



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 Regional Isidro Ayora, durante el periodo Septiembre - Diciembre 2014.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Cuenca Macas, Johnson Patricio

DIRECTOR: Simaluiza Masabanda, Rosa Janneth, Mgtr

LOJA – ECUADOR

2015

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magíster.

Rosa Janneth Simaluiza Masabanda.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo 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 Regional Isidro Ayora, durante el periodo Septiembre - Diciembre 2014”** realizado por: Cuenca Macas Johnson Patricio, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Octubre de 2015

f).

Mgtr. Rosa Janneth Simaluiza Masabanda.

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Cuenca Macas Johnson Patricio declaro ser autor del presente trabajo 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 Regional Isidro Ayora, durante el periodo Septiembre - Diciembre 2014”**, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo la Mgtr. Rosa Janneth Simaluiza Masabanda directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y 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 con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f).....

Autor: Cuenca Macas Johnson Patricio

Cédula: 1104368293

DEDICATORIA

A Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme brindado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mis padres: Fidel y Laura, que me dieron la vida y me han brindado su apoyo incondicional, sus consejos, su amor y confianza en todo momento.

A mis hermanos: Ángel, Luz y Nelly quienes con sus palabras de aliento supieron ayudarme a continuar en la constante lucha por alcanzar mis sueños, por su gran ejemplo de perseverancia y sobre todo por el gran cariño que me comparten.

A mis sobrinos queridos, quienes se han convertido en mi motivación más grande, gracias por todo su amor.

A toda mi familia que día a día supieron brindarme su ayuda directa e indirectamente durante el desarrollo de esta tesis.

A mis amigos con quienes hemos compartido grandes logros y pequeñas derrotas, recuerden que los estimo bastante.

AGRADECIMIENTO

Primeramente agradecer a Dios por permitirme culminar esta etapa de mi vida, lleno de salud y junto a mis seres queridos.

Un sincero agradecimiento a la Universidad Técnica Particular de Loja, institución que me permitió hacer realidad mi sueño de obtener mi título de tercer nivel.

A mis padres por estar presentes no solo en esta etapa tan importante de mi vida, sino por brindarme todo su amor en todo momento.

A mis hermanos Ángel, Luz y Nelly, por brindarme todo su apoyo.

Al Dr. Heriberto Fernández y a mi directora de tesis Mgtr. Janneth Simaluiza, por toda la atención prestada y sobre todo por compartir su paciencia y saberme guiar durante el desarrollo de esta investigación.

A la Bq.F. Zorayda y Sofía por toda su ayuda brindada, por sus consejos y enseñanzas.

Un fraterno agradecimiento a todos los maestros quienes durante todo este tiempo compartieron sus enseñanzas.

A mis grandes amigos Iliana, Lizeth, Yadira, Jonathan, Wilson, Eduardo, Pablo con quienes hemos compartido tantas alegrías.

A todos quienes conformamos el grupo de trabajo Vanessa, Iliana, Andrea, quienes con su ayuda desinteresada contribuyeron al desarrollo de este trabajo investigativo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA.....	i
APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO 1	5
MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 Antecedentes.....	6
1.2 Enfermedades diarreicas.....	6
1.2.1 Diarrea.....	6
1.3 Tipos de diarrea.....	6
1.3.1 Diarrea aguda.....	6
1.3.2 Diarrea crónica.....	7
1.3.2.1 <i>Diarrea secretora</i>	7
1.4 Bacterias	7
1.4.1 Infección bacteriana.....	8
1.5 <i>Campylobacter spp</i>	8
1.5.1 Reservorios de <i>Campylobacter spp</i>	9
1.5.2 Factores de virulencia.....	9
1.5.3 Motilidad.....	9
1.5.4 Quimiotaxis.....	10
1.5.5 Adhesión.....	10
1.5.6 Invasión.....	10
1.5.7 Producción de toxinas.....	10
1.5.8 Estructuras de carbohidratos.....	11
1.5.9 Infección.....	11
1.5.10 Sintomatología.....	11

1.6	Diagnóstico de <i>Campylobacter</i> spp	11
1.6.1	Recolección y transporte de la muestra.....	11
1.6.2	Microscopía.....	12
1.6.3	Cultivos.....	12
1.6.4	Medios selectivos para aislamiento de <i>Campylobacter</i> spp.....	12
1.6.5	Identificación fenotípica.....	13
1.6.6	Identificación molecular.....	13
1.7	Tratamiento	14
1.7.1	Fluoroquinolonas.....	14
1.7.2	Macrólidos y cetólidos.....	14
1.8	Resistencia bacteriana	14
1.8.1	Resistencia bacteriana en campylobacteriosis.....	15
1.8.2	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>jejuni</i>	15
1.8.3	<i>Campylobacter coli</i>	17
1.8.4	<i>Campylobacter lari</i>	17
1.8.5	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	17
CAPÍTULO 2	18
MATERIALES Y MÉTODOS	18
2.1	Metodología.....	19
2.2	Identificación fenotípica de <i>Campylobacter</i> spp.....	19
2.2.1	Crecimiento bacteriano.....	19
2.2.2	Identificación bioquímica de <i>Campylobacter</i> spp.....	19
2.2.3	Cultivo por filtración pasiva.....	19
2.3	Crioconservación de muestras positivas.....	19
2.4	Identificación molecular de <i>Campylobacter</i> spp.....	19
2.5	Resistencia bacteriana	21
CAPÍTULO 3	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	28
RECOMENDACIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	30
ANEXOS	37
	ANEXO 1. PREPARACIÓN DE MEDIO SÓLIDO SELECTIVO BUTZLER.....	38
	PROCESO PARA MEDIR PH DE MEDIOS DE CULTIVOS.....	38
	RECONSTITUCIÓN DEL ANTIBIÓTICO.....	39
	DISPENSACIÓN DEL MEDIO.....	40

ANEXO 2. TINCIÓN GRAM.....	40
ANEXO 3. TINCIÓN VAGÓ.....	41
ANEXO 4. TINCIÓN DE HUCKER.	42
ANEXO 6. FILTRADO.....	43
ANEXO 7. CRIOCONSERVACIÓN.....	44
ANEXO 8. PREPARACIÓN DE HIPURATO DE SODIO.....	45
ANEXO 9. PREPARACIÓN DE NINHIDRINA	45
ANEXO 10. EXTRACCIÓN DE DNA.....	45
ANEXO 11. CONDICIONES DE MULTIPLEX-PCR.....	47
ANEXO 12. PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA.....	48
ANEXO 13. PREPARACIÓN EDTA (Ácido etildiaminotetraacético).	49
ANEXO 14. PREPARACIÓN DE BUFFER TBE 10X (Tris, Borato y EDTA)	49
ANEXO 15. ANTIBIOGRAMA.....	50
ANEXO 16. PREPARACIÓN DE MEDIO MUELLER HINTON.	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de primers utilizados para la MULTIPLEX-PCR para identificación de especies de <i>Campylobacter</i> spp	20
Tabla 2. Identificación de <i>Campylobacter</i> spp, en muestras fecales de pacientes pediátricos.	23
Tabla 3. Prevalencia de especies termotolerantes de <i>Campylobacter</i>	23
Tabla 4. Susceptibilidad bacteriana de especies de <i>Campylobacter</i>	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Bacilos curvos con forma de gaviota referente a <i>Campylobacter</i>	12
Figura 2. Crecimiento de colonias puras de <i>Campylobacter</i>	13
Figura 3. MULTIPLEX-PCR, para determinación de <i>Campylobacter</i>	25
Figura 4. Susceptibilidad bacteriana en especies de <i>Campylobacter</i>	26

RESUMEN

Campylobacter, es uno de los principales agentes etiológicos de diarrea en el ser humano y una de las principales causas de infecciones zoonóticas entéricas. Ante la escasa presencia de datos a nivel de país sobre la incidencia de este agente etiológico, y dada su importancia clínica y socioeconómica, se vio la necesidad en el presente estudio de determinar la prevalencia de especies termotolerantes de *Campylobacter*. Se recolectaron 63 muestras fecales de niños con y sin diarrea del “Hospital Regional Isidro Ayora” obteniendo una prevalencia del 8% (5). Al determinar las especies, *C. jejuni subsp. jejuni* constituyó la especie con mayor aislamiento con un 60% (3) mientras que la asociación *C. jejuni subsp. jejuni* más *C. coli* correspondió al 40% (2). Para *C. coli*, *C. lari* y *C. upsaliensis* no se registraron datos.

Consecuentemente el presente estudio confiere datos relevantes sobre la presencia de *Campylobacter* en la localidad, y sirve como referencia para estudios posteriores, que permitan determinar la especie predominante en aves de corral o animales de compañía, y ser comparada con datos obtenidos en humanos.

PALABRAS CLAVES: *Campylobacter* spp. *C. jejuni subsp. jejuni*, *C. Coli*.

ABSTRACT

Campylobacter is one of the major etiologic agents of diarrhea in humans and a leading cause of enteric zoonotic infections; Given the paucity of data at the national level about the incidence this etiologic agent, and given its clinical and socioeconomic importance, was the need in the present study to determine the prevalence of thermotolerant species of *Campylobacter*. 63 fecal samples were collected from children with and without diarrhea at the "Hospital Regional Isidro Ayora" obtaining a prevalence of 8% (5). *C. jejuni subsp. jejuni* and *C. jejuni subsp. Coli* *C. jejuni* represented 60% and 40% of the isolated species, respectively. We did not observe *C. coli*, *C. lari* or *C. upsaliensis*.

Consequently, the present study gives relevant data on the presence of *Campylobacter* in the town and serves as a reference for further study, both to compare to data obtained in humans and to determine the primary *Campylobacter* species in poultry and pets.

Keywords: *Campylobacter* spp. *C. jejuni subsp. jejuni*, *C. Coli*.

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Campylobacter*, son bacilos gram negativos, que poseen una forma curva similar a alas de gaviota, son móviles por flagelación monótrica; monopolar o bipolar, con metabolismo de tipo respiratorio. No crecen en aerobiosis ni en anaerobiosis, siendo microaerófilos estrictos. Son oxidasa positiva y obtienen su energía de aminoácidos o intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico. Pertenece a la familia *Campylobacteraceae* del orden Campylobacterales, incluido en la clase Epsilonproteobacteria, phylum Proteobacteria (Lapierre, 2013). Actualmente comprende 25 especies, la mayoría de las cuales reconoce como reservorio natural a mamíferos y aves, tanto domésticos como de vida libre (Lynch *et al*, 2011).

En la actualidad se reconocen 4 especies patógenas para el ser humano: *C. jejuni ssp. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* y *C. upsaliensis* (Fernández, 2011). La infección por *Campylobacter* spp, es adquirida al consumir alimentos como carne mal cocida, mariscos, leche o agua contaminados; al tratarse de una zoonosis, las bacterias se encuentran ampliamente distribuidas en animales domésticos y silvestres. Las aves de corral son un importante reservorio y el contacto directo con mascotas portadoras sanas o con diarrea es responsable de más de la mitad de las infecciones en los países desarrollados (Spicer, 2009); lo que representa una infección que afecta a 400 millones de adultos y niños en todo el mundo (Man *et al*, 2010). El ingreso de *Campylobacter* spp al organismo humano puede darse a través de la piel, las mucosas de las vías respiratorias, por vía digestiva o urogenital, etc (Longo *et al*, 2012).

En países desarrollados son frecuentes los casos de infección por *Campylobacter* spp, afectando aproximadamente al 1% de los europeos (Humphrey *et al*, 2007), Australia ha reportado un estimado de 277.000 casos anualmente (Hall *et al*, 2005), Canadá ha adquirido un promedio de 39 casos por cada 100.000 habitantes en la última década (Arsenault *et al*, 2011) y Estados Unidos señala 13.000 hospitalizaciones y más de 100 muertes cada año (Silva *et al*, 2011).

