* **(Anexo 2)**.

En la determinación de *Campylobacter* es frecuente el uso del método de filtración, se basa en la separación de *Campylobacter* del resto de la flora microbiana como coliformes presente en las heces que quedan retenidos en la membrana de celulosa, los bacilos más delgados y

pequeños como *Campylobacter* atraviesan la porosidad y logran depositarse sobre un medio sin antibióticos (Fernández, 2008).

Para el crecimiento de las especies termófilas de *Campylobacter* se requieren consideraciones especiales, por ejemplo tienen un crecimiento óptimo a 42 °C y son particularmente sensibles a cambios físicos y químicos como la disminución de agua y la reducción de pH **(Tabla 1)** (WHO, 2013).

Tabla 1. Condiciones para el crecimiento de especies termotolerantes de *Campylobacter.*

	Mínimo	**Optimo**	**Máximo**
Temperatura (°C)	30	42 – 43	45
Ph	4.9	6.5 – 7.5	~9
NaCl(%)	–	0.5	1.5
Actividad de agua(a_w)	>0.987	0.997	–
Atmósfera	–	5% O_2 + 10% CO_2	–

Fuente: Garcés, Klotz, Mantilla, Román., & Romero, 2013.

La identificación fenotípica de las especies de *Campylobacter* requiere un conjunto de pruebas adicionales **(Tabla 2)**, entre ellas la hidrólisis de hipurato que se basa en la acción de la enzima hipuricasa sobre el hipurato de sodio lo que produce glicina y ácido benzoico. La reacción del reactivo (ninhidrina) produce una coloración azul-violeta en contacto con la glicina (Malbrán, 2001).

Tabla 2. Características diferenciales de las especies de *Campylobacter*

Especie	**Catalasa**	**Oxidasa**	**Hidrólisis del hipurato**
C. coli	+	+	-
C. jejuni	+	+	+
C. lari	+	+	-
C. upsaliensis	+/- débil	+	+

Fuente: Malbrán, 2001.

1.7.3. Reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR - Multiplex).

Es una técnica molecular que consigue amplificar simultáneamente más de una secuencia de genomas diferentes en una sola reacción mediante el empleo de dos o más parejas de cebadores. Todos los cebadores deben reaccionar a una temperatura de fusión similar, dentro de un rango de +/-5°C y los tamaños de los productos amplificados de la PCR deberán ser también semejantes pero distinguibles, entre unos valores de 200 a 500 pb (Yamazaki *et al*., 2007).

CAPITULO II

METODOLOGÍA.

2.1. Recolección de las muestras

Se analizó 176 muestras de materia fecal emitida por deposición espontánea de pacientes menores de 11 años, proporcionadas por el laboratorio clínico del Hospital Manuel Ygnacio Monteros en el período septiembre a diciembre del 2014. Fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de la Salud de la Universidad Técnica Particular de Loja.

2.2. Aislamiento e identificación de especies termotolerantes de *Campylobacter.*

La identificación presuntiva de *Campylobacter* se realizó mediante frotis directo de las heces usando la tinción de Hucker, considerando como muestra positiva la presencia de formas espirales semejantes a alas de gaviotas. Las muestras fecales fueron sembradas en medio selectivo comercial suplementado Butzler de Oxoid **(Anexo 3)** e incubadas a 42°C por 48 horas bajo una atmósfera de microaerofilia **(Figura 2)**.

Figura 2. Incubación bajo condiciones de microaerofilia.
Fuente: La autora.

Posterior a las 48 horas de incubación se identificaron las colonias presuntivas que se mostraron planas, no hemolíticas, de aspecto acuoso, grisáceas, con tendencia a diseminarse por la línea de estriado **(Figura 3),** que se confirmaron mediante tinción de Hucker. Para la veracidad de nuestros resultados se usaron cepas control *C. jejuni* DSM 4688 y *C. coli* DSM 4689 proporcionadas por el Instituto de Microbiología Clínica de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile.

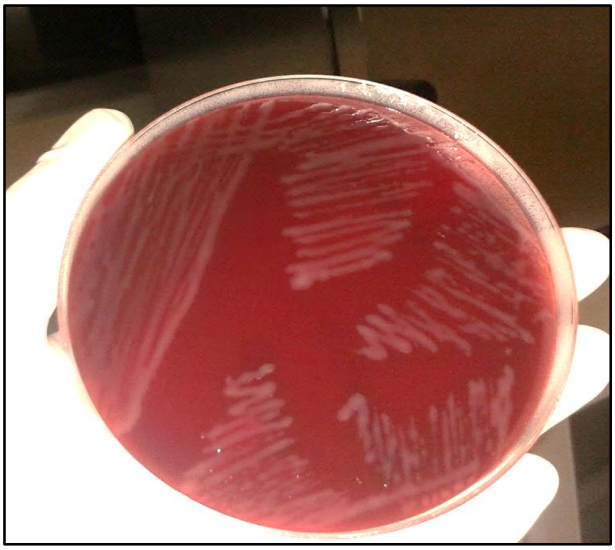


Figura 3. Cultivo de *Campylobacter* spp**.**
Fuente: La autora.

La flora acompañante presente en nuestros cultivos se eliminó mediante filtración **(Anexo 4)**. Una vez obtenido el cultivo puro con la finalidad de preservar las cepas aisladas se crioconservó a -70°C **(Anexo 5)**.

2.3. Pruebas complementarias para Identificación de *Campylobacter* spp.

La identificación fenotípica de las especies termotolerantes de *Campylobacter* se realizó mediante hidrólisis de hipurato, oxidasa y catalasa **(Anexo 6)**. La prueba principal es la hidrólisis de hipurato que se interpreta tomando como reacción positiva la aparición de una coloración azul purpura que revela la presencia de glicina, producto final de la hidrólisis de hipurato **(Figura 4)**.

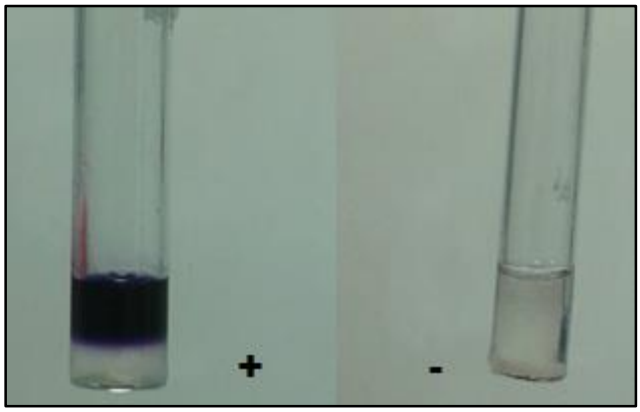


Figura 4. Prueba de hidrólisis del hipurato.
Fuente: La autora.

2.4. Pruebas de sensibilidad.

La actividad antimicrobiana frente a las cepas aisladas se determinó mediante el método de difusión en agar según las recomendaciones del Comité de Antibiogramas de la Sociedad Francesa de Infectología (CA-SFM) y el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad (EUCAST) **(Anexo 7)**. Los discos de sensibilidad usados fueron de BD BBL™ ciprofloxacino (CIP) 5µg, ampicilina (AM) 10µg, amoxicilina/acidoclavulánico (AmC) 10/20µg, eritromicina (E) 15µg, gentamicina (GM) 10µg y tetraciclina (TE) 30µg **(Tabla 3)**.

Tabla 3. Puntos de corte para susceptibilidad de *Campylobacter* spp.

