



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Estudio de prevalencia de Especies de *Campylobacter* (*C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. coli*) en animales de corral y perros en el Sur del Ecuador.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Núñez Montoya, Andrea Carolina

DIRECTORA: Simaluiza Masabanda, Rosa Janneth, Mgtr

LOJA – ECUADOR

2016



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2016

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: **“Estudio de prevalencia de Especies de *Campylobacter* (*C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. coli*) en animales de corral y perros en el Sur del Ecuador”** realizado por: Núñez Montoya Andrea Carolina, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Enero de 2016

f).....

Mgtr. Rosa Janneth Simaluiza Masabanda.

DECLARATORIA DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Núñez Montoya Andrea Carolina declaro ser autor (a) del presente trabajo de titulación: **“Estudio de prevalencia de Especies de *Campylobacter (C. jejuni subsp. jejuni, C. coli)* en animales de corral y perros en el Sur del Ecuador”**, 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: Andrea Carolina Núñez Montoya

Cédula: 1003434006

DEDICATORIA

“No temas porque yo te redimí; te puse nombre, mío eres tú. Cuando pases por las aguas, yo estaré contigo; y si por los ríos, no te anegarán. Cuando pases por el fuego, no te quemarás, ni llama arderá en ti. Porque Jehová, Dios tuyo, el Santo de Israel, soy tu Salvador”.

Isaías 43

El presente trabajo quiero dedicarlo al amor y dueño de mi vida, al forjador de mi camino, a mi Padre Celestial, porque ha cumplido su promesa haciendo posible conseguir juntos esta meta. A mi ángel, por inspirarme a superarme.

A mis padres, quienes me han motivado a salir adelante, y me han enseñado a luchar con respeto y dignidad por cada uno de mis ideales.

A mis abuelitos, que con su ternura han inspirado en mi fortaleza para superar todas las adversidades que se han presentado en el camino.

A mis hermanos, quienes con su alegría me han llenado de felicidad y orgullo.

A mis primos y tíos, quienes me han apoyado con mucho amor en el transcurso del camino por conseguir este triunfo.

A mis familiares y amigos, por apoyarme, fortalecerme y motivarme a continuar esforzándome para alcanzar esta meta.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle a mi Padre Celestial, por amarme de una manera especial, por su fidelidad perfecta, por concederme hasta el deseo más íntimo de mi corazón, por darle una razón de ser a mi vida y mi inspiración, por esforzarme todos los días para convertirme en alguien mejor.

A mis padres, quienes con su amor, paciencia y apoyo incondicional me han acompañado en cada paso del caminar de mi vida, inculcando valores y principios que han hecho de mí una buena persona.

A mis abuelitos, quienes han llenado mi vida de amor y sabiduría con sus consejos, por ser uno de los pilares de mi vida, por enseñarme el arte de amar y por haber contribuido intensamente en mi formación personal.

A mis hermanos, por darme alegría y satisfacciones, por ser mi orgullo y motivación.

A mis primos y tíos, por su solidaridad y apoyo, por fortalecerme e impulsarme a luchar por mis objetivos.

A mis familiares y amigos, por apoyarme en todo momento, por acompañarme en mis alegrías y mis tristezas y por esa amistad incondicional que me han brindado desde siempre.

Al Dr. Heriberto Fernández, Bq.F. Zorayda Toledo, Bq.F. Sofía Ochoa, a mis compañeros Jonson e Iliana, y especialmente a mi directora Mgtr. Janneth Simaluiza, siento un profundo agradecimiento por compartir conmigo desinteresadamente todos los conocimientos y experiencias profesionales, por haberme orientado en cada inquietud en el desarrollo de esta investigación. Gracias sobre todo por su calidad humana.

A mis hermanas y hermanos, Misioneros y Misioneras Identes, por brindarme su amistad y cariño, y por cada uno de los inolvidables momentos que compartimos junto a nuestro Padre Celestial.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA	i
APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARATORIA DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE GRÁFICAS	xi
ABREVIATURAS	xii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.....	6
MARCO TEÓRICO	6
1.1 Antecedentes.....	7
1.2 Género <i>Campylobacter</i>	8
1.2.1 Morfología y crecimiento.....	8
1.2.2 Reservorios	9
1.2.3 Mecanismos de transmisión	9
1.2.4 Viabilidad y periodos de Incubación.....	10
1.2.5 Patogenia	11
1.2.6 Sintomatología y lesiones en aves de corral y perros	12
1.2.7 Diagnóstico.....	13
1.3 Principales especies zoonóticas de <i>Campylobacter</i>	15