Argentina muestra una incidencia para *Campylobacter* spp del 15,2% (Tamborini *et al*, 2012). También dos estudios en Bolivia presentan una tasa de incidencia con el 10% (Pinto D, 2004) y 14% (Sazetenea R, 2003), En Perú datos señalan una prevalencia de 9,13% (Hurtado *et al*, 2008). En Paraguay ocupa el tercer lugar como agente etiológico causante de diarrea aguda (Orrego *et al*, 2014), Los datos registrados en nuestro país con respecto a

Campylobacter spp, indican una prevalencia de 23% (Guderian *et al*, 1987) mientras que en un estudio realizado en Pichincha indica una prevalencia de 3,37% (Briand, Leyrit y Escalante, 1994). Un estudio más reciente desarrollado en las ciudades: Pichincha y Esmeraldas, señalan una incidencia de 8% y 1,3% respectivamente (Vasco *et al*, 2014).

Al ser considerado *Campylobacter* spp como el primer agente etiológico de diarrea en el ser humano en los países desarrollados y el segundo o tercero en los países en vías de desarrollo, debido a la falta de datos sobre su prevalencia a nivel local, al tratarse de un tema de salud pública desatendido y dada la importancia de esta patología en niños, en el presente estudio "Prevalencia de las especies termotolerantes de *Campylobacter* (*C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. coli*, *C. lari* y *C. upsaliensis*) en niños con y sin diarrea del Hospital Regional Isidro Ayora" se pretende conocer la realidad de la infección por *Campylobacter* spp y considerar la posibilidad de instaurarlo en el diagnóstico rutinario de infecciones bacterianas en los centros hospitalarios, pretendiendo que forme parte de los programas de vigilancia sanitaria y sobre todo constituya un referente para programas de investigación relacionados a salubridad y consumo de alimentos, mejorando el contexto de la salud pública y alimenticia.

CAPÍTULO 1
MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes

A nivel mundial, las infecciones diarreicas constituyen una de las principales causas de mortalidad en niños menores de 5 años, las cuales ocasionan la muerte de cerca de 2 millones de niños anualmente. En África, Asia y América Latina cada año fallecen alrededor de 3,3 millones de niños por este síndrome afectando al desarrollo infantil (OMS, 2009). En el Ecuador según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC), en el año 2013 una de las principales causas de morbilidad poblacional fueron las enfermedades diarreicas y problemas de gastroenteritis. En la Provincia de Loja, según el Ministerio de Salud Pública (MSP), el número de afectados por cuadros diarreicos fue de 18.884, en el 2009 ocupando el tercer lugar en la región sierra, donde la mayor población de afectados se centra en la área rural con un 23% respecto al área urbana con un 20,6% (Guarderas, 2012).

1.2 Enfermedades diarreicas

Son infecciones que afectan el tracto digestivo, principalmente causadas por agentes patógenos como bacterias, virus o parásitos. La diarrea puede durar varios días y puede privar al organismo de agua, sales, y demás sustancias necesarias para la supervivencia del individuo. La mayoría de las personas que fallecen por enfermedades diarreicas se debe a la presencia de una grave deshidratación y pérdida de electrolitos. La población más expuesta a sufrir esta patología son pacientes malnutridos, inmunodeprimidos o inmunocomprometidos (Estébanez, 2005).

1.2.1 Diarrea.

Se define como diarrea la expulsión de deposiciones no formadas o ligeramente líquidas de tres o más veces al día, o con una frecuencia mayor que la normal para la persona. La presencia de diarrea suele ser un síntoma de una infección del tracto digestivo, provocada por diversos organismos bacterianos, víricos y parásitos (WHO, 2013).

1.3 Tipos de diarrea

1.3.1 Diarrea aguda.

Se considera como diarrea aguda aquella que dura menos de dos semanas. Se estima que más del 90% de casos de este tipo, se debe a la presencia de agentes infecciosos y se manifiestan a menudo con vómito, fiebre, y dolores abdominales. La proporción del 10% restante se debe a la ingesta de medicamentos o sustancias tóxicas, que atentan contra la salud humana (Longo *et al*, 2012).

1.3.2 Diarrea crónica.

Se define como diarrea crónica, aquella que presenta un periodo de duración mayor a cuatro semanas, en su mayoría las causas de esta diarrea no son infecciosas y se deben a otros agentes como fármacos y alcohol, esta se clasifica en: diarrea secretora, osmótica, del viajero y fingida (Argente y Álvarez, 2013).

1.3.2.1 Diarrea secretora.

Se debe a alteraciones en el mecanismo de transporte de los líquidos y electrolitos a través de la mucosa intestinal. Se caracterizan por ser voluminosas, acuosas, persistentes e indoloras a pesar del ayuno. Sus principales causas de origen son el consumo a largo plazo de etanol, la ingesta de fármacos, laxantes y la acción de toxinas bacterianas (Ej. *Vibrio cholerae*) (Longo *et al*, 2012).

1.3.2.2 Diarrea osmótica.

Aparece al ingerir solutos osmóticamente activos y poco absorbibles que atraen líquidos hacia la luz intestinal, por una mala absorción de carbohidratos. Esta diarrea suele desaparecer con el ayuno o al interrumpir la ingestión del producto nocivo (Argente y Álvarez, 2013).

1.3.2.3 Diarrea del viajero.

Se caracteriza básicamente por afectar al 40% de los turistas que viajan a las regiones endémicas de América Latina, África y Asia que están expuestos a sufrir un cuadro diarreico causado principalmente por la ingesta de alimentos, bebidas contaminadas o al entrar en contacto directo con agentes patógenos tales como: *Escherichia coli enterotoxigénica*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Aeromonas* y otros (Longo *et al*, 2012).

1.3.2.4 Diarrea fingida.

Se la conoce también como diarrea ficticia o simulada, se debe a que pacientes se auto administran laxantes o agregan agua u orina a las heces antes de enviar analizar al laboratorio (Longo *et al*, 2012).

1.4 Bacterias

Las bacterias son células procariotas unicelulares que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, ríos, tierra, hojas y raíces de plantas, y en los seres vivos: piel y tubo digestivo de animales (Prats, 2012).

1.4.1 Infección bacteriana.

Las infecciones bacterianas son causadas por microorganismos patógenos que se transmiten desde diferentes reservorios naturales. Su ingreso al organismo humano se da a través de varias vías: piel, mucosas de la vías respiratoria, digestiva o urogenital, contaminación directa con el agente patógeno entre otras. Ciertas bacterias pueden acceder al torrente sanguíneo provocando una bacteriemia, como resultado se produce una infección generalizada, con la alternativa de localizarse de manera secundaria en uno o más órganos distantes del lugar de ingreso. Existen varios agentes patógenos que se les atribuye el origen de una infección diarreica: *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp, *Shigella*, *Salmonella*, *Aeromonas*, *Listeria*, Rotavirus, *Giardia* y otros agentes. En su mayoría las infecciones bacterianas se transmiten por vía fecal – oral, por contacto directo de persona a persona, o en su gran totalidad por la ingesta de alimentos mal cocidos o agua contaminada con heces humanas o de animales. En personas con sistemas de respuesta inmunitario muy buena, la flora fecal saprofita que abarca más de 500 especies taxonómicas rara vez produce diarrea. Si se evidencia un desequilibrio en el sistema inmunitario, el agente patógeno supera las respuestas inmunitarias del organismo y da lugar al origen de una infección bacteriana (Longo *et al*, 2012).

1.5 *Campylobacter* spp

Campylobacter spp, es el agente causal más importante de infecciones entéricas de carácter zoonótico y alimentario en el mundo, provocando más casos de diarrea que *Salmonella*, en los países tanto desarrollados como en desarrollo, teniendo gran importancia desde una perspectiva socioeconómica (OMS, 2011). La incidencia de infecciones por *Campylobacter* spp notificadas, se ha incrementado notablemente en países desarrollados en los últimos años (Rivera *et al*, 2011). Siendo las especies termotolerantes de *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* y más recientemente *C. upsaliensis*) las que han adquirido gran importancia en salud pública, asociándose con problemas de gastroenteritis, septicemia y particularmente como agentes de diarrea para el ser humano, provocando una afectación a nivel mundial (Fernández, 2011).

El género *Campylobacter* spp, se compone de bacilos gramnegativos pequeños de 0,2 a 0,5 µm de ancho y 0,5 a 5,0 µm de largo. Presentan forma de coma y son móviles por la presencia de un flagelo polar. La mayoría de las especies son microaeróbicas y necesitan para su crecimiento una atmósfera con menor concentración de oxígeno (5-7%) y con concentraciones mayores de dióxido de carbono (5-10%) (Murray *et al*, 2014).

1.5.1 Reservorios de *Campylobacter* spp.

Debido a la compleja epidemiología de *Campylobacter* spp, se necesita un enfoque de múltiples niveles de control, teniendo en cuenta los diferentes reservorios de este agente causal. Se habla que los principales reservorios son los animales; los más sobresalientes son las aves de corral, cerdos, bovinos, mariscos. También es una fuente de contaminación el agua potable no tratada, alimentos contaminados por heces fecales humanas o de animales (Murray *et al*, 2014).

1.5.2 Factores de virulencia.

En los seres humanos la infección por *Campylobacter* spp, se produce preferentemente en el intestino, donde *Campylobacter* provoca una mayor capacidad de colonización en las células epiteliales del intestino, siendo este mecanismo de invasión similar pero no idéntico tanto en el hombre como en las aves. Tal es el caso de que *C. jejuni* tiene la capacidad de sobrevivir en células epiteliales T84 humanas, pero no logra sobrevivir en los enterocitos de pollo (Van deun *et al*, 2007). Para que se desarrolle un proceso de colonización por las diferentes especies de este agente patógeno, se requiere de procesos como motilidad, adhesión, invasión y producción de toxinas (Bang *et al*, 2003).

1.5.3 Motilidad.

El mecanismo de motilidad en *Campylobacter* spp, requiere de la acción flagelar y un sistema quimiosensorial que impulsa el movimiento; mismo que se basa en las condiciones ambientales y quimiotácticas presentes en el tracto gastrointestinal (Jaganathan y Penn, 2005).

El flagelo se compone de un cuerpo basal en forma de gancho y un filamento extracelular (Lertsethtakarn *et al*, 2011). El complejo del cuerpo basal está compuesto por diferentes proteínas incluidas las *Flagellar M-ring protein* (codificadas por el gen *Flif*) que permite el ensamble de estructuras en forma de anillo a la membrana celular. Mientras que el filamento extracelular está compuesto de multímeros de la proteína flagelina incluyendo una proteína principal flagelina, *FlaA* (codificada por el gen *flaA*), y una proteína flagelina menor, *FlaB* (codificada gen *FlaB*) (Hendrixson, 2006). Estas permiten el movimiento y coordinación del flagelo a través de un proceso de glicosilación, *Campylobacter* cuenta con dos sistemas independientes de glicosilación, que le permiten la O-glicosilación y N-glicosilación de sus proteínas. La O-glicosilación modifica residuos de serina o treonina en la flagelina, mientras que el sistema de N-glicosilación lo hace en residuos de asparagina en más de 30 proteínas (Szymanski and Wren 2005). A diferencia de lo que ocurre en la O-glicosilación, donde su

papel parece esencial para la estructura y motilidad del flagelo, así como en la adhesión e invasión de las células del hospedador, en el caso de la N-glicosilación se desconoce su cometido en la patogénesis (Young *et al*, 2007).

1.5.4 Quimiotaxis.

Es el mecanismo a través del cual las bacterias pueden desplazarse hacia sitios que presenten condiciones favorables que le permitan entrar al huésped. Este proceso se hace posible con la acción de los quimio atrayentes primarios que son las mucinas y glicoproteínas componentes principales del moco. Otros quimio atrayentes que interactúan en este proceso de invasión son sustratos metabólicos (formiato, L-malato, D-lactato y succinato) que se caracterizan por donar electrones, a diferencia de otros sustratos (fumarato, sulfóxido de dimetilo, nitrito, nitrato y peróxido de hidrógeno) que actúan como aceptor de electrones (Bolton, 2015).

1.5.5 Adhesión.

Para *Campylobacter* spp, la capacidad de adherirse a las células epiteliales gastrointestinales del huésped es un prerrequisito esencial para la colonización.