Grupo	Antibiótico	S≥	R≤
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino	26	26
Beta-lactámico	Ampicilina	19	14
	Amoxicilina/ácido clavulánico	19	14
Macrólido	Eritromicina	20	20
Aminoglucósido	Gentamicina	17	17
Tetraciclina	Tetraciclina	30	30

Fuente: CA-SFM/EUCAS, 2014.

2.5. PCR - Multiplex

Haciendo uso de un cultivo fresco se realizó la extracción de ADN mediante la aplicación del protocolo para células cultivadas del kit E.Z.N.A® Tissue DNA de la casa comercial Omega Bio-Tek **(Anexo 8)**.

Se realizó PCR - Multiplex **(Anexo 9)**. Se usó cepas control *C. coli* y *C. jejuni* señaladas anteriormente; los primers requeridos se exponen en la **(Tabla 4)**, el volumen final de reacción 25 µl por cada muestra, se amplificó en el termociclador Veriti® 96 Well-Thermal Cycler PCR y finalmente el producto de la PCR se corrió en gel de agarosa al 1.5 % **(Anexo 10)** usando un marcador de peso molecular TrackIt™ 100bp DNA Ladder Invitrogen y revelados bajo luz ultravioleta a 300 nm en el Transiluminardo UV Labnet.

Tabla 4. Secuencias de primers usados para PCR- Multiplex.				
Especies	**Tamaño (pb)**	**Gen**	**Primer**	**Secuencia (5´a 3´)**
Género *Campylobacter*.	816	16s Rrna	C412F	5´-GGATGACACTTTTCGGAGC- 3´
C. hyointestinalis* Subsp. *hyointestinalis.	611	23S rRNA	C1228R* HYO1F	5´-CATTGTAGCACGTGTGTC- 3´ 5´-ATAATCTAGGTGAGAATCCTAG -3´
C. coli	502	*ask†*	HYOFET23SR CC18F CC519R	5´-GCTTCGCATAGCTAACAT- 3´ 5´-GGTATGATTTCTACAAAGCGAG- 3´ 5´-ATAAAAGACTATCGTCGCGTG- 3´
C. fetus.	359	*CstA*	MG3F CF359R	5´-GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT- 3´ 5´-AGCCAGTAACGCATATTATAGTAG- 3´
C. lari	251	*GlyA*	CLF CLR	5´-TAGAGAGATAGCAAAAGAGA- 3´ 5´-TACACATAATAATCCCACCC- 3´
C. jejuni	161	*cj0414§*	C1 C3	5´-CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT- 3´ 5´-CCATAAGCACTAGCTAGCTGAT- 3´
C. upsaliensis	86	*LpxA*	CU61F CU146R	5´-CGATGATGTGCAAATTGAAGC- 3´ 5´-TTCTAGCCCCTTGCTTGATG- 3´

Fuente: Yamazaki *et al*., 2007.

CAPITULO III.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el 2013 el Ministerio de Salud Pública del Ecuador reportó en la provincia de Loja a la diarrea y gastroenteritis de presunto origen infeccioso como la quita causa de consulta externa en pacientes menores de 14 años equivalente al 6% del total de las consultas siendo de notificación obligatoria únicamente la gastroenteritis por *Salmonella.* Conociendo que en países industrializados y en vías de desarrollo *Campylobacter* spp. es importante dentro de las infecciones de transmisión alimentaria en el presente estudio se pretende brindar datos epidemiológicos reales en nuestra localidad.

Durante el período del estudio se recolectaron 176 muestras de heces diarreicas y no diarreicas de pacientes con edades de 2 meses a 11 años del Hospital Manuel Ygnacio Monteros ubicado en la cuidad de Loja, encontrando una prevalencia C*ampylobacter* spp. de 6,8%(12) **(Tabla 5)**, porcentaje es similar a los reportados en dos comunidades ecuatorianas Guamaní 8% y Borbón 1,3% en muestras de pacientes menores de 14 años (Vasco *et al*. 2014). En 1994 el proyecto Atucucho del PFE encontró a *Campylobacter* como el agente etiológico causal del 31% de enfermedades de origen bacteriano en niños menores de 5 años mientras en 1984 se encontró una prevalencia de 23% en muestras de niños menores de 2 años con diarrea aguda internados en clínicas de Quito. Es importante señalar los estudios citados se realizaron con pacientes pertenecientes a zonas periurbanas y de nivel socioeconómico bajo, las diferencias de porcentaje de aislamiento podríamos atribuirlas a que en la actualidad las condiciones higiénico sanitarias son superiores a las de los años 80 y 90 con una consecuente reducción de los focos de infección (Briand *et al*., 1994; Guderian *et al*., 1984).

Tabla 5. Determinación de *Campylobacter* spp.

	Número de muestras	**Porcentaje**
***Campylobacter* spp.**	12	6,8%
Negativas	164	93,2%
TOTAL	**176**	**100%**

Fuente: La autora.

El porcentaje aislado en el presente estudio 6,8% es similar a datos reportados en Perú donde se aisló *Campylobacter* spp en un 4,8% en niños menores de 2 años que presentaban diarrea y en Chile 5,1% en un grupo de niños menores de 15 años (Perales, Camiña, & Quiñones, 2002; Fernández, Vera, Villanueva, & García, 2008). Reportes inferiores de aislamiento son los encontrados en Colombia 2,3% en muestras de pacientes pediátricos menores a 5 años

que presentaban diarrea y en Chile 2,1% en niños menores de 14 años (Manrique, Tigne, Bello, & Ospina 2006; Rivera *et al*. 2011).

En Chile se reporta un porcentaje de 15,3% en muestras de niños menores de 5 años que presentaban desnutrición (Fernández *et al*., 2008). Esta frecuencia de aislamiento podría estar relacionada con la condición inmunológica alterada de los pacientes convirtiéndolos en individuos propensos a adquirir la infección. En Paraguay en pacientes menores de 11 años con cuadro diarreico agudo se aisló en un 16% (Orrego *et al*. 2014). Otra cifra alta es la obtenida en Uruguay 14,3% en muestras diarreicas sanguinolentas (Mota *et al*. 2010). Es importante mencionar que en nuestro estudio los casos positivos incluyeron muestras diarreicas 42%(5) y muestras no diarreicas 58%(7) frente a los estudios citados que analizan en su mayoría muestras de pacientes con cuadros diarreicos subvalorando la importancia del aislamiento en pacientes asintomáticos.

Por lo señalado anteriormente podemos concluir que los datos encontrados en el presente estudio se encuentran cerca de la media 8,4% de los estudios antes citados, donde gran parte de la población mantiene contacto con animales como perros, gatos y aves que en general son una fuente de riesgo importante para adquirir esta infección. Además nuestro estudio sugiere que existe un creciente número de portadores asintomáticos de *Campylobacter* siendo importante tomar esto en consideración para futuros estudios.

Al determinar las especies de *Campylobacter* **(Tabla 6, Figura 5)**, la mayor prevalencia corresponde a *C. jejuni* con un 91,7%(11) concordante a lo reportado en nuestro país 66,7% y a datos encontrados en la región donde *C. jejuni* es la especie predominante (Vasco *et al*. 2014). En Argentina se analizó muestras diarreicas de pacientes con un promedio de edad de 4 años aislando *C. jejuni* en un 96% mientras en Chile 87,1% en pacientes menores de 5 años (Jara, 2006; Tamborini *et al*., 2012). En Brasil correspondió al 78,6% en muestras de pacientes menores de 5 años cifra similar a la encontrada en Chile 83% en muestras de pacientes menores de 14 años (Rivera *et al*. 2011; Silva *et al*. 2011). En cuanto a los países desarrollados en Estados Unidos se reportan cifras elevadas 88% para esta especie (FDA, 2012).