1.3.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	15
1.3.2	<i>Campylobacter coli</i>	16
1.3.3	<i>Campylobacter lari</i>	17
1.3.4	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	17
1.3.5	<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	18
1.3.6	<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	18
1.4	Actividad Antimicrobiana	19
CAPÍTULO II		20
2	METODOLOGÍA	20
2.1	Población de Estudio	21
2.2	Características generales del lugar de muestreo.	21
2.3	Identificación fenotípica de <i>Campylobacter</i> spp en aves de corral y perros.	22
2.3.1	Siembra e Incubación	22
2.3.2	Aislamiento y Purificación	23
2.3.3	Pruebas bioquímicas	24
2.4	Identificación molecular de <i>Campylobacter</i> spp.	24
2.5	Actividad Antimicrobiana	25
CAPÍTULO III		26
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
3.1	Prevalencia de <i>Campylobacter</i> spp en aves de corral.	27
3.2	Identificación de especies de <i>Campylobacter</i> en aves de corral.	29
3.3	Prevalencia de <i>Campylobacter</i> spp en perros	31
3.4	Identificación de especies de <i>Campylobacter</i> en perros.	32
3.5	Análisis molecular de <i>Campylobacter</i> spp en aves de corral y perros	34
3.6	Actividad antimicrobiana de seis antibióticos frente a <i>Campylobacter</i> spp en aves de corral.	35

3.7 Actividad antimicrobiana de seis antibióticos frente a <i>Campylobacter</i> spp en perros.....	36
CONCLUSIONES	38
RECOMENDACIONES.....	39
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	40
ANEXOS.....	49
PROTOCOLOS	50
ANEXO 1: Toma de muestras en aves de corral	50
ANEXO 2: Toma de muestras en perros	51
ANEXO 3: Medio de transporte para <i>Campylobacter</i>	52
ANEXO 4: Preparación de medios de cultivo	53
ANEXO 5: Tinción de Hucker	54
ANEXO 6: Método de filtración en membrana de nitrocelulosa	55
ANEXO 7: Crioconservación	56
ANEXO 8: Pruebas bioquímicas para identificación de <i>Campylobacter</i> spp.....	57
ANEXO 9: Extracción de ADN bacteriano	59
ANEXO 10: PCR Múltiple para <i>Campylobacter</i> spp.....	60
ANEXO 11: Electroforesis en gel de agarosa.....	62
ANEXO 12: Determinación de la Actividad Antimicrobiana.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Localización de las provincias muestreadas.....	21
Figura 2.	Aves de corral muestreadas en Vilcabamba-Loja.	22
Figura 3.	Cepas de <i>Campylobacter</i> spp aisladas en aves de corral.....	23
Figura 4.	Electroforesis de especies de <i>Campylobacter</i> spp.	34
Figura 6.	Hisopado cloacal en aves de corral.	50
Figura 7.	Recolección de muestras de materia fecal en perros.....	51
Figura 8.	<i>Campylobacter</i> spp visto desde microscopio óptico	54
Figura 9.	Filtración en membrana de Nitro-celulosa.	55
Figura 10.	Crioconservación de <i>Campylobacter</i> spp.	56
Figura 11.	Catalasa y oxidasa en <i>Campylobacter</i> spp.....	57
Figura 12.	Hidrólisis del hipurato.	58
Figura 13.	PCR Múltiplex en gel de agarosa.....	62
Figura 14.	Antibiograma de las cepas de <i>Campylobacter</i> spp.....	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de cebadores utilizados para PCR Múltiplex para identificación de especies de <i>Campylobacter</i> spp.....	25
Tabla 2. Prevalencia de <i>Campylobacter</i> spp en aves de corral.	27
Tabla 3. Identificación de especies de <i>Campylobacter</i> en aves de corral.	29
Tabla 4. Prevalencia de <i>Campylobacter</i> spp en materia fecal de perros.	31
Tabla 5. Identificación de especies de <i>Campylobacter</i> en perros.	33
Tabla 6. Máster mix para PCR Múltiplex.	60
Tabla 7. Condiciones de temperaturas para PCR Múltiplex.....	60
Tabla 8. Temperaturas de anillamiento para PCR Múltiplex.	61
Tabla 9. Puntos de corte para lecturas de antibiogramas.	63

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Actividad antimicrobiana de seis antibióticos frente a <i>Campylobacter</i> en gallinas	35
Gráfica 2. Actividad antimicrobiana de seis antibióticos frente a <i>Campylobacter</i> en perros	36

ABREVIATURAS

<i>CadF</i>	Gen que codifica una proteína de unión a fibronectina
CA-SFM	Comité de Antibiograma de la Sociedad Francesa de Infectología
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
Cdc42	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>
CDT`s	<i>Cytolethal distending toxins</i>
CdtA	Citotoxinas de Distensión tipo A
<i>cdtA</i>	Gen que codifica las citotoxinas de distensión tipo A
CdtB	Citotoxinas de Distensión tipo B
<i>cdtB</i>	Gen que codifica las citotoxinas de distensión tipo B
CdtC	Citotoxinas de Distensión tipo C
<i>cdtC</i>	Gen que codifica las citotoxinas de distensión tipo C
DNAasa	Enzimas hidrolasas Desoxirribonucleasas
EUCAST	Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana
FlaA	Flagelina tipo A
<i>flaA</i>	Gen que codifica la Flagelina tipo A
FlaB	Flagelina tipo B
<i>flaB</i>	Gen que codifica la Flagelina tipo B
GTPasas	Enzima guanosina trifosfatasa
INT-407	Células Intestinales (epiteliales) tipo INT-407
ISP	Instituto de Salud Pública de Chile
<i>plda</i>	Gen que codifica la producción de la fosfolipasa
WHO	<i>World Health Organization</i>

RESUMEN

Campylobacter es una bacteria zoonótica que posee una amplia distribución en