Campylobacter spp, se adhiere a la célula hospedadora por unión a fibronectinas presentes en las células epiteliales gastrointestinales, a través de la acción de *CadF* (gen que codifica para una proteína de unión a fibronetina), este suceso genera un mecanismo de señalización que promueve la activación de pequeñas GTPasas Rac1 y Cdc42 inductoras de la internalización celular de *Campylobacter* spp al huésped (Bolton, 2015).

1.5.6 Invasión.

La invasión es fundamental para lograr la supervivencia de un agente patógeno en un huésped, por lo tanto se cree que los flagelos presentan una segunda función, además de contribuir con motilidad, estos flagelos secretan proteínas no flagelares esenciales para colonización e invasión (Poly y Gerry, 2008).

1.5.7 Producción de toxinas.

Campylobacter spp presenta la capacidad de sintetizar varias citotoxinas siendo la toxina de hinchamiento citoletal (CDT) la más importante al actuar bloqueando la enzima quinasa CDC2 que es esencial para la transmisión de las células epiteliales humanas de la fase G2 a mitosis. Esta toxina se encuentra estructurada por tres subunidades y codificada por tres

genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*, la ausencia de uno o dos productos génicos produce una toxina funcionalmente inactiva (Asakura *et al*, 2008).

1.5.8 Estructuras de carbohidratos.

Una de las ventajas que también contribuyen a la colonización y evasión de las respuestas inmunes por parte del hospedador son la presencia de carbohidratos (lipooligosacáridos, glicanos de unión tipo N & O), que se encuentran en la superficie de la célula bacteriana facilitando la colonización y asociación de genes (*kspM*, *KspE* & *pgl*), que incrementan la invasión y reducen la inmunología del huésped (Louwen *et al*, 2008).

1.5.9 Infección.

El ser humano adquiere infección tras consumir alimentos, leche o agua contaminada por materia fecal. El alto índice de consumo de carne de pollo por parte de la población a nivel mundial es la causa responsable de más de la mitad de las infecciones en los países desarrollados (Spicer, 2009). La patogenicidad de *Campylobacter* spp, se debe a la facilidad que presenta este microorganismo para invadir la mucosa intestinal, tanto a nivel del intestino delgado como del colon, dando lugar a la síntesis de una enterocolitis, atrofia glandular, pérdida de la producción de mucus, abscesos de las criptas, y ulceración de la mucosa epitelial (Instituto de Salud Pública de Chile [ISPCH], 2014).

1.5.10 Sintomatología.

La infección gastrointestinal por *Campylobacter* spp, se caracteriza por la presencia de diarrea acuosa, fiebre y dolor abdominal, alza de temperatura etc. Sin embargo, los síntomas y signos no son distintos a otras infecciones causadas por otras bacterias, lo que dificulta el diagnóstico en el laboratorio etiológico. El periodo de incubación es de 2 a 5 días, pero puede extenderse hasta los 10 días. Las infecciones extraintestinales por *Campylobacter* spp como meningitis, osteomielitis y sepsis neonatal son raras, pero se han reportado casos (ISPCH, 2014).

1.6 Diagnóstico de *Campylobacter* spp

1.6.1 Recolección y transporte de la muestra.

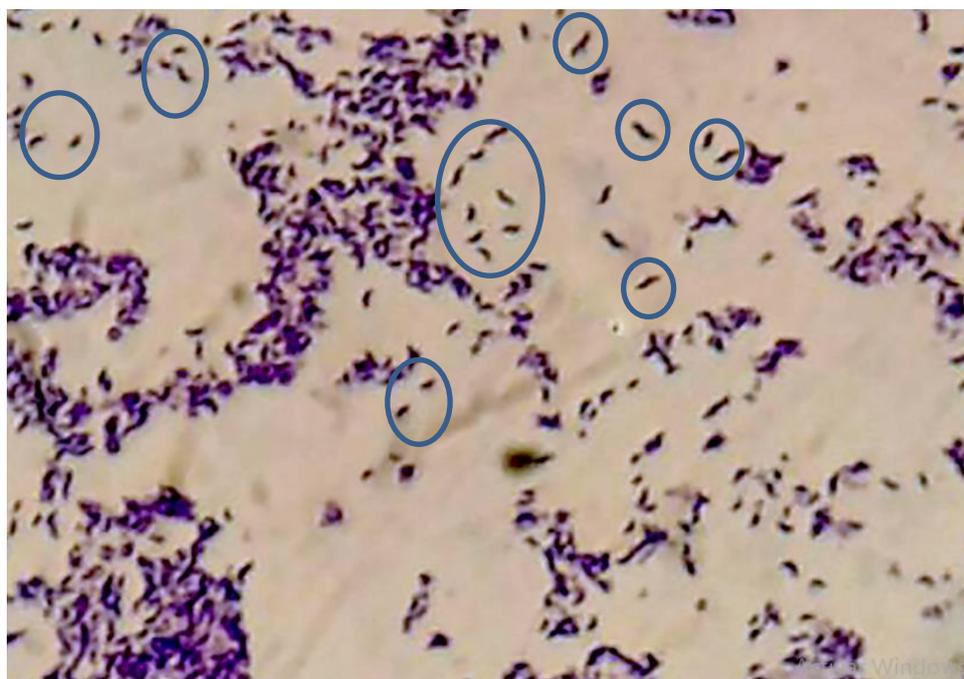
La recolección de la muestra es tomada por evacuación espontánea o por hisopado rectal. Se traslada al laboratorio en el menor tiempo posible en condiciones asépticas en recipiente hermético a temperatura ambiente. Si el periodo de transporte de la muestra es mayor a dos

horas se recomienda usar un medio de transporte Cary Blair o Campy thio y procesar de manera inmediata o conservar a 4°C (Longo *et al*, 2012).

1.6.2 Microscopía.

Por medio de este examen se puede brindar un resultado presuntivo basado en la morfología característica, es decir bacilos curvos con forma de S o alas de gaviota que pueden teñirse con una tinción Gram, ver **figura1** (Longo *et al*, 2012).

Figura 1. Bacilos curvos con forma de gaviota referente a *Campylobacter*.



Fuente: El autor

1.6.3 Cultivos.

El aislamiento de *Campylobacter* spp se realiza a partir de muestras fecales, en medios de cultivos selectivos y de acuerdo a las condiciones microaerobias óptimas de crecimiento (5-7% de O₂; 5-10% CO₂), con un periodo de incubación de 48h a 42°C.

1.6.4 Medios selectivos para aislamiento de *Campylobacter* spp.

Para el aislamiento de *C. jejuni* y *C. coli* en placa se puede considerar diferentes medios: medio Skirrow modificado, medio selectivo con base de carbón libre de sangre, Campy- BAP y sangre de carnero al 10%, agar con carbón, cefoperazona y desoxicolato (CCDA) modificado, agar semisólido para movilidad, Campy-CVA y sangre de carnero al 5% (Longo *et al*, 2012).

Para el aislamiento en placa de *C. fetus* subesp. *fetus*, *C. jejuni* subesp. *doylei*, *C. upsaliensis*, *C. lari*, *C. hyointestinalis* se puede utilizar diferentes medios: medio de Skirrow modificado, medio selectivo con base de carbón libre de sangre, Campy-CVA, (CCDA), Agar semisólido para movilidad, etc (Longo *et al*, 2012).

Los medios selectivos deben contener sangre o carbón con el fin de eliminar los radicales libres del oxígeno, también se añaden antibióticos para evitar el crecimiento de microorganismos contaminantes, para crear un ambiente adecuado para el crecimiento de *Campylobacter* (Murray *et al*, 2014).

1.6.5 Identificación fenotípica.

La identificación se logra con la revisión de la placa, se debe apreciar el crecimiento de colonias gris rosado o gris amarillento característico de este microorganismo, en algunos casos se puede apreciar un efecto de crecimiento expandido de colonias sobre la línea de estriado, **ver figura 2** (Forbes *et al*, 2007).

Figura 2. Crecimiento de colonias puras de *Campylobacter*.



Fuente: El autor

1.6.6 Identificación molecular.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es una técnica que permite amplificar moléculas o segmentos específicos de DNA. Para obtener copias de forma rápida, precisa y en grandes

cantidades de un segmento determinado de DNA (González, 2010). La PCR, consta generalmente de 20 a 30 ciclos y cada ciclo consta de tres fases diferentes, la primera fase consiste en desnaturalizar, proceso que se realiza a una temperatura de 95°C (Oliva *et al*, 2008), una segunda fase que consiste en hibridar los oligonucleótidos para que sean complementarios a la región que se busca amplificar esta fase se realiza en temperaturas que oscilan entre 35°C y 60°C de acuerdo a los cebadores a utilizar (Coleman y Tsongalis, 2006), y una tercera fase que radica en la elongación del complemento de la región a amplificar, esta se realiza a 72°C (Oliva *et al*, 2008).

Para visualizar las moléculas de DNA obtenidos de la PCR se emplea la técnica de electroforesis. Estas moléculas al ser sometidas a tinción con bromuro de etidio o *sybr safe* colorantes que intercalan entre las bases nitrogenadas del DNA, permite emitir una fluorescencia al ser sujeto a radiación ultravioleta. Esta técnica se realiza al someter moléculas de DNA en un gel que puede estar compuesto de agarosa, que permite separar moléculas de hasta 50.000 bases (Oliva *et al*, 2008).

1.7 Tratamiento

Campylobacter spp es sensible a diversas clases de antimicrobianos incluido macrólidos y quinolonas especialmente eritromicina y ciprofloxacina respectivamente.

1.7.1 Fluoroquinolonas.

Son bactericidas potentes contra diversas especies de *Campylobacter*. Las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) por parte de las fluoroquinolonas para el 90% de esta especie suelen ser menores de 0,2 ug/ml. Actúan contra la DNA girasa bacteriana y la topoisomerasa IV lo cual impide que se realice la replicación y por ende la transcripción del DNA bacteriano (Brunton *et al*, 2011).

1.7.2 Macrólidos y cetólidos.

Son fármacos que presentan actividad antibacteriana contra *C. jejuni* con una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 0,5 a 4 ug/ml. Son fármacos bacteriostáticos que inhiben la síntesis proteica al unirse de manera reversible a la subunidad 50S de microorganismos (Brunton *et al*, 2011).

1.8 Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana es la resistencia de un microorganismo hacia un medicamento antimicrobiano al que originalmente era vulnerable. Los organismos como bacterias,

hongos, virus y algunos parásitos pueden presentar mecanismos para resistir a ataques de medicamentos antimicrobianos tales como antibióticos, fungicidas, antivirales y antipalúdicos, lo cual provoca que los tratamientos convencionales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten por mucho más tiempo, incrementando el riesgo de propagación. La evolución de las cepas resistentes es un fenómeno natural por parte de los microorganismos cuando éstos se ven expuestos al ataque de fármacos antimicrobianos, y es posible un intercambio de características de resistencia entre ciertos tipos de bacterias. El uso inadecuado de antibióticos acelera ese fenómeno natural. Con frecuencia las infecciones causadas por microorganismos resistentes, no responden al tratamiento ordinario reduciendo la eficacia del medicamento e incrementando el riesgo de propagación a otras personas. La tasa de mortalidad de pacientes con infecciones graves tratados en hospitales duplica aproximadamente la tasa de pacientes con infecciones provocadas por bacterias no resistentes (WHO, 2014).

1.8.1 Resistencia bacteriana en campylobacteriosis.

La resistencia de *Campylobacter* spp a antibióticos de primera línea como fluoroquinolonas y macrólidos se debe en gran parte al uso indiscriminado e inadecuado de antibióticos, por parte del hombre y también a los propios mecanismos de defensas de la bacteria para lograr su supervivencia. Para reducir la resistencia de *Campylobacter* spp a fluoroquinolonas y macrólidos se ha recomendado no utilizar estos antimicrobianos en animales, con fines profilácticos en la industria avícola, ni como forma de automedicación en la población humana (Rivera *et al*, 2011).