C. jejuni muestra cifras elevadas de aislamiento en muestras de animales que están en contacto directo con las personas, en Argentina se aisló esta especie con una prevalencia del 91,7% de muestras de animales (perros, gatos y pollos) que mantuvieron contacto directo con personas que dieron positivas para la infección con *Campylobacter* (Tamborini *et al*., 2012). Los animales de compañía representan un alto riesgo de contagio especialmente en países en vías de desarrollo como el nuestro.

La infección por *C. jejuni* es directa teniendo como reservorio animales de elevado consumo por el ser humano, en bovinos se aisló en un 10,7%, la carne de ave también es una potencial fuente de infección encontrándose en un 40% en patos y 14% en pavos (Fernández, Vera, & Villanueva, 2007); en Chile se aisló *C. jejuni* en un 87% en aves destinadas al consumo (Rivera *et al*., 2011). La elevada presencia de *C. jejuni* en humanos podría estar directamente relacionada con la gran fuente de reservorios que mantiene esta especie, ya que coloniza con alta prevalencia a las aves de corral suponiendo un alto riesgo para los consumidores de esta carne; la contaminación cruzada por contacto con utensilios contaminados o por el consumo de alimentos contaminados es importante en la adquisición de la infección.

Tabla 6. Determinación de especies termotolerantes de *Campylobacter*.

Especie	Número de muestras	Porcentaje
C. jejuni	11	91,7%
C. coli	1	8,3%
C. lari	0	0%
C. upsaliensis	0	0%
TOTAL	12	100%

Fuente: La autora

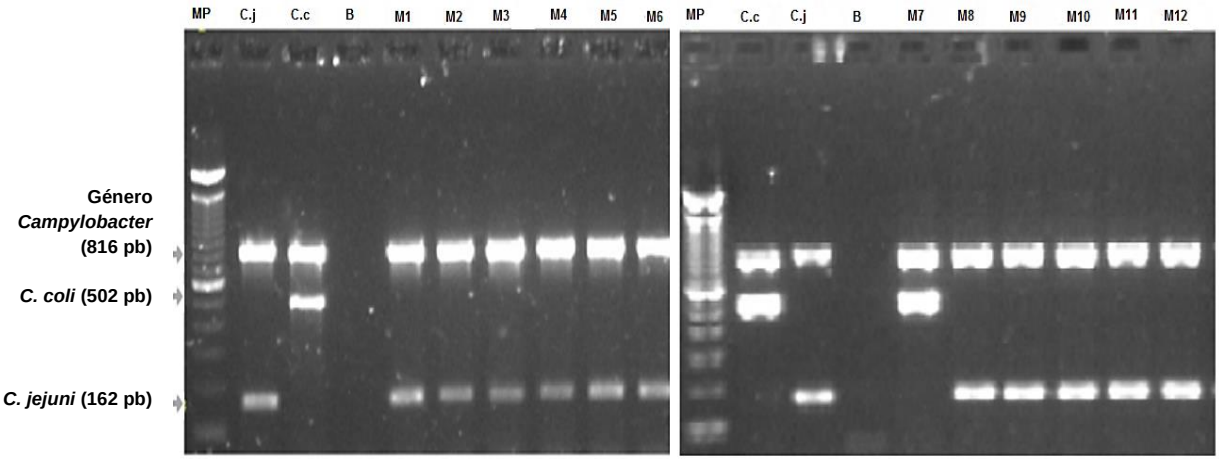


Figura 5. Especies termotolerantes de Campylobacter.
Fuente: La autora.

Otra de las especies aisladas fue *C. coli* que en el presente estudio evidencio un aislamiento de 8,3%(1) cifra baja en comparación con el 33,3% reportado en dos comunidades ecuatorianas (Vasco *et al*. 2014). Datos similares se encuentran en Chile donde se reportó

una prevalencia de 8,6% en muestras de pacientes menores de 5 años y en Estados Unidos se reporta 9% (Jara, 2006). Otros porcentajes similares son los encontramos en Argentina donde se reportó un aislamiento de 4% para *C. coli* en muestras de pacientes menores de 10 años y en Chile 1,9% en muestras de pacientes menores de 5 años (Fernández *et al*. 2008;Tamborini *et al*., 2012). Por su parte en otros países se reportan cifras superiores pero se mantienen bajos con respecto a *C. jejuni*. En Brasil se aisló *C. coli* en un 21,4% de muestras de pacientes menores de 5 años, mientras en Chile se encontró en muestras de pacientes menores de 14 años una prevalencia de 17% (Rivera *et al*., 2011; Silva *et al*. 2011).

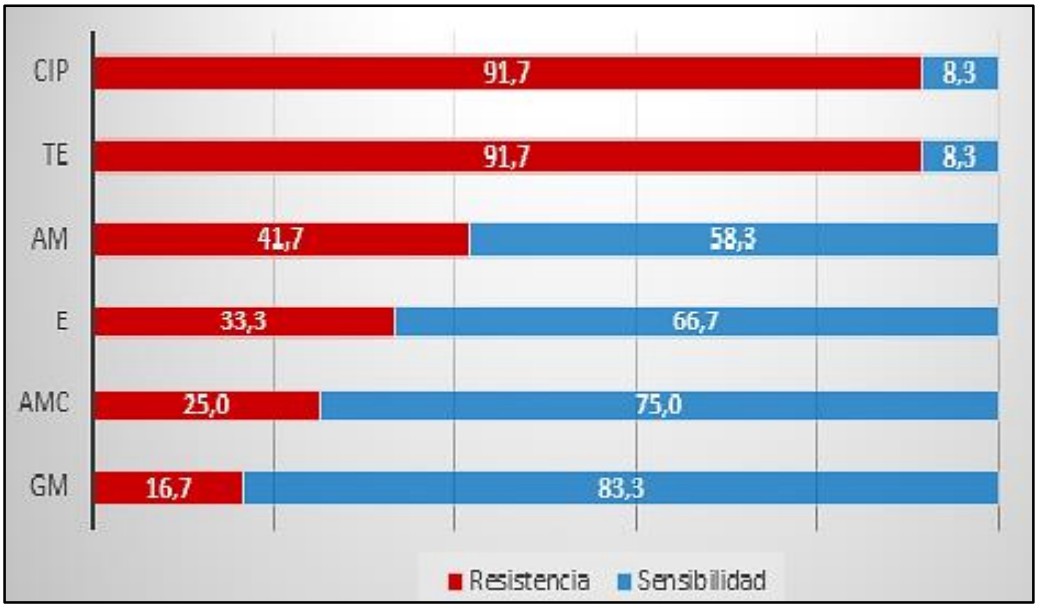
C. coli muestra un patrón bajo de aislamiento en animales en comparación con la especie predominante *C. jejuni*. En Argentina en muestras de perros, gatos y pollos se obtuvo un porcentaje de aislamiento de 8,3% (Tamborini *et al*., 2012). En Chile se aisló *C. coli* en un 23% en aves de corral destinadas al consumo (Rivera *et al*., 2011). En cuanto a otros animales cuya carne es de consumo habitual, en ganado bovino se aisló esta especie en un 3,6% (Fernández *et al*., 2007). La presencia de *C. coli* en animales de compañía representa un peligro de contagio por el contacto directo con las personas y la presencia de esta especie en carne destinada para el consumo se refleja en los casos positivos en muestras humanas.

C. lari no registró datos en el presente estudio esto difiere con lo reportado en Chile 3,7% en pacientes que presentaban desnutrición lo que posiblemente los vuelva proclives a adquirir infección (Fernández *et al*. 2008). *C. lari* indica una baja frecuencia de aislamiento en animales, en perros se aisló en un 1,7%, en pelícanos 15%, en gorriones 5% mientras en ganado bovino y gallinas no se aisló esta especie (Fernández *et al*., 2007). *C. lari* originalmente se aisló de heces de gaviotas ubicando a estas y otras aves costeras como la principal fuente de infección, también se ha aislado de mariscos (Matsubara *et al*., 2015). Al estar situado nuestro estudio en un área lejana a la costa la ausencia de estas fuentes de infección reduce considerablemente la posibilidad de la presencia *C. lari.*

C. upsaliensis es otra de las especies que no registró datos mientras en Chile se reporta un aislamiento de 7,9% en niños que presentaban malnutrición pudiendo relacionar estos casos positivos a un posible sistema inmunológico comprometido (Fernández *et al*. 2008). El aislamiento también es bajo en animales, en perros de 6,7%, en pelícanos y gorriones 3,3%, en gallinas 1,7% (Fernández *et al*., 2007). La baja prevalencia de *C. upsaliensis* en animales está estrechamente relacionada con su bajo aislamiento en muestras clínicas, además al aislarse esta especie en animales de compañía determina que la infección sea indirecta y por lo tanto menos frecuente.

A más de la determinación de la prevalencia de *Campylobacter* es importante reconocer la problemática que actualmente se está enfrentando por el uso indiscriminado de antibióticos

en la población humana, así como el uso de antibióticos para profilaxis y tratamiento en la cría de animales que ha llevado a un aumento en las infecciones por *Campylobacter* resistentes a los antibióticos (Iovine, 2013); tomando esto en consideración en el presente estudio se ha evaluado la actividad antimicrobiana de los principales antibióticos usados para tratar infecciones gastrointestinales de origen bacteriano **(Figura 8)**.



CIP= Ciprofloxacina; TE= Tetraciclin; AM= Ampicilina; E= Eritromicina; AmC= Amoxicilina/ Acido Clavulánico; GM= Gentamicina

Figura 6. Susceptibilidad antimicrobiana de *Campylobacter*.
Fuente: La autora.

En el análisis de la actividad antimicrobiana frente a *Campylobacter* se evidenció una resistencia de 91,67% para ciprofloxacina; en Chile se determinó una resistencia 60% y en Paraguay 49% (Orrego *et al*., 2014; González, Cordero, García, & Figueroa, 2013). La alta resistencia a estos antibióticos podría deberse a que *Campylobacter* no posee uno de los sitios blanco de acción topoisomerasa IV debido a una mutación puntual, también debemos tomar en cuenta que las fluoroquinolonas como ciprofloxacina son los antibióticos más utilizados para tratar la diarrea bacteriana aguda, aunque los macrólidos son el fármaco de elección para tratar la campilobacteriosis. Lamentablemente la campilobacteriosis es clínicamente indistinguible de otras causas de enfermedad diarreica bacteriana, y así, sin epidemiología de infección por *Campylobacter* muchos casos son tratados empíricamente con lo que incrementa la resistencia a FQ (Iovine, 2013).

La resistencia a tetraciclina fue de 91,67% concordante con otros datos reportados 82,8% y 63,42% (Luangtongkum *et al*. 2007; Senok *et al*. 2007); la elevada resistencia a estos antibióticos podría relacionarse a su amplio uso en la profilaxis y tratamiento en la crianza de animales destinados al consumo (Senok *et al*., 2007).

Ampicilina muestra una resistencia creciente 41,67% similar a los datos reportados en otros estudios 32% y 32,6% (Tamborini *et al*. 2012; Senok *et al*. 2007). Por su parte la eritromicina macrólido de elección para el tratamiento de campilobacteriosis muestra una resistencia de 33,33% siendo inferior al porcentaje reportado en otra investigación 61,4% (Brunton *et al*., 2012; Orieta, 2009).

Gentamicina y el fármaco combinado amoxicilina/ácido clavulánico son los antibiótico frente a los cuales *Campylobacter* presentó mayor susceptibilidad 83,3% y 75% respectivamente, esto concuerda con estudios que señalan una efectividad del 100%, convirtiéndolos hasta el momento en los fármacos de elección para el tratamiento de la campilobacteriosis (Orieta, 2009). Sin embargo *Campylobacter* ya muestra una creciente resistencia a estos fármacos en comparación con el estudio antes citado, lo que hace un llamado de atención a los profesionales en salud frente al uso inadecuado de antibióticos.

La resistencia a antimicrobianos en nuestra localidad son concordantes a los encontrados en países vecinos probablemente relacionado con un uso indiscriminado e incorrecto de los mismos, donde se encuentra una creciente resistencia frente a quinolonas y tetraciclina dejando estos antimicrobianos ineficaces para el tratamiento de campilobacteriosis, siendo preocupante también el aumento gradual de resistencia que muestran los demás antibióticos usados, planteando la necesidad de fortalecer la vigilancia epidemiológica, el control de susceptibilidad antimicrobiana de *Campylobacter* spp. y establecer un adecuado uso de los antimicrobianos tanto en su aplicación veterinaria como clínica.

CONCLUSIONES

- De las 176 muestras analizadas el 6,8%(12) resultaron positivas para el género *Campylobacter.*
- De las especies termotolerantes aisladas el 91,7%(11) corresponde a *C. jejuni* y el 8,3%(1) restante son *C. coli,* mientras *C. lari* y *C.upsaliensis* no registraron aislamientos.
- Al analizar la actividad antimicrobiana frente a las cepas aisladas se estableció que *Campylobacter* presenta una resistencia de 91,7% para ciprofloxacina y tetraciclina, y una sensibilidad de 83,3% para gentamicina y 75% para amoxicilina/ácido clavulánico.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda trabajar con centros de salud que se encuentren en áreas periurbanas donde acudan pacientes únicamente del sector para que sea posible establecer una historia clínica y un levantamiento antropológico de la información para conocer las condiciones higiénico sanitarias de los domicilios de los pacientes y relacionarlas como posibles causales de transmisión.
- Establecer la prevalencia de especies termotolerantes de *Campylobacter* en animales cuya carne sea destinada para el consumo y en animales de compañía para identificar fuentes reservorios como potenciales focos de infección.
- Realizar estudios de actividad antimicrobiana frente a cepas de *Campylobacter* aisladas en muestras humanas, de aves y animales para determinar los antibióticos de elección en el tratamiento clínico y los posibles puntos de adquisición de la resistencia.

BIBLIOGRAFÍA

Acha, P., & Szyfres, B. (2001). Bacteriosis y micosis. In *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales.* (3rd ed., pp. 266–283). USA: OPS.

Altekruse, S. F., & Tollefson, L. K. (2003). Human campylobacteriosis: a challenge for the veterinary profession. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *223*(4), 445–452.

Arturo, V., & Silva, F. (2007). *Estudio para la implementación del análisis de Campylobacter spp según la metodología USDA/FSIS MLG en el laboratorio de Labser de Rancagua Chile*. *Facultad de Ciencias*. Pontificia Universidad Javeriana, Chile.