En la actualidad se evidencia un porcentaje en aumento de resistencia a ciprofloxacina en *Campylobacter* spp y en menor proporción de eritromicina, siendo este último el antibiótico de elección para tratar la campylobacteriosis advirtiendo a la población humana de tomar medidas y evitar que los índices de resistencia a antibióticos por parte de este microorganismo patógeno continúe en aumento (Bonmar *et al*, 2007).

1.8.2 *Campylobacter jejuni* subsp *jejuni*.

Un estudio realizado recientemente en Canadá, muestra datos comprometedores con un índice de alrededor de 145.000 casos dentro de una población de 32,5 millones de habitantes, constituye el tercer patógeno alimentario más frecuente después de norovirus y *Clostridium perfringens* (Thomas *et al.*, 2013). Es una especie considerada como agente enteropatógena para el hombre de origen zoonótico, que necesita de un ambiente de 42-43°C para su desarrollo (Fernández, 2008). Al igual que la gran mayoría de las infecciones por *Campylobacter* spp. Esta especie no es la excepción, en gran parte las infecciones por

C. jejuni son por contacto directo con la materia fecal humana contaminada o la manipulación y el consumo de productos cárnicos de aves de corral, a los cuales se los reconoce como una importante fuente de contaminación para el hombre (Guévremont *et al*, 2015).

El ambiente de *C. jejuni* para reproducirse es muy exigente por lo cual a temperatura ambiente o condiciones normales de almacenamiento es incapaz de multiplicarse, pero se sabe que tiene la capacidad de sobrevivir durante meses a 4°C siendo este probablemente un factor para dar paso a la gran incidencia de *Campylobacter* en la cadena alimentaria (Jackson *et al*, 2009).

Este agente patógeno se caracteriza porque invade el sistema circulatorio. Dicho proceso de invasión tan solo dura a inicios de la infección, debido a la respuesta inmediata del sistema inmunitario del individuo que actúa para eliminarlo de la circulación. Tras la lucha del sistema inmunitario ante la bacteria *C. jejuni* presenta la cualidad de adherirse al epitelio del intestino delgado y grueso; con la ayuda de sus factores de virulencia a pesar de carecer fimbrias. Se ha catalogado que algunas estructuras como la existencia del flagelo en uno de sus extremos y algunas proteínas presentes en la membrana externa y lipopolisacáridos (LPS), actúan como adhesinas lo que contribuye al proceso de adhesión a las células epiteliales. Desencadenando el génesis de una infección intestinal (Fernández, 2008).

C. jejuni se diferencia de *C. coli* debido a que la primera antes mencionada presenta la capacidad de resultar positiva para la prueba de hidrólisis del hipurato de sodio, siendo esta la única especie positiva para esta prueba. Se considera a *C. jejuni* como la especie precursora del Síndrome de Guillain Barré.

1.8.2.1 Síndrome de Guillain Barré.

Síndrome de Guillain-Barré (GBS) es el principio más habitual de la parálisis flácida aguda (Tam *et al*, 2007). Se habla actualmente de una distribución mundial con tasas bajas de incidencia que fluctúan entre 1 y 3 casos por cada 100 000 habitantes. Se estima 1 caso alrededor por cada 2000 infecciones, siendo este síndrome una secuela de la enteritis causada por *Campylobacter*, dado que existen evidencias de un desarrollo natural de inmunidad de la especie humana en especial en los países en vías de desarrollo. Por tanto es probable que a futuro se pueda sintetizar una vacuna para frenar los índices que van en aumento por este agente patógeno (Mandell *et al*, 2002). Este síndrome afecta a personas de todas las edades, particularmente alcanza una incidencia alta en personas mayores entre 50 y 70 años de vida (Montes de Oca & Victorero, 2014).

Según el Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Accidentes Cerebrovasculares en este síndrome el sistema inmunológico del cuerpo comienza a atacar al propio organismo, siendo lo más probable que este proceso se dé luego de que el cuerpo active el mecanismo de defensa contra estructuras extrañas que atentan al organismo, lo que causa un daño neurológico que se inicia con la destrucción de la cobertura de la mielina que rodea los axones de los nervios; acelerando el proceso de transmisión de señales. Las señales al no ser transmitidas de manera eficiente provoca que los músculos comiencen a perder su capacidad de responder a las órdenes del cerebro, frente a la existencia de una red nerviosa dañada (INTNAC, 2007). Varios agentes patógenos se cree que desencadenan GBS, principalmente *C. jejuni* (Tam *et al*, 2007).

1.8.3 *Campylobacter coli*.

C. coli, y *C. jejuni* son especies que se relacionan con diarrea bacteriana en los seres humanos en todo el mundo. Las infecciones por *C. coli* generalmente ocurren de manera esporádica después de la ingestión de alimentos mal manipulados o contaminados accidentalmente (Luber *et al*, 2003).

1.8.4 *Campylobacter lari*.

Esta especie en la actualidad es reconocida como agente de diarrea y septicemia en el hombre. Se asocia a brotes de diarrea causados por la ingesta de agua contaminada. Sus reservorios más importantes son aves marinas, principalmente gaviotas, aunque también puede ser aislada de otros animales (Fernández *et al*, 2008).

1.8.5 *Campylobacter upsaliensis*.

Esta especie se caracteriza porque presenta la capacidad de producir diarrea principalmente en pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos. Esta especie presenta la ventaja de crecer a 37- 42°C y una débil o nula producción de catalasa. Ha sido aislada de varios animales (perros, gatos, patos, monos, pelícanos, gorriones y gallinas). Sus mecanismos de patogenicidad aún no están bien definidos, aunque se le reconoce la capacidad de adherencia a células de origen endotelial. El síndrome de Guillain Barré y el síndrome Urémico Hemolítico han sido descritos como secuelas post-infección (Fernández *et al*, 2008).

CAPÍTULO 2
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Metodología

Se recolectaron 63 muestras fecales (con y sin diarrea) de niños menores de 10 años que acudieron al Hospital Regional Isidro Ayora de la ciudad de Loja, durante septiembre-diciembre de 2014. Las muestras fueron obtenidas por evacuación espontánea y trasladada al laboratorio asépticamente en el menor tiempo posible a temperatura ambiente.

2.2 Identificación fenotípica de *Campylobacter* spp

Las muestras fueron sembradas en medio de cultivo selectivo agar sangre (OXOID) más suplemento selectivo para *Campylobacter* spp Butzler o Blaser (OXOID) (**Anexo 1**) y simultáneamente se realizó un frotis directo de la muestra para tinción Hucker (**Anexo 2,3 y 4**). Las placas petri fueron almacenadas en un recipiente o jarra de anaerobiosis, en conjunto con un parche de anaerobiosis *CampyGen*TM 2,5L e incubadas a 42°C por 48 h.

2.2.1 Crecimiento bacteriano.

Las colonias de *Campylobacter* spp, se caracterizan por ser grisáceas y diseminarse por la estría de la siembra. Para corroborar el crecimiento se hizo un frotis de las colonias sospechosas para tinción Hucker (**Anexo 5**).

2.2.2 Identificación bioquímica de *Campylobacter* spp.

Para la identificación de *C. jejuni subsp. jejuni* en relación a *C. coli* se procedió a utilizar la técnica de hidrólisis del hipurato (**Anexo 8 y 9**).

2.2.3 Cultivo por filtración pasiva.

Este proceso se realizó en las muestras en las cuales se evidenció contaminación microbiana con el objetivo de aislar colonias puras, para ello se hizo uso de papel filtro Millipore de 0,45 µm (**Anexo 6**).

2.3 Crioconservación de muestras positivas

Las especímenes positivas fueron conservadas dentro de tubos CRYOBANKTM a una temperatura de -70°C (**Anexo 7**).

2.4 Identificación molecular de *Campylobacter* spp

Para la identificación molecular se procedió a la extracción de DNA a través del kit comercial E.Z.N.A. DNA Kit Células Cultivadas (OMEGA bio-tek) de acuerdo al protocolo establecido (**Anexo 10**).

Se realizó Reacción en Cadena de la Polimerasa Multiplex (MULTIPLEX-PCR), de acuerdo a los protocolos recomendados por Yamazaki-Matsune *et al*, 2007 (**Anexo 11**).

Las cepas control fueron ATCC (*C. jejuni* DSM4688 y *C. coli* DSM4689), proporcionadas por el Instituto de Microbiología Clínica de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile. Los pares de primers (Invitrogen Custom Primers) se indican en la **tabla 1**. La MULTIPLEX-PCR, se realizó en un termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler con las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización a 95°C, 35 ciclos de anillamiento a 58°C, 25 ciclos de extensión a 72° C y 1 ciclo de extensión final a 72°C.

Para visualizar las moléculas de DNA obtenidas de la MULTIPLEX-PCR se empleó la técnica de electroforesis con un marcador de 100 bp de la casa comercial Invitrogen (TrackIt™ 100bp DNA Ladder). (**Anexo 12,13 y 14**).

Las moléculas al interactuar con *sybr safe* (Invitrogen) emiten una fluorescencia al ser sujetas a radiación ultravioleta, para lo cual se utilizó el equipo ENDURO™ GDS TOUCH *Labnet*. La interpretación de las bandas se hizo de acuerdo al peso molecular de cada especie según Yamazaki-Matsune *et al*, 2007.

Tabla 1. Secuencias de primers utilizados para la MULTIPLEX-PCR para identificación de especies de *Campylobacter spp.*

Especie	Tamaño (bp)	Gen	Primer	Secuencia (5'-3')
Género <i>Campylobacter</i>	816	16S <i>Rna</i>	C412F C1228R	(DNA)- GGA TGA CAT TTT TGG GAG C (DNA)- CAT TGT AGC ACG TGT GTC
<i>C. hyointestinalis</i> Subsp. <i>hyointestinalis</i>	611	23S <i>Rna</i>	HYO1F HYOFET235R	(DNA)- ATA ATC TAG GTG AGA ATC CTA G (DNA)- GTC TCG CAT AGC TAA CAT
<i>C. coli</i>	502	<i>askt</i>	CC18F CC519R	(DNA)- GGT ATG ATT TCT ACA AAG GGA G (DNA)- ATA AAA GAC TAT CGT CGC GTG
<i>C. fetus</i>	359	<i>cstA</i>	MG3F CF359R	(DNA)- GGT AGC CGC AGC TGC TAA GAT (DNA)- AGC CAG TAA CGC ATA TTA TAG TAG
<i>C. lari</i>	251	<i>glyA</i>	CLF CLR	(DNA)- TAG AGA GAT AGC AAA AGA GA (DNA)- TAC ACA TAA TAA TCC CAC CC
<i>C. jejuni subsp.</i> <i>jejuni</i>	161	<i>Cj0414s</i>	C-1 C-3	(DNA)- CAA ATA AAG TTA GAG GTA GAA TGT (DNA)- CCA TAA GCA CTA GCT AGC TGA T
<i>C. upsaliensis</i>	86	<i>lpxA</i>	CU61F CU146R	(DNA)- CGA TGA TGT GCA AAT TGA AGC (DNA)- TTC TAG CCC CTT GCT TGA TG

Fuente: Yamazaki-Matsune *et al*, 2007.

2.5 Resistencia bacteriana

Para determinar la resistencia bacteriana de diferentes especies de *Campylobacter* se usó el Método de Kirby-Bauer o difusión en agar Muller Hinton de la casa comercial Difco™ más 5% de sangre humana o de cordero (**Anexo 15 y 16**) con un inóculo de 0,5 en la escala de McFarland a una temperatura de 42°C en condiciones de anaerobiosis, 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).

Los antibióticos utilizados fueron: ciprofloxacina (CIP-5 µg), ampicilina (AMP-10 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (AMC-20/10 µg), tetraciclina (TE-30 µg), gentamicina (GM-10µg) y eritromicina (ER-15 µg) de la casa comercial BBL™ *Sensi-Disc*™ Susceptibility Test Discs.