Bhan, M., Mahalanabis, D., Pierce, N., Rollin, N., Natal, K., Sack, D., & Santosham, M. (2008). *Tratamiento de la Diarrea: Manual Clínico para los Servicios de Salud.*

Briand, S. ., Escalante, S., & Martine, L. (1994). *Proyecto Franco- Ecuatoriano para el Control de las Enfermedades Diarreicas y Cólera.* Quito_Ecuador.

Brunton, L., Chabner, B., & Knollman, B. (2012). *Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de las Terapéutica* (12th ed.). México: McGrawHill.

Butzler, J. (2004). Campylobacter, from obscurity to celebrity. *Clinical Microbiology and Infection*, *10*, 868– 876.

CA-SFM/EUCAS. (2014). *Determinación de la sensibilidad de antibioticos*.

CDC. (2012). Campylobacteriosis. Retrieved June 10, 2015, from http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter/

Cervantes, E., & Cravioto, A. (2007). Campylobacter y enfermedades asociadas. *Revista de Faculdad de Medicina UNAM*, *50*(1), 31–35.

Chaban, B., Ngeleka, M., & Hill, J. E. (2010). Detection and quantification of 14 Campylobacter species in pet dogs reveals an increase in species richness in feces of diarrheic animals. *BMC Microbiology*, *10*, 73.

Chanqueo, L., García, P., León, E., & Blu, A. (2005). Evaluación de la Tinción de Hucker para la búsqueda de Campylobacter sp en el estudio de un síndrome diarreico agudo. *Revista Chilena de Infectología*, *22*, 242–246.

Collado, L., Gutiérrez, M., González, M., & Fernández, H. (2013). Assessment of the prevalence and diversity of emergent campylobacteria in human stool samples using a combination of traditional and molecular methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *75*(4), 434–436.

Dasti, J., Tareen, A., Lugert, R., Zautner, A., & Gross, U. (2010). Campylobacter jejuni: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *International Journal of Medical Microbiology*, *300*, 205–211.

Farance, M., & Viñas, M. (2007). *Manual de Procedimientos para el Aislamiento y Caracterización de Campylobacter spp.* Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv Para América del Sur .

FDA. (2012). *Natinal Antimicrobial Resistance Monitoring System*. *Department of Health and Human Services.* USA.

Fernández, H. (2008). Género Campylobacter: un grupo de bacterias de importancia en Salud Pública. *Temas de Zoonosis*, *4*, 205–214.

Fernández, H., Vera, F., & Villanueva, M. (2007). Especies de Arcobacter y Campylobacter en aves y mamíferos del sur de Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*, *39*(2), 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*, *39*(1), 56–58.

Galkin, V., Yu, X., Bielnicki, J., Heuser, J., Ewing, C., Guerry, P., & Egelman, E. (2008). Divergence of quaternary structures among bacterial flagellar filaments. *Science*, *320*(5874), 382–385.

Garcés, F., Klotz, B., Mantilla, J., Román., R., & Romero, J. (2013). *Perfil de riesgo de Campylobacter spp. en pollo de engorde.* (1st ed.). Bogotá.: Instituto Nacional de Salud. Redes en Salud Pública.

García, F., Pérez, I., & Echeita, A. (2006). Campilobacteriosis: Aspectos clínicos y epidemiológicos. Programas de seguimiento y control. *Pofesión Veterinaria*, *16*(64), 66–74.

García, G., & Cacho, D. (2005). Síndrome de Guillain-Barré(SGB). Diagnóstico diferencial. *Revista Mexicana de Neurociencia*, *6*, 448–454.

Godschalk, P. C., Heikema, A. P., Gilbert, M., Komagamine, T., Ang, C. W., Glerum, J., … Endtz, H. P. (2004). The crucial role of Campylobacter jejuni genes in anti-ganglioside antibody induction in Guillain-Barre syndrome. *J Clin Invest*, *114*, 1659–1665.

González, G., Cordero, N., García, P., & Figueroa, G. (2013). Análisis molecular de la resistencia a fluoroquinolonas y macrólidos en aislados de. *Revista Chilena de Infectologia*, *30*(2), 135–139.

Guderian, R., Ordoñez, G., & Bossano, R. (1984). Diarrea aguda asociada a Campylobacter y otros agentes patógenos en Quito, Ecuador. *Bol of Sanit Panam*, *102*(4), 333–339.

Hickey, T., Baqar, S., Bourgeois, L., Ewing, C., & Guerry, P. (1999). Campylobacter jejuni-stimulated secretion of interleukin-8 by INT407 cells. *Infection and Immunity*, *67*(1), 88–93.

Iovine, N. (2013). Resistance mechanisms in Campylobacter jejuni. *Virulence*, *4*(3), 230–40.

Jara, M. (2006). *Especies del genero Campylobacter y del genero Arcobacter en muestras de deposiciones humanas y animales.* Universidad Austral de Chile.

Ketley, J., & Konkel, M. (2005). *Campylobacter: Molecular and Cellular Biology*. *Campylobacter infection.* (1st ed.). Great Britain.: Taylor & Francis.

Konkel, M., Monteville, M., Rivera, V., & Joens, L. (2001). The pathogenesis of Campylobacter jejuni-mediated enteritis. *Curr Issues Intest Microbiol*, *2*, 55–71.

Lapierre, L. (2013). Factores de Virulencia asociados a especies zoonóticas de Campylobacter spp. *Avances En Ciencias Veterinarias*, *28*, 25–30.

Leighton, M. ., Lam, C., Mehta, S., & Spiller, R. (2013). Efficacy and mode of action of mesalazine in the treatment of diarrhoea-predominant Eficay and mode of action of mesalazine in the treatment of diarrhoea predominant irritable bowel syndrome (IBS-D): study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*, *14*, 10.

Luangtongkum, T., Morishita, T., El-Tayeb, A., Ison, A., & Zhang, Q. (2007). Comparison of antimicrobial susceptibility testing of Campylobacter spp. by the agar dilution and the agar disk diffusion methods. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(2), 590–594.

Malbrán, C. (2001). *Manual de Procedimientos Campylobacter.* Buenos Aires.

Manrique, F., Tigne, D., Bello, S., & Ospina, J. (2006). Diarrhoea-causing agents in children aged less than five in Tunja, Colombia. *Revista de Salud Publica*, *8*(1), 88–97.

Matsubara, K., Nakajima, T., Moore, J., Millar, B., Murayama, T., & Matsuda, M. (2015). Molecular analysis of the tlyA gene in Campylobacter lari. *Folia Microbiologica*, 10.

Mella, S., Sepúlveda, M., González, G., Bello, H., Domínguez, M., Zemelman, R., & Ramírez, C. (2004). Aminoglucósidos-aminociclitoles: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Revista Chilena de Infectología*, *21*(4), 330–338.

Mota, M., Gadea, M., González, S., González, G., Pardo, L., Sirok, A., … Varela, G. (2010). Bacterial pathogens associated with bloody diarrhea in Uruguayan children. *Revista Argentina de Microbiologia*, *42*(2), 114–117.

Murray, C., Vos, T., Lozano, R., Naghavi, M., Flaxman, A., Michaud, C., … Des Jarlais, D. (2013). Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, *380*(9859), 2197–2223.

Nyati, K. ., & Nyati, R. (2013). Role of Campylobacter jejuni infection in the pathogenesis of Guillain-Barre syndrome: an update. *Biomed Res Int*, *2013*, 13.

Orieta, L. (2009). *Monitoreo de la resistencia bacteriana de Campylobacter spp, en 4 hospitales de Bolivia*. Universidad Mayor de San Andres.

Orrego, M., Weiler, N., Portillo, R., Lird, G., Acosta, L., Ortiz, F., … 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. *Pediatria*, *41*(2), 2012–2015.

Perales, M., Camiña, M., & Quiñones, C. (2002). Infección por Campylobacter y Shigella como causa de Diarrea Aguda Infecciosa en niños menores de dos años en el Distrito de la Victoria, Lima-Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Pública*, *19*(4), 186–192.

Prado, V., & O'Ryan, M. (1994). Acute gastroenteritis in Latin America. *Infectious Disease Clinics of North America*, *8*(1), 77–106.

Putten, J., Alphen, L., Wösten, M., & Zoete, M. (2009). Molecular mechanisms of Campylobacter infection. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 337, pp. 197–229).

Rivera, N., Bustos, R., Montenegro, S., Sandoval, M., Castillo, J., Fernández, H., … Quevedo, I. (2011). Genotipificación y resistencia antibacteriana de cepas de Campylobacter spp aisladas en niños y en aves de corral. *Revista Chilena de Infectologia*, *28*(6), 555–562.

Sangaré, L., Nikiéma, A., Zimmermann, S., Sanou, I., Congo-Ouédraogo, M., Diabaté, A., … Guissou, P. (2012). Campylobacter spp. Epidemiology and antimicrobial susceptibility in a developing country, Burkina Faso. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, *13*, 106–111.

Senok, A., Yousif, A., Mazi, W., Sharaf, E., Bindayna, K., Elnima el, A., & Botta, G. (2007). Pattern of antibiotic susceptibility in Campylobacter jejuni isolates of human and poultry origin. *Jpn J Infect Dis*, *60*, 1–4.

Silva, J., Nunes, I., Havt, A., Carvalho, E., Leal, N., Melo, A., … Moreira, A. (2011). Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in children from communities in Northeastern Brazil: molecular detection and relation to nutritional status. *Diagn Microbiol Infect Dist*, *76*(6), 1358–1375.

Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica*, *27*(2), 116–129.

Tamborini, A., Casanova, L., Viñas, M., Asato, V., Hoffer, A., Lucero, M., … 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*, *44*(4), 266–271.

Vasco, G., Trueba, G., Atherton, R., Calvopiña, M., Cevallos, W., Andrade, T., … Eisenberg, J. N. S. (2014). Identifying Etiological Agents Causing Diarrhea in Low Income Ecuadorian Communities. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *91*(3), 563–569.

WHO. (2011). Campylobacter. Retrieved from http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/

WHO. (2012). *The global view of campylobacteriosis* (1st ed.). Netherlands.

Wieczorek, K., & Osek, J. (2013). Antimicrobial Resistance Mechanisms among Campylobacter. *Hindawi Publishing Corporation*, *2013*, 12.

Yamazaki, W., Taguchi, M., Seto, K., Kawahara, R., Kawatsu, K., Kumeda, Y., … Tsukamoto, T. (2007). Development of a multiplex PCR assay for identification of Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter hyointestinalis subsp. hyointestinalis, Campylobacter jejuni, Campylobacter lari and Campylobacter upsaliensis. *Journal of Medical Microbiology*, *56*(11), 1467–1473.

Zamudio, M., & Fernández, H. (2003). *Campylobacter y Helicobacter*. Perú.

ANEXOS

PROTOCOLOS

Anexo 1: Tinción de Hucker

1. Realizar un frotis con la muestra de materia fecal (en el caso de un cultivo colocar las colonias presuntivas) sobre un portaobjetos y fijar.
2. Colocar una gota de violeta para reactivo de Hucker y una gota de bicarbonato de sodio al 1% por 2 minutos.
3. Lavar con agua corriente y dejar secar.
4. Observar a 100X en microscopio óptico de campo claro.

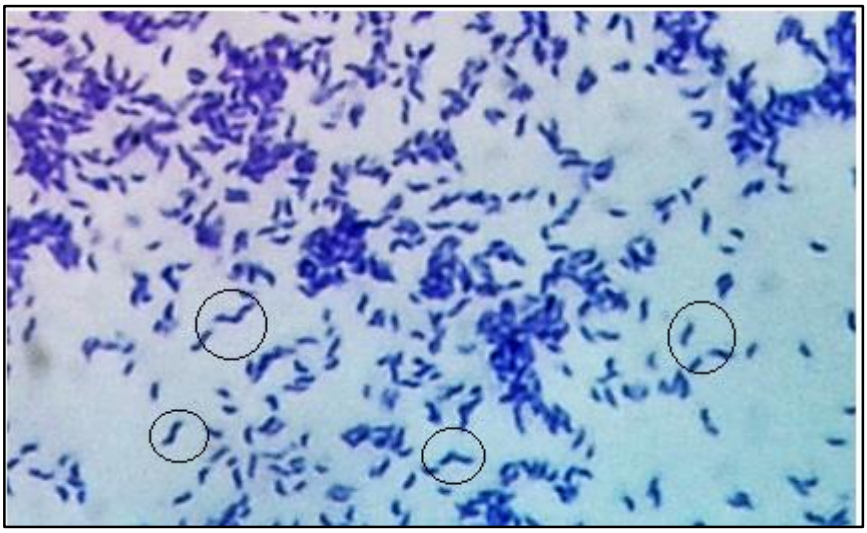


Figura 7. *Campylobacter* spp aislado de muestras fecales.
Fuente: La autora.

Anexo 2: Preparación de medio de cultivo Butzler.

1. Pesar 20g de Agar Sangre Base N°2 de Oxoid y 2.5g de Extracto de Levadura de Oxoid, colocar en un frasco estéril de 1000ml.
2. Adicionar 470 ml de agua destilada.
3. Ajustar a pH 7.
4. Esterilizar en autoclave mediante calor húmedo a 121°C y 1 atmósfera de presión por 20 minutos.
5. Adicionar 5ml de agua estéril para inyección al vial que contiene *Campylobacter* Selective Supplement Butzler y homogenizar.
6. Adicionar el contenido del vial al medio cultivo cuando éste se encuentre a 50 °C.
7. Agregar 25 ml de sangre al medio de cultivo y homogenizar.
8. Dispensar en las cajas Petri de 94x16mm, esperar que el medio polimerice y guardar a 4°C hasta su uso.

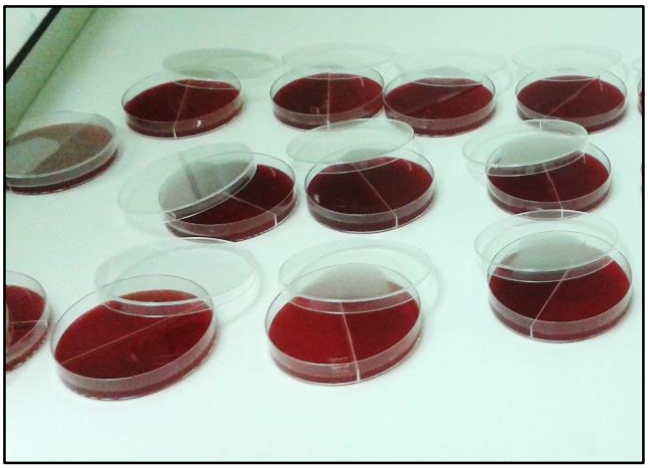


Figura 8. Medio selectivo Butzler.
Fuente: La Autora.