CAPÍTULO 3
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la presente investigación realizada en la ciudad de Loja se determinó la prevalencia de las especies termotolerantes de *Campylobacter* (*C. jejuni subsp. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* y *C. upsaliensis*) en niños con y sin diarrea del Hospital Regional Isidro Ayora (HRIA), durante el periodo Septiembre - Diciembre 2014. Se analizó un total de 63 muestras fecales de las cuales se obtuvo una prevalencia de 8% positivas para *Campylobacter* (5) **tabla 2 y 3.**

Tabla 2. Identificación de *Campylobacter* spp, en muestras fecales de pacientes pediátricos.

Muestras	N° de muestras	Porcentaje (%)
Negativas	58	92
Positivas	5	8
TOTAL	63	100

Fuente: El autor

Tabla 3. Prevalencia de especies termotolerantes de *Campylobacter*.

Especie	Muestras positivas	Porcentaje (%)
<i>C. jejuni subsp. jejuni</i>	3	60
<i>C. jejuni subsp. Jejuni + C. coli</i>	2	40
<i>C. coli</i>	0	0
<i>C. lari</i>	0	0
<i>C. upsaliensis</i>	0	0
TOTAL	5	100

Fuente: El autor

La prevalencia de *C. jejuni subsp. jejuni* en el presente estudio es del 60%. Datos similares a los obtenidos en un estudio desarrollado en Brasil 57,1% (Da Silva Quetz *et al*, 2010), y Bolivia 63% (Orrieta, 2009). Sin embargo, se registran cifras mayores donde Argentina señala una prevalencia del 96% (Tamborini *et al*, 2012), Canadá 90.9% (Lévesquet *et al*, 2013) y Perú 84,6% (Perales *et al*, 2002). Resultados menores en comparación a nuestro estudio se registraron en Uruguay 14,3% (Mota *et al*, 2010), Bolivia 8,75% (Pinto D, 2004), Brasil 4,6% (Fernández *et al*, 2008) y Chile 2,1% (Rivera *et al*, 2011). Es importante indicar,

que a nivel de país estudios realizados en las provincias: Pichincha y Esmeraldas, señalan también una incidencia menor a nuestros datos alcanzados con un 5,5% y 0,6% respectivamente (Vasco *et al*, 2014).

La incidencia de *C. jejuni subsp. jejuni* en nuestra investigación ratifica que es la especie más frecuente que causa infección en el hombre (Rivera *et al*, 2011). La mayoría de las infecciones son esporádicas y por lo tanto es difícil de identificar la fuente de contaminación, pero también se conoce que la falta de asepsia en la manipulación y el consumo de productos cárnicos de aves de corral y el contacto con animales infectados son una fuente de contaminación para los seres humanos (Rapp *et al*, 2012).

Un dato importante, es que se reportaron casos de co-infección para *C. jejuni subsp. jejuni*, más *C. coli*, con una prevalencia del 40%, una incidencia menor se reporta en un estudio realizado en Brasil que indica una frecuencia de aislamiento de 1,8% (Da Silva Quetz *et al*, 2010). Sin embargo existen antecedentes a nivel de país que señalan casos de co-infección de *C. jejuni subsp. jejuni* asociado con otros agentes enteropatógenos: Rotavirus, *Shigella*, *Giardia lamblia*, *Salmonella*, con una prevalencia del 10% (Guderian *et al*, 1987). Mientras que cifras publicadas en Argentina (Fernández *et al*, 2008) y en Uruguay (Mota *et al*, 2010) señalan que no existen datos que indiquen la asociación entre estas dos especies. Cabe destacar que la presencia de co-infecciones incrementa la posibilidad de presentar cuadros diarreicos (Vasco *et al*, 2014).

Para *C. coli*, no se registraron datos de prevalencia, en relación a estudios realizados en Bolivia que indican un 30% (Orrieta, 2009). Así mismo, investigaciones efectuadas en diversos países muestran niveles inferiores de incidencia: Canadá 5% (Lévesquet *et al*, 2013), Argentina 4% (Tamborini *et al*, 2012), Brasil 1,9%; 1,8% (Da Silva Quetz *et al*, 2010); (Fernández *et al*, 2008) y Bolivia 1,25% (Pinto D, 2004).

Hernández *et al* (2013), señala que *C. coli* es reconocido como la segunda especie más aislada correspondiendo al 10% o 15% dentro de los casos de campylobacteriosis, a diferencia de *C. jejuni* quien ocupa el primer lugar, siendo este el responsable de entre el 80% y 85% de las infecciones. Además se cree que la baja incidencia de *C. coli* se debe, a que este agente patógeno tiene como reservorio natural más frecuente a los cerdos, a diferencia de *C. jejuni*, que tiene a las aves de corral como su principal reservorio, siendo la carne de pollo una de mayor consumo a nivel mundial en relación a productos cárnicos de origen porcino (Murray *et al*, 2014).

Para *C. lari* no se registraron datos de prevalencia en nuestra investigación a diferencia de otros estudios desarrollados en Bolivia que presenta un 6,8% (Orrieta, 2009), en Brasil 3,7%

(Fernández *et al*, 2008), y Canadá 1% (Lévesquet *et al*, 2013). Sin embargo en Chile se evidencia una prevalencia de 4,6 % aislado de aves y mamíferos (Lastovica y Skirrow 2000).

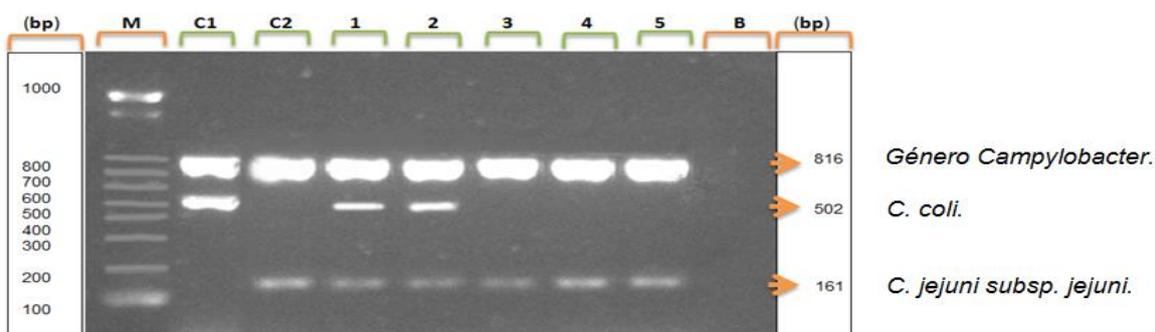
C. lari es un enteropatógeno de baja prevalencia en seres humanos (Lastovica y Skirrow 2000). Siendo esto corroborado por Fernández *et al*. (2008) que indica que la frecuencia de aislamiento de *C. lari* es menor que la de *C. coli*, ya que está asociada principalmente a brotes de diarrea producidos por ingesta de agua contaminada. También esta especie se encuentra en abundancia en agua natural, y es un habitante normal del tracto digestivo intestinal de las gaviotas (género *Larus*) (Keller *et al*, 2011).

Para *C. upsaliensis* no se registraron datos de prevalencia en nuestro estudio a diferencia de un estudio realizado en Brasil que presenta una prevalencia del 7,9% (Fernández *et al*. 2008). Esto es corroborado aunque en menor proporción por una investigación realizada en Canadá con una incidencia de 1% (Lévesquet *et al*, 2013). A diferencia de un estudio realizado en Argentina en animales de compañía para el ser humano (caninos, felinos y aves) que señalan una prevalencia de 5,5% (López *et al*, 2003).

C. upsaliensis presenta una menor prevalencia en relación a *C. jejuni subsp. jejuni*, como causa de gastroenteritis y bacteriemia en niños, a pesar de no estar bien esclarecido su importancia como patógeno entérico para los animales de compañía, pero debido a que se aísla frecuentemente de heces, tanto de perros y gatos sanos como con diarrea, se indica que este es un factor principal de riesgo asociado con las infecciones por esta especie en seres humanos (Jiménez *et al*, 1999).

Entre las distintas técnicas de identificación de *Campylobacter* spp, una de mayor especificidad y sensibilidad a nivel metodológico presenta la técnica de MULTIPLEX-PCR (Klena *et al*, 2004). A continuación se muestra los resultados obtenidos en la **figura 3**.

Figura 3. MULTIPLEX-PCR, para determinación de *Campylobacter*.



bp: Pares de bases; **M:** marcador de peso molecular; **C1:** control positivo *C. coli*, ATCCDSM4689; **C2:** control positivo *C. jejuni subsp. jejuni*, ATCCDSM4688; **1-5:** muestras; **B:** blanco.

Fuente: El autor

El uso de métodos de biología molecular en laboratorios de microbiología clínica, pretende brindar apoyo a la obtención de resultados altamente sensibles y específicos en el menor espacio de tiempo posible, y a su vez complementar los métodos de diagnóstico microbiológico (Méndez y Pérez, 2004).

Adicionalmente en la presente investigación se evaluó la susceptibilidad antimicrobiana de 6 antibióticos frente a *Campylobacter* spp, cuyos resultados se detallan en la **tabla 4 y figura 4**.

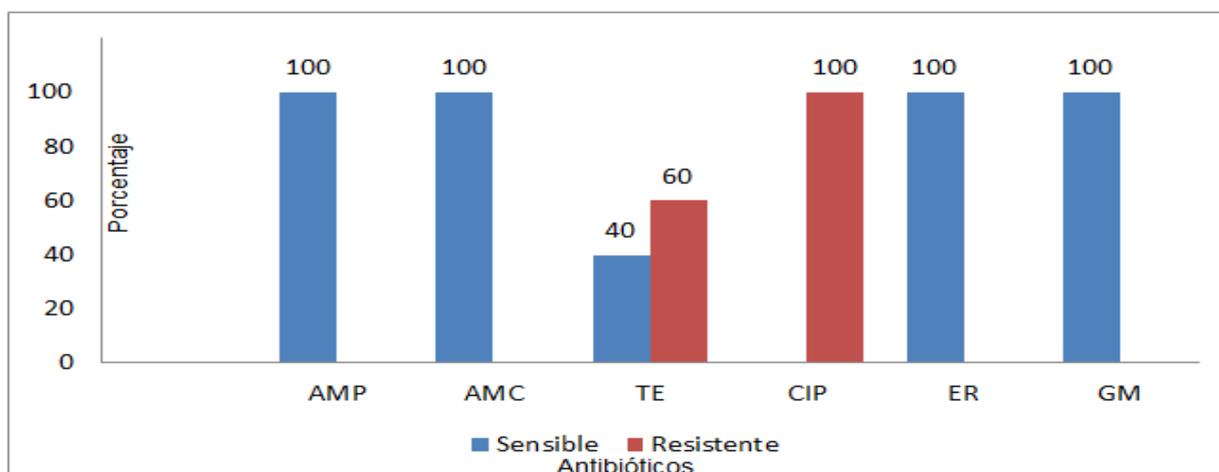
Tabla 4. Susceptibilidad bacteriana de especies de *Campylobacter*.

Muestras	Especie	AMP-10 (µg)	AMC-20/10 (µg)	TE-30 (µg)	CIP-5 (µg)	ER-15 (µg)	GM-10 (µg)
1	<i>C jejuni + C coli</i>	S	S	S	R	S	S
2	<i>C jejuni + C coli</i>	S	S	R	R	S	S
3	<i>C jejuni</i>	S	S	R	R	S	S
4	<i>C jejuni</i>	S	S	S	R	S	S
5	<i>C jejuni</i>	S	S	R	R	S	S

S: sensible; **R:** resistente; **AMP:** ampicilina; **AMC:** amoxicilina-ácido clavulánico; **TE:** tetraciclina; **CIP:** ciprofloxacina; **ER:** eritromicina; **GM:** gentamicina.

Fuente: El autor

Figura 4. Susceptibilidad bacteriana en especies de *Campylobacter*.



Fuente: El autor

Un dato significativo que emitió la investigación realizada fue la resistencia en un 100% a ciprofloxacina. La Unión Europea señala una tasa de resistencia de 54,6%, siendo España el país que presenta cifras similares de resistencia respecto a nuestro estudio con un 91,5% (Efsa & Authority, 2015). Mientras que un estudio emprendido en Bolivia indica un tasa de resistencia de 70,4% (Orrieta, 2009). De igual forma un trabajo investigativo en Argentina revela un 65% (Tamborini *et al*, 2012), a diferencia de una investigación desarrollada en Chile que presenta una tasa de resistencia menor con un 32,4% (García *et al*, 2009). Así mismo otro trabajo investigativo efectuado en Chile señala una resistencia de 33,3% (Rivera *et al*, 2011).