Anexo 3: Aislamiento de *Campylobacter* spp.

1. Inocular la muestra fresca en un extremo de la caja petri que contiene medio selectivo Butzler.
2. Diseminar la muestra mediante estriado por agotamiento.
3. Incubar las cajas de forma invertida por 48 horas a 42°C en jarras de anaerobiosis bajo una atmósfera de microaerofilia obtenida mediante el uso de sobres CampyGen™ 2.5L de Oxoid que brinda un nivel de CO^2 de 9 a 13%.
4. Pasadas las 48 horas se realiza tinción de Hucker para identificar las colonias sospechosas.

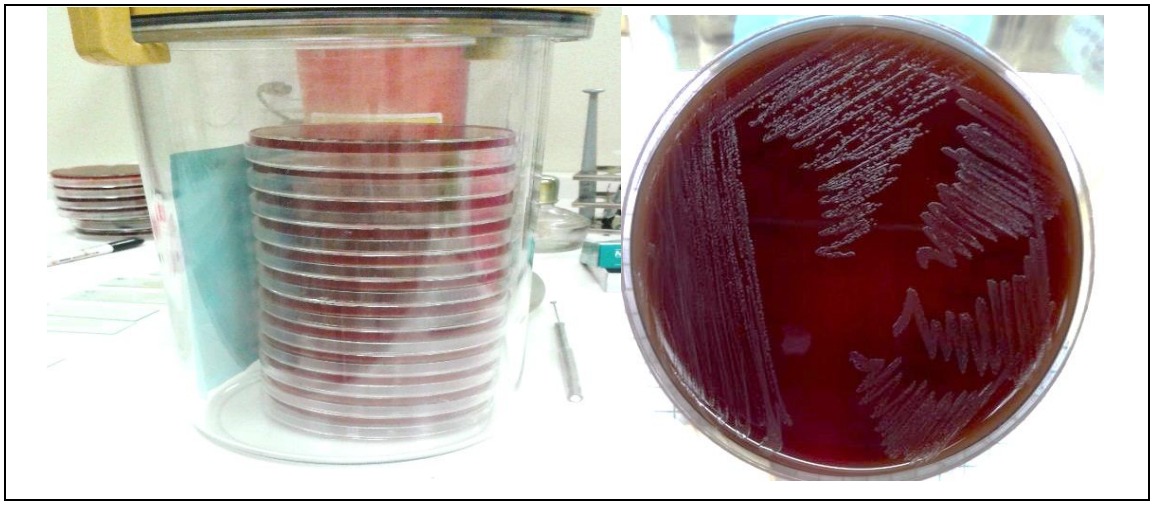


Figura 9. Aislamiento de especies termotolerantes de *Campylobacter*.
Fuente: La autora

Anexo 4: Filtración para eliminar flora acompañante

Nota: Este procedimiento se realiza cuando al microscopio se observa un cultivo contaminado por otro tipo de bacterias como cocos o bacilos.

1. Tomar un inóculo considerable del cultivo a filtrar.
2. Colocar el inóculo en 1ml de agua destilada y dar vórtex.
3. Colocar un filtro Millipore de 47mm con poros de 0.45 µm en medio Agar sangre sin antibióticos
4. Tomar 200 µl de la solución y colocar sobre el filtro.
5. Esperar 30 minutos aproximadamente para que la solución atraviese el filtro.
6. Una vez que el filtro este seco, retirarlo y eliminarlo
7. Llevar a incubación por 48 horas a 42 °C en un ambiente de microaerofilia.

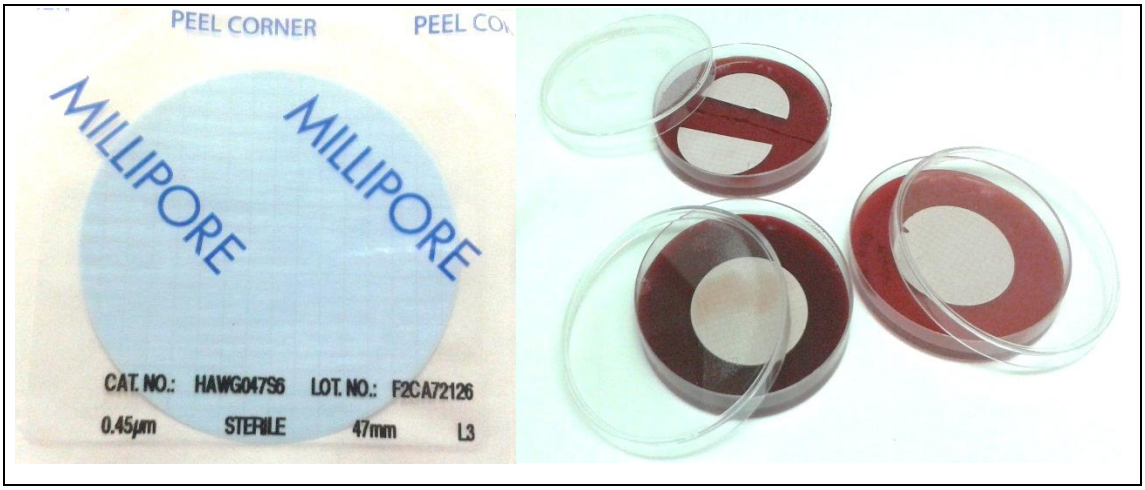


Figura 10. Filtración para aislamiento de *Campylobacter* spp.
Fuente: La autora

Anexo 5: Crioconservación de cepas aisladas

1. Tomar las colonias de un cultivo fresco puro.
2. Inocular asépticamente dentro del fluido crioconservante de criotubos con perlas porosas de Microbank ™.
3. Invertir 4 veces manualmente para homogenizar.
4. Dejar los tubos invertidos por 20 minutos.
5. Eliminar el exceso de crioconservante por aspirado con una pipeta.
6. Almacenar los criotubos a -70ºC.

Figura 11. Crioconservación de *Campylobacter*.
Fuente: La autora.

Anexo 6: Pruebas complementarias para identificación de *Campylobacter*.

A. Hidrólisis del hipurato.

1. Adicionar un inóculo de un cultivo freso en un tubo con 400µl de solución de hipurato de sodio al 1%.
2. Incubar a 37°C por 2 horas
3. Agregar 200 µl de solución de ninhidrina, reposar por 10 minutos
4. Interpretación:

   Positivo: coloración azul-purpura (**Figura 12**).

   Negativo: ausencia de la coloración.

B. Catalasa.

1. Colocar con un palillo colonias puras de un cultivo fresco en un portaobjeto

2. Agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 3%

3. Interpretar:

Positivo: formación de burbujas.

Negativo: ausencia de burbujas.

C. Oxidasa

1. Tomar con un palillo un inóculo de colonias puras.

2. Colocar el inóculo en tiras Oxistrip de Hardy Diagnostics.

3. Interpretar:

Positivo: coloración violeta a los 10 - 30 segundos.

Negativo: ausencia de color.

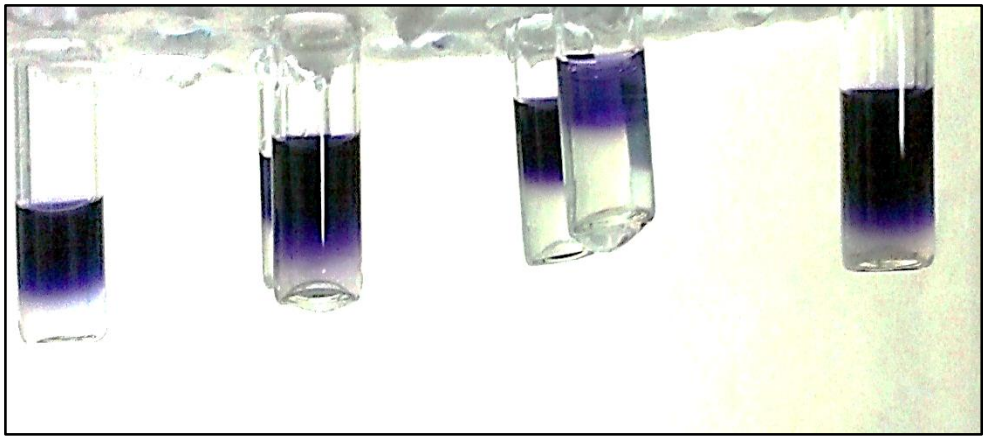


Figura 12. Muestras positivas para prueba de hidrólisis de hipurato
Fuente: La autora

Anexo 7: Determinación de actividad antimicrobiana.

1. Colocar colonias de cultivo puro en 4ml solución fisiológica hasta alcanzar una turbidez equivalente a 0.5 en la escala de McFarlan.
2. Llevar a vortex para homogenizar.
3. Sembrar mediante hisopado continuo en Medio de cultivo Agar Muller Hilton de la casa comercial Difco™ Laboratories, enriquecido con 5% de sangre a un pH 7.
4. Colocar los discos de sensibilidad a una distancia de 30 mm e incubar a 42° C por 48 horas en una atmósfera de microaerofilia.

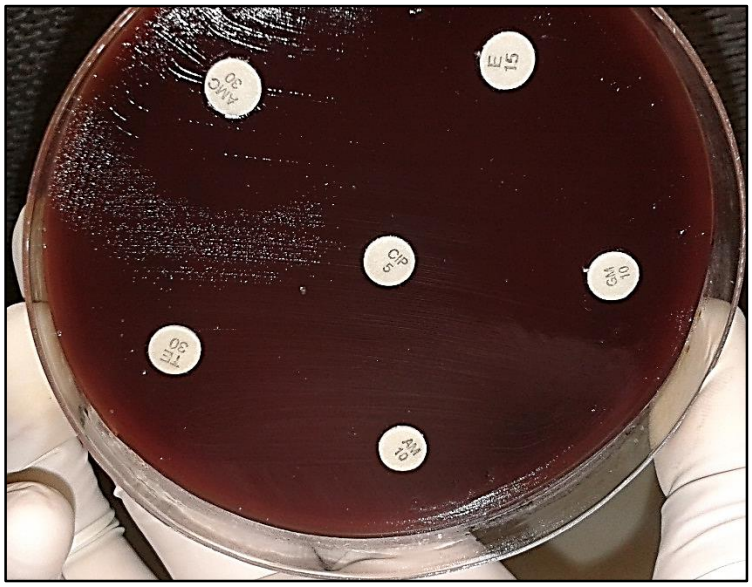


Figura 13. Prueba de susceptibilidad para *Campylobacter.*
Fuente: La autora.

Anexo 8: Extracción de ADN de células bacterianas.

1. Preparación de la muestra.

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

2. Añadir 25 µl de OB Proteasa Solution, dar vortex para mezclar.

3. Añadir 220 µl de BL Buffer.

4. Incubar a 70°C durante 10 minutos, dar vortex durante la incubación.

5. Añadir 220 µl de etanol al 100%, dar vórtex para mezclar.

6. Insertar una mini columna (HiBind® DNA Mini Column) en un tubo de recogida de 2 ml.

7. Transferir toda la muestra a partir del paso 5 a la columna HiBind® DNAMini incluyendo cualquier precipitado que pueda haberse formado (utilizar una pipeta).

8. Centrifugar a velocidad máxima durante 1 minuto.

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

10. Añadir 500 µl de HBC Buffer.

11. Centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos.

12. Descartar el tubo de recogida.

13. Colocar la columna en un nuevo tubo de 2 ml.

14. Añadir 700 µl de ADN Wash Buffer.

15. Centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos.

16. Descartar el filtrado y reutilizar el tubo de recogida.

17. Repetir los pasos 14 a 16 para una segunda etapa de lavado con ADN Tampón de lavado.

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

19. Transferir la columna en un tubo de 1,5 ml libre de nucleasas.

20. Añadir 100-200 µL del tampón de elución caliente a 70°C.

21. Dejar reposar a temperatura ambiente 2 min.

22. Centrifugar a la velocidad máxima durante 1 minuto.

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

Anexo 9: PCR - Multiplex para identificación de *Campylobacter.*

Tabla 7. Matriz para PCR – Multiplex			
	Componentes	**Concentración final**	**Volumen µl**
	Buffer	1x	5,00
	DNTPs	200µM	0,50
	Cl2Mg	1,5µM	1,50
	Primers:		
Genero Campylobacter	C412F	0,2µM	0,05
	C1228R	0,2µM	0,05
C. jejuni subs. Jejuni	C-1	0,2µM	0,05
	C-3	0,2µM	0,05
C. coli	CC18F	0,2µM	0,05
	CC519R	0,2µM	0,05
C. upsaliensis	CU61F	0,2µM	0,05
	CU146R	0,2µM	0,05
C. fetus	MG3F	0,2µM	0,05
	CF359R	0,2µM	0,05
C. lari	CLF	0,2µM	0,05
	CLR	0,2µM	0,05
C. hyointestinales subs. Hyointestinales	HYO1F	0,2µM	0,05
	HYOFET235R	0,2µM	0,05
	Taq 5U/µl	1.25U	0,125
	H2O		16,17
	DNA		1,00
	Volumen final		**25,00**

Etapas	**Temperatura(°C)**	**Tiempo (min)**	**N° ciclos**
Desnaturalización inicial	95	15	
Desnaturalización	95	0,5	35
Anillamiento	58	1,5	
Extensión	72	1	
Extensión final	72	7	

Anexo 10: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (35ml).

1. Pesar 0.525g de Agarosa UltraPure™ de Invitrogen y colocar en un vaso de precipitación de 50ml.
2. Adicionar 35ml de buffer TBE 1X.
3. Disolver calentando la solución y evitar la formación de burbujas y evaporación de la solución.
4. Adicionar 3µl de SYBR safe DNA de Invitrogen™.
5. Poner la solución en la bandeja para electroforesis.
6. Colocar las peinetas para la formación de los pocillos.
7. Una vez formado el gel retirar las peinetas.
8. Colocar la bandeja con el gel en la cubeta para electroforesis horizontal Enduro™.
9. Llenar la cubeta hasta cubrir completamente el gel con buffer TBE 1X.
10. Adicionar el marcador de peso molecular, los controles positivos *C. coli y C. jejuni*, el blanco y las muestras a analizar.
11. Una vez terminada la carga de las muestras cubrir la cubeta conectando a la fuente de poder Enduro™ marca Labnet y correr las muestras por 45 minutos a 28Volt y 300 mA.
12. Revelar el gel mediante luz UV 300 nm en el Transiluminador UV Labnet**.**

Figura 14. Electroforesis en gel de Agarosa
Fuente: La autora.