El incremento de la resistencia de *Campylobacter* spp, a quinolonas en los reservorios de animales puede conducir fallos en el tratamiento de las diarreas producidas por estos microorganismos en el hombre. Para reducir la resistencia de *Campylobacter* spp a fluoroquinolonas se ha recomendado no utilizar estos antimicrobianos en animales con fines profilácticos (Orden y De la Fuente, 2001).

Además el estudio realizado reveló que todos los casos positivos para *Campylobacter* spp, resultaron ser sensibles en un 100% a ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, eritromicina y gentamicina. Con respecto a ampicilina datos muy cercanos a los obtenidos se muestran en un estudio desarrollado en Burkina Faso con una tasa de 75,9% (Sangaré *et al*. 2012), también una sensibilidad menor señala un estudio realizado en Chile con una tasa de 6,8% (García *et al*, 2009). En relación a amoxicilina-ácido clavulánico una investigación efectuada en Bolivia presenta iguales resultados a los obtenidos 100% (Orrieta, 2009), esto es corroborado por un estudio elaborado en Burkina Faso con un 96.6% (Sangaré *et al*, 2012). Con respecto a eritromicina un dato similar al obtenido, se presenta en un trabajo en Chile con un 100% (Rivera *et al*, 2011), Burkina Faso presenta un dato con una sensibilidad de 89,7% (Sangaré *et al*, 2012), y Bolivia 38,7% (Orrieta, 2009). En lo que concierne a gentamicina dos estudios ejecutados presentan una sensibilidad similar a la alcanzada en la presente investigación, tanto en Bolivia con un 100% (Orrieta, 2009) y en Burkina Faso también con un 100% de sensibilidad frente a este antibiótico (Sangaré *et al*, 2012).

Lehtopolku *et al*, (2012) señala que la determinación precisa de la sensibilidad *in vitro* de *Campylobacter*, es de gran importancia para garantizar una terapia antimicrobiana y también, para el monitoreo eficaz de la resistencia a los antimicrobianos a nivel mundial.

CONCLUSIONES

- De un total de 63 muestras analizadas el 8% (5) resultaron ser positivas para *Campylobacter* spp.
- *C. jejuni* subsp. *jejuni*, presento una prevalencia del 60%.
- La asociación entre *C. jejuni* subsp. *jejuni*, más *C. coli*, presento una prevalencia del 40%.
- *C. coli*, *C. lari* y *C. upsalienses* no registraron datos en este estudio.
- De las muestras positivas para *Campylobacter* spp el 100% presento resistencia a ciprofloxacina seguido del 60% a tetraciclina, mientras que el 100% mostro sensibilidad para ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, eritromicina y gentamicina.

RECOMENDACIONES

- Continuar con más proyectos de investigación para determinar la prevalencia de *Campylobacter* spp, tanto en niños como en alimentos de origen aviar y animales de compañía a nivel de país, y con ello obtener datos actuales que describan la incidencia y su posible correlación epidemiológica.
- Facilitar nuestra información al Ministerio de Salud Pública, para que en la medida de lo posible se incluya el diagnóstico de *Campylobacter* spp, de forma rutinaria en las diferentes casas de salud a nivel nacional.
- Hacer campañas de concienciación acerca del uso y mal uso de antibióticos y reducir la administración excesiva e indebida de antimicrobianos a los animales destinados al consumo humano, con el fin de proteger la salud humana, tanto a nivel clínico y veterinario.
- Solicitar al Ministerio de Salud Pública la implementación de campañas de regulación y vigilancia sobre el uso irracional de antibióticos en el ámbito clínico y veterinario.

BIBLIOGRAFÍA

Arsenault, J. Ravel, A. Michel, P. Berke, O. Gosselin, P. (2011). Do patients with recurrent episodes of campylobacteriosis differ from those with a single disease event BMC Public Health, 11-32.

Aregente, H. Alvarez, M. (2013). *Semiología Médica. Fisiopatología, Semiología y Propedéutica Enseñanza-aprendizaje centrada en la persona*. (2ª Ed). Buenos Aires: Argentina.

Asakura, M. Samosornsuk, W. Hinenoya, A. Misawa, N. Nishimura, K. Matsuhisa, A. Yamasaki, S. (2008). Development of a cytolethal distending toxin (cdt) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter fetus*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 52, 260-266.

Bang, D.D. Scheutz, F. Gradel, K.O. Nielsen, E.M. Pedersen, K. Engberg, J. Gerner- Smidt, P. Handberg, K. Madsen, M. (2003). Detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from different sources and cytolethal distending toxin production suggest potential diversity of pathogenic properties among isolates. Gen. Lett. 2, 62-72.

Boonmar, S. Morita, Y. Fijuita, M. Sangsuk, L. Suthivarakom, K. Padungtod, P. (2007). Serotypes, antimicrobial susceptibility, and *gyr a* genes mutation of *Campylobacter jejuni* isolates from humans and chickens in Thailand. *Microbiol Inmunol*, 51 (5), 531-7.

Bolton, D. J. (2015). *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiology*, 48(2015), 99–108. doi:10.1016/j.fm.2014.11.017

Brunton, L. Chabner, B. Knollman, B. (2011). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. (12ª Ed). México: DF.

Briand, S. Leyrit, M. & Escalante, S. (1994). *Proyecto Atucucho*. Quito-Ecuador.

Coleman, W y Tsongalis, G., (2006). *Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratorian*. Humana Press. ISBN 1-58829-356-4.pgs. 47-56 y 65-74.

Da Silva Quetz, J. Lima, IF. Havt, A. de Carvalho, EB. Lima, NL. Soares, AM. Mota, RM. et al. (2010). *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in children from communities in Northeastern Brazil: molecular detection and relation to nutritional status. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 67(3):220-7.

Efsa, E. F. S. A., & Authority, S. (2015). SCIENTIFIC REPORT OF EFSA AND ECDC Antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans , animals and food in the EU in. *EFSA Journal*, 13(2), 1 – 178. doi:10.2903/j.efsa.2015.4036

Estébanez, P. (2005). *Medicina humanitaria*. (1ª Ed). Madrid: España.

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

Fernández, H. (2011). *Campylobacter y campilobacteriosis una mirada desde América del Sur*. *Rev. Perú med. exp. salud pública*, 28, 121-127

Fernández, H. Vera, F. Villanueva, M. P. & García, A. (2008). Occurrence of *campylobacter* species in healthy well-nourished and malnourished children. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(2008), 56–58. doi:10.1590/S1517-83822008000100013

Forbes, B. Sahn, D. Weissfeld, A. (2007). *Bailey & Scott Diagnóstico microbiológico*. (12ªEd). Madrid: España.

Fontanot, M. Iacumin, L. Cecchini, F. Comi, G. & Manzano, M. (2014). Rapid detection and differentiation of important *Campylobacter* spp. in poultry samples by dot blot and PCR. *Food Microbiology*, 43(2014), 28–34. doi:10.1016/j.fm.2014.05.001

García, P. Valenzuela, N. Rodríguez, V. León, E. Fernández, H. (2009) Susceptibilidad antimicrobiana de *Campylobacter jejuni* aislado de coprocultivos en Santiago de Chile. *Rev chilena de infectología*, (26), 511-514.

Guévremont, E. Lamoureux, L. Ward, P. & Villeneuve, S. (2015). Survival of *Campylobacter jejuni* on fresh spinach stored at 4 °C or 12 °C. *Food Control*, 50(2015), 736–739. doi:10.1016/j.foodcont.2014.10.023

González, A. (2010). *Principios de Bioquímica clínica y Patología molecular*. (1ª Ed). Barcelona: España.

Guarderas, L. (2012). *Probióticos como coadyuvantes en el manejo de la enfermedad diarreica aguda y su evolución, en los niños de 2 años a 4 años en el área de pediatría del Hospital de Saraguro periodo enero a junio del 2012*. Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador.

Guderian, R. Ordoñez, R. Bossano, R. (1987). DIARREA AGUDA ASOCIADA A *CAMPYLOBACTER* Y OTROS AGENTES PATOGENOS EN QUITO ECUADOR. *Bol of Sanit Panam* 102(4), 1987

Hall, GV. Kirk, MD. Becker, N. *et al.* (2005). Estimating foodborne gastroenteritis, Australia. The OzFoodNet Working Group. *Emerg Infect Dis*; 11:1257-64.

Hendrixson, D.R. (2006). A phase-variable mechanism controlling the *Campylobacter jejuni* FlgR response regulator influences commensalism. *Mol. Microbiol.* 61, 1646-1659.

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

Humphrey, T. O'Brien, S. Madsen, M. (2007). *Campylobacter* as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 237e257.

Instituto de Salud Pública de Chile. (2014). *Vigilancia de laboratorio de Campylobacter spp. Chile, 2005 – 2013.* Boletín ISP, 4: 1- 17

Iovine, N. M. (2013). Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. *Virulence*, 4, 230–40. doi:10.4161/viru.23753

Jackson, D. N. Davis, B. Tirado, S. M. Duggal, M. van Frankenhuyzen, J. K. Deaville, D. *et al.* (2009). Survival mechanisms and culturability of *Campylobacter jejuni* under stress conditions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96, 377-394.

Jagannathan, A. Penn, C. (2005). In: Ketley, J.M., Konkel, M.E. (Eds.), *Motility in Campylobacter.* Molecular and Cellular Biology. Horizon Bioscience, Norfolk, pp. 331-347.

Jiménez, S. Heine, R. Ward, P. & Robins-Browne, R. (1999). *Campylobacter upsaliensis* gastroenteritis in childhood. *Pediatr. infect. Dis. J*, 18 (11), 988-992

Keller, JI. Shriver, WG. Waldenstrom, J. *et al.* (2011). Prevalencia de *Campylobacter* en aves silvestres de la región del atlántico medio. *EE.UU. JWildL Dis.*, 47-750.

Klena, J. Parker, C. Knibb, K. Ibbitt, C. Devane, P. Horn, S. Miller, W. Konkel, M. (2004). Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a Multiplex PCR Developed from the Nucleotide Sequence of the Lipid A Gene *lpxA*. *J. Clin. Microbiol.* 42(12):5549.

Lastovica, A. Skirrow, M. Nachamkin, I. Blaser, M. (2000). *Clinical significance of Campylobacter and related species other than Campylobacter jejuni and C. coli*. (2^a Ed). ASM Press, Washington DC, USA, pp 89-120.

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

Lehtopolku, M. Kotilainen, P. Puukka, P. Nakari, U. Siitonen, A. Eerola, E. (2012). Inaccuracy of the disk diffusion method compared with the agar dilution method for susceptibility testing of *Campylobacter* spp. *J Clin Microbiol*; 50, 52-6.

Lertsethtakarn, P. Ottemann, K.M. Hendrixson, D.R. (2011). Motility and chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annu. Rev. Microbiol.* 65, 389-410.

Levesque, S., Fournier, E., Carrier, N., Frost, E., D. Arbeit, R., & Michaud, S. (2013). Campylobacteriosis in urban versus rural areas: A case-case study integrated with molecular typing to validate risk factors and to attribute sources of infection. *PLoS ONE*, 8(December), 17–20. doi:10.1371/journal.pone.0083731

Lynch, O.A. Cagney, C. McDowell, D.A. Duffy, G. (2011). Occurrence of fastidious *Campylobacter* spp. In fresh meat and poultry using an adapted cultural protocol. *Int. J. Food Microbiol.* 150,171-177.

Longo, D. Kasper, D. Jameson, L. Fauci, A. Hauser, S. Loscalzo, J. (2012). *Principios de medicina interna*. (18^a Ed). New York: USA.

Louwen, R. Heikema, A. van Belkum, A. Ott, A. Gilbert, M. Ang, W. Endtz, H.P. Bergman, M.P. Nieuwenhuis, E.E., (2008). The sialylated lipooligosaccharide outer core in *Campylobacter jejuni* is an important determinant for epithelial cell invasion. *Infect. Immun.* 76 (10), 4431-4438.

López, C., Agostini, A., Giacoboni, G., Cornero, F., Tellechea, D., & Trinidad, J. J. (2003). Campylobacteriosis en una comunidad de bajos recursos de Buenos Aires, Argentina. *Revue scientifique et technique-Office international des épizooties*, 22(3), 1013-1020.

Luber, P. Wagner, J. Hahn, H. & Bartelt, E. (2003). Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated in 1991 and 2001–2002 from poultry and humans in Berlin, Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 3825–3830

Mandel, G. Bennett, J. Dolin, R. (2002). *Enfermedades Infecciosas principios y prácticas*. (5^a Ed). Buenos Aires: Argentina.

Man, S. Kaakoush, N. Octavia, S. Mitchell, H. (2010). The internal transcribed spacer región, a new tool for use in species differentiation and delineation of relationships within the *Campylobacter* genus Appl. Environ. Microbiol. 76 (10), 3071-3081.

Méndez-Alvarez, S. Pérez-Roth, E. (2004). La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enferm Infec Microbiol Clin*. 22:183-92.

Montes de Oca, S. Victorero, A. (2014). Síndrome de Guillain-Barré. *Rev Ciencias Médicas.*, 18(2):275-283.

Mota, MI. Gadea, MP. González, S. González, G. Pardo, L. Sirok, A. *et al.* (2010). Bacterial pathogens associated with bloody diarrhea in Uruguayan children. *Rev Arg Microbiol*. 42: 114-117.

Murray, P. Rosenthal, K. Pfaller, M. (2014). *Microbiología médica*. (7ª Ed). Barcelona: España.

Orden, J. De la Fuente, R. (2001). Implications on publichealth of quinolone resistance in bacteria of animal origin. *Rev Esp Salud Pública*, Madrid; 75, (4).

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, 2012–2015.

Orrietta, L. (2009). Tesis de Grado. *Monitoreo de la resistencia Antimicrobiana de Campylobacter spp.*, en cuatro hospitales de la ciudad de la Paz-Bolivia2005-2006. Universidad Mayor de San Andres. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas.

Oliva, R. Ballesta, F. Oriola, J. Claria, J. (2008). *Genética Médica*. (1ª Ed). Barcelona: España.

Prats, G. (2012). *Microbiología y parasitología médicas*. (1ª Ed).Madrid: España

Perales, M. Camiña, M. Quiñones, C. (2002). Infección por *Campylobacter* y *Shigella* como causa de diarrea aguda acuosa en niños menores de dos años en el distrito de La Victoria, Lima – Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*; 19 (4):186-92.

Pinto, D. (2004). Determinación de frecuencia de *Campylobacter* por método del filtro en niños menores a cinco años con gastroenteritis atendidos en el Hospital del niño “Ovidio Aliaga” y Municipal Boliviano Holandés de La Paz y el Alto, Tesis de Grado, pp. 55 – 70.

Poly, F. Guerry, P. (2008). Pathogenesis of *Campylobacter*. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 24, 2731.

Rapp, D. Ross, M. Pleydell, E. J. & Muirhead, W. (2012). Differences in the fecal concentrations and genetic diversities of *Campylobacter jejuni* populations among individual cows in two dairy herds. *Applied & Environmental Microbiology*, 78, 7564-7571.

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. *Rev Chil Infect.*, 28 (6), 555- 562.

Sangaré, L. Nikiéma, A. K. Zimmermann, I. Sanou, M. Congo, A. Diabaté, S. Diandé, P. I. (2012). *CAMPYLOBACTER SPP. EPIDEMIOLOGY AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY IN A DEVELOPING COUNTRY, BURKINA FASO (WEST AFRICA)*. *Rev. Exper. Microbiol*, 13(2), 106-111

Sazetenea, R. (2003). Shigella, *Campylobacter* como Agentes Etiológicos de diarrea aguda de niños menores de cinco años en dos distritos de salud de La Paz. Tesis de Grado, pp. 53 – 54.

Spicer, J. (2009). *Microbiología clínica y enfermedades infecciosas*. (2ª Ed). Barcelona: España.

Silva, J. Leite, D. Fernandes, M. Mena, C. Gibbs, P. A. (2011). *Campylobacter spp.* as a Foodborne Pathogen: A Review. *Front Microbiol* 2-200.

Síndrome de Guillain-Barré. Recuperado de: http://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/el_sindrome_de_guillain_barre.htm

Szymanski M., Wren BW., (2005). Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens. *Nat Rev Microbiol* 3(3): 225-237.

Tamborini, A. Casabona, L. Viñas, M. Asato, V. Hoffer, A. Farage, 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.

Tam, C. C. O'Brien, S. J. Petersen, I. Islam, A. Hayward, A., & Rodriguez, L. C. (2007). Guillain-Barré syndrome and preceding infection with *Campylobacter*, influenza and Epstein-Barr virus in the General Practice Research Database. *PLoS ONE*, 2(April), 1–6. doi:10.1371/journal.pone.0000344

Thomas, M. K. Murray, R. Flockhart, L. Pintar, K. Pollari, F. Fazil, A. et al. (2013). Estimates of the burden of foodborne illness in Canada for 30 specified pathogens and unspecified agents, circa 2006. *Foodborne Pathogens & Disease*, 10, 639-648.

Van Deun, K. Haesebrouck, F. Heyndrickx, M. Favoreel, H. Dewulf, J. Ceelen, L. Dumez, L. Messens, W. Leleu, S. Van Immerseel, F. Ducatelle, R. Pasmans, F. (2007). Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. *J. Med. Microbiol.* 56, 1284-1289.

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), ajtmh.13-0744-. doi:10.4269/ajtmh.13-0744

World Health Organisation. (2009). *More research needed into childhood diarrhoea*. Recuperado de http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2009/diarrhoea_research_20090310/es/#

World Health Organisation. (2013). *Enfermedades diarreicas*. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/> Instituto Nacional de Trastorno Neurológicos y Accidentes Cerebrovasculares. (2007).

World Health Organisation. (2013). *Un nuevo plan contra la neumonía y la diarrea podría salvar las vidas de 2 millones de niños y niñas al año*. Recuperado de http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/pneumonia_diarrhoea_plan_20130412/es/

World Health Organisation. (2014). *Antimicrobial Resistance*. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/#14>

Yamazaki-Matsune, 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, 1467-1473. doi:10.1099/jmm.0.47363-0

Young KT., Davis LM., Dirita VJ. (2007). *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 5(9): 665-679.

ANEXOS

ANEXO 1. PREPARACIÓN DE MEDIO SÓLIDO SELECTIVO BUTZLER (1000 ml).

- Trabajar en condiciones asépticas.
- Preparar los medios de cultivo de acuerdo a las especificaciones de la etiqueta Brain Heart Infusion (OXOID) and Yeast Extract (OXOID).
- Pesar y colocar los distintos componentes según cálculos en un frasco de vidrio graduado de 1L.
- Mezclar homogéneamente hasta disolver completamente.
- Aforar con agua destilada hasta alcanzar un volumen de 970 ml.
- Medir el pH a 7.
- Autoclavar el medio.
- Agregar 10 ml de antibiótico Butzler y sangre humana o de cordero al 5%.
- Dispensar en placas Petri.
- Conservar en refrigeración a 4°C.

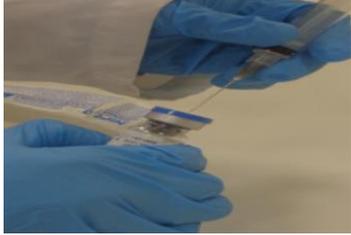
PROCESO PARA MEDIR PH DE MEDIOS DE CULTIVOS.

- Trabajar en condiciones asépticas.
- Encender el pHímetro y agitador magnético.
- Colocar el frasco con medio sobre agitador magnético.
- Lavar y secar cuidadosamente el electrodo con agua destilada.
- Introducir el electrodo sobre el frasco.
- Esperar unos segundos y hacer lectura.
- Repetir pasos anteriores hasta ajustar el pH deseado.
- Limpiar y apagar el pHímetro.

NOTA

Si tras la lectura se obtiene un valor elevado al deseado 7 (+/- 0,2) se utiliza ácido clorhídrico para bajar y obtener el valor óptimo. Si se obtiene un valor bajo a lo requerido, se utiliza hidróxido de sodio para subir el mismo.

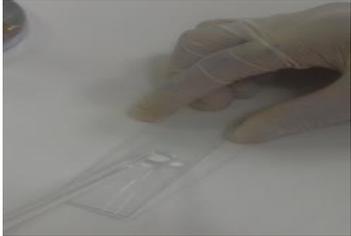
RECONSTITUCIÓN DEL ANTIBIÓTICO.

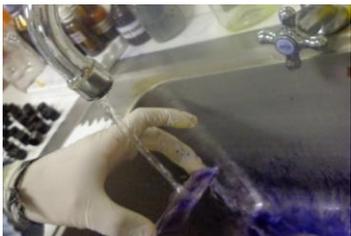
<p>➤ Sacar el antibiótico Butzler de refrigeración para que alcance una temperatura ambiente.</p>	
<p>➤ Tomar con una jeringa de 5 ml o 10 ml agua destilada estéril.</p>	
<p>➤ Introducir el agua estéril por la parte superior del vial del antibiótico (por las paredes).</p>	
<p>➤ Agitar lentamente hasta que se disuelva completamente evitando la formación de burbujas y verter sobre el medio de cultivo.</p>	

DISPENSACIÓN DEL MEDIO.

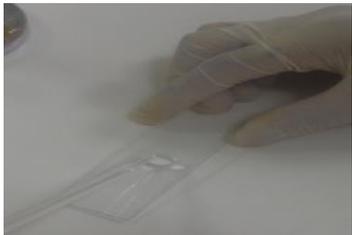
- Trabajar en la cabina de flujo laminar.
- Encender el UV de la cabina 30 minutos antes de empezar a trabajar.
- Sacar el medio Butzler del autoclave y dejar que alcance una temperatura de 50°C para agregar la sangre humana o de cordero al 5% y antibiótico Butzler.
- Dispensar el medio en cajas Petri y almacenar en refrigeración a 4°C en dirección boca abajo y dejar una caja en la estufa a 37°C por 24 h para control.

ANEXO 2. TINCIÓN GRAM.

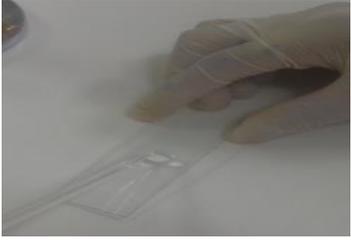
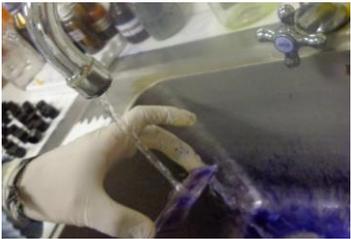
<ul style="list-style-type: none">➤ Preparar un frotis de la muestra.	
<ul style="list-style-type: none">➤ Cubrir con cristal violeta por 1 minuto y lavar con abundante agua.	
<ul style="list-style-type: none">➤ Cubrir con lugol por 1 minuto y lavar con abundante agua.	
<ul style="list-style-type: none">➤ Cubrir con alcohol cetona por 30 segundos y lavar con abundante agua.	

<p>➤ Finalmente cubrir la muestra con safranina por un minuto.</p>	
<p>➤ Lavar con abundante agua y dejar secar.</p>	

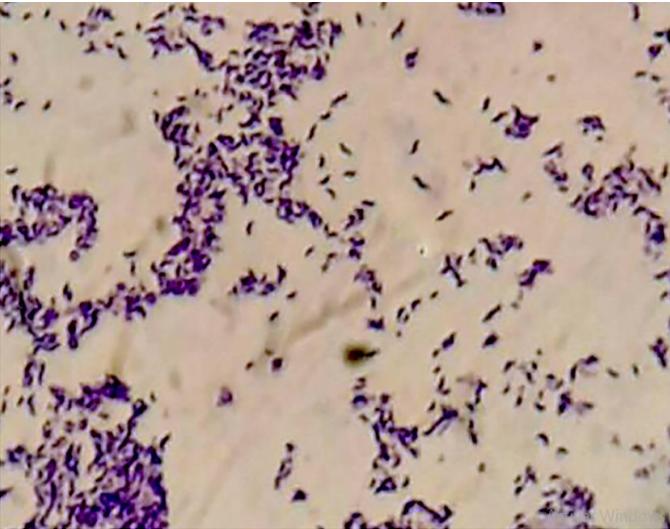
ANEXO 3. TINCIÓN VAGÓ.

<p>➤ Fijar la muestra.</p>	
<p>➤ Colorear con mercurio cromo durante 4 minutos y lavar con abundante agua.</p>	
<p>➤ Colorear con cristal violeta por dos minutos y lavar con abundante agua y dejar secar.</p>	

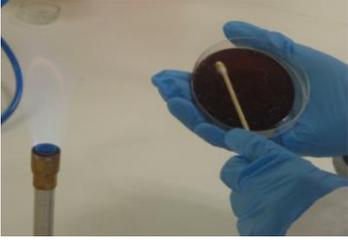
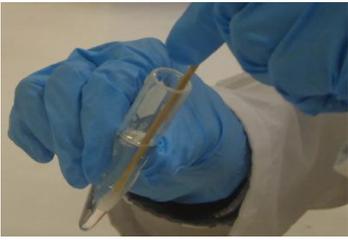
ANEXO 4. TINCIÓN DE HUCKER.

<ul style="list-style-type: none">➤ Preparar un frotis de la muestra.	
<ul style="list-style-type: none">➤ Cubrir con tinción de Hucker y bicarbonato de sodio simultáneamente por 2 minutos.	
<ul style="list-style-type: none">➤ Lavar con abundante agua y dejar secar.	

ANEXO 5. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA.

<ul style="list-style-type: none">➤ Tamaño aproximado de 0,2 a 0,5 μm de ancho y 0,5 a 5,0 μm de largo.	
<ul style="list-style-type: none">➤ Estructuras curvas en forma de gaviota.➤ Con una vista de 100X, aceite de inmersión y condensador arriba.	

ANEXO 6. FILTRADO.

<p>➤ Tomar con un asa estéril la(s) colonias sospechosas.</p>	
<p>➤ Verter las colonias en un tubo de 10 ml con agua destilada.</p>	
<p>➤ Homogenizar con ayuda del Vortex.</p>	
<p>➤ Tomar 200 μL de solución y depositar sobre el papel milli pore de 0,45 μm que es colocada en la placa.</p>	
<p>➤ Esperar 20 minutos, sacar el papel filtro e incubar a 42°C por 48h.</p>	

ANEXO 7. CRIOCONSERVACIÓN.

<p>➤ Tomar las medidas de asepsia necesaria y encender el UV de la cabina por 30 minutos.</p>	
<p>➤ Etiquetar cada tubo cryobank.</p>	
<p>➤ Humedecer el hisopo con la glicerina del tubo y tomar todas las colonias de la placa.</p>	
<p>➤ Colocar el hisopo dentro del tubo para almacenar las colonias.</p>	
<p>➤ Cerrar el tubo y realizar giros de 180°C de 5 a 6 veces.</p>	

<ul style="list-style-type: none"> ➤ Dejar reposar el tubo 10 minutos boca abajo, extraer la glicerina del tubo y conservar a - 70 °C. 	
---	--

ANEXO 8. PREPARACIÓN DE HIPURATO DE SODIO (100 ml).

- Pesar 1 g de hipurato de sodio.
- Diluir en 100 ml de agua destilada.
- Refrigerar a 4 °C.

ANEXO 9. PREPARACIÓN DE NINHIDRINA (100 ml).

- Pesar 3.5 g de ninhidrina.
- Diluir en 50 ml de acetona y 50 ml de butanol.
- Conservar y refrigerar en un frasco ámbar a 4°C.

ANEXO 10. EXTRACCIÓN DE DNA.

- Colocar 200 µl 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 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) y eliminar el sobrenadante y colocar 200 µl de PBS.
- Añadir 25 µl de OB proteasa Solution dar vortex para homogenizar bien y añadir 220 µl de BL buffer.
- Incubar a 70°C durante 10 minutos, dar vortex durante la incubación, (a los 5 min) por una vez.
- Añadir 220 µl de etanol al 100% dar vórtex para mezclar bien.
- Insertar una mini columna en un tubo de recogida de 2 ml.
- Transferir toda la muestra a partir del paso 5 a la columna HiBind DNAMini incluyendo cualquier precipitado que pueda haberse formado (este proceso se lo realiza con la pipeta).

- Centrifugar a velocidad máxima durante 1 minuto y desechar el filtrado y reutilizar el tubo de recogida.
- Añadir 500 µl de HBC buffer y centrifugar a máxima velocidad durante 30s.
- Descartar el tubo de recolección y colocar la columna en un nuevo tubo de 2 ml.
- Añadir 700 µl de DNA wash buffer.
- Centrifugar a máxima velocidad durante 30s y descartar el filtrado y reutilizar el tubo de recogida.
- Repetir los pasos 13 y 15 para una segunda etapa de lavado de DNA tampón de lavado.
- Centrifugar la columna a la velocidad máxima durante 2 minutos para secar.
- Transferir la columna en un tubo de 1,5 ml libre de nucleasa y añadir 100-200 µl del tampón de elución caliente a 70°C.
- Dejar reposar a temperatura ambiente 2 min y centrifugar a la velocidad máxima durante 1 minuto.
- Repita los pasos 19 a 21 para la segunda etapa de elución y conservar a -20 °C.

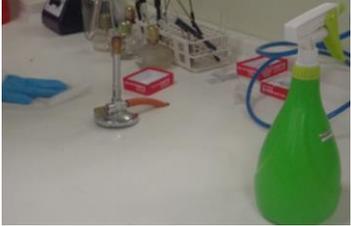
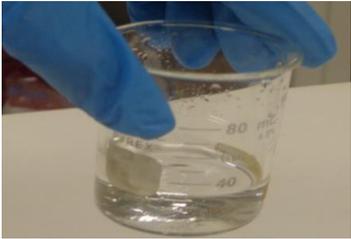
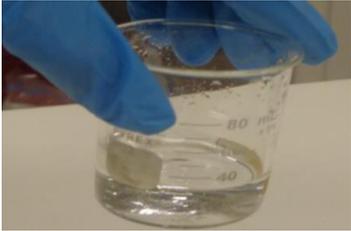
ANEXO 11. CONDICIONES DE MULTIPLEX-PCR.

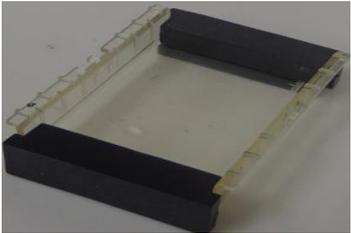
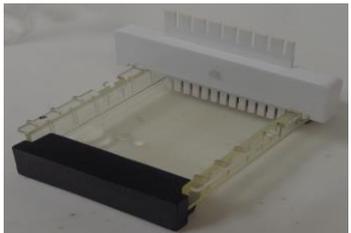
MIX PCR

Especies	Componentes	Volumen (µl)
	Buffer	5,00
	dNTPs	0,50
	Cl2Mg	1,50
	Primers:	
<i>Campylobacter</i>	C412F	0,05
	C1228R	0,05
<i>C. jejuni</i>	C-1	0,05
	C-3	0,05
<i>C. coli</i>	CC18F	0,05
	CC519R	0,05
<i>C. upsaliensis</i>	CU61F	0,05
	CU146R	0,05
<i>C. fetus</i>	MG3F	0,05
	CF359R	0,05
<i>C. lari</i>	CLF	0,05
	CLR	0,05
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	HYO1F	0,05
	HYOFET235R	0,05
	Taq	0,125
	H2O	16,17
	DNA	1,00
Volumen final		25,00

Condiciones:	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización inicial	95	15
Desnaturalización	95	0,5
Anillamiento	58	1,5
Extensión	72	1
Extensión final	72	7

ANEXO 12. PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA 1,5%.

<p>➤ Tomar las medidas de asepsia necesaria.</p>	 A photograph of a laboratory bench. In the foreground, there is a green spray bottle. In the background, there are various pieces of laboratory equipment, including a Bunsen burner, a pipette, and some boxes. A pair of blue gloves is also visible on the bench.
<p>➤ Pesar 0,525 g de agarosa.</p>	 A photograph of an analytical balance scale. The scale is white and has a glass enclosure. The weighing pan is visible inside the enclosure.
<p>➤ Colocar la cantidad pesada en un vaso de precipitación de 100 ml y disolver con buffer TBE 1X (35 ml).</p>	 A photograph of a clear glass beaker containing a small amount of white powder (agarose) and a small amount of clear liquid (buffer). A person wearing blue gloves is holding the beaker.
<p>➤ Mezclar homogéneamente hasta disolver completamente.</p>	 A photograph of a clear glass beaker containing a small amount of white powder (agarose) and a small amount of clear liquid (buffer). A person wearing blue gloves is holding the beaker.
<p>➤ Se calienta por 2 ciclos de 40 segundos y 1 ciclo de 20 segundos en el microondas (invertir system inside Panasonic).</p>	 A photograph of a microwave oven. The microwave is white and has a digital display and buttons on the right side. The door is closed.

<p>➤ Tras alcanzar una correcta disolución del agar colocar 3µl de <i>Syber safe</i> y dispensar en el soporte del gel con los peines de electroforesis, dejar reposar de 15 a 20 minutos.</p>	
<p>➤ Extraer la peinetita del gel y trasladar el gel a la cubeta de electroforesis que contiene buffer de corrido.</p>	

ANEXO 13. PREPARACIÓN EDTA (Ácido etildiaminotetraacético).

- Pesar 93 g de EDTA.
- Disolver en 500 ml de agua destilada y desionizada.
- Ajustar pH a 7 y autoclavar.
- Refrigerar a 4°C.

ANEXO 14. PREPARACIÓN DE BUFFER TBE 10X (Tris, Borato y EDTA) (1000 ml).

- Tomar 20 ml de EDTA preparado y aforar a 1000 ml.
- Adicionar 54 g de Tris y disolver.
- Agregar ácido bórico (27,59 g) para ajustar pH 7.
- Proteger de la luz.
- Refrigerar a 4°C.

ANEXO 15. ANTIBIOGRAMA.

- Suspender con un hisopo estéril no más de tres colonias bacterianas en un tubo que contenga 5 ml de suero fisiológico.
- Homogenizar la muestra en el Vortex por 30 segundos.
- Suspender un hisopo estéril en el tubo con la mezcla y sembrar en medio Mueller Hinton más 5% de sangre de cordero.
- Colocar los diferentes discos de antibióticos: (CIP-5 ug), (AMP-10 ug), (AMC- 20/10 ug), (TE- 30 ug), (GM 120 ug).
- Colocar las placas en recipiente o jarra de anaerobiosis en conjunto de un parche de aerobiosis *CampyGen*TM 2,5L.
- Incubar a 42°C por 48 h.
- Pasadas las 48 h hacer lecturas de cada antibiograma.

ANEXO16. PREPARACIÓN DE MEDIO MUELLER HINTON.

- Trabajar en condiciones asépticas.
- Preparar los medios de cultivo de acuerdo a las especificaciones de la etiqueta. Muller Hinton (OXOID) and Yeast Extract (OXOID).
- Pesar y colocar los distintos componentes según cálculos en un frasco de vidrio graduado de 1L.
- Mezclar homogéneamente hasta disolver completamente.
- Aforar con agua destilada hasta alcanzar un volumen de 970 ml.
- Medir el pH hasta alcanzar un pH 7.
- Autoclavar medio.
- Agregar sangre humana o de cordero al 5% y dispensar en placas Petri.
- Conservar en refrigeración a 4 °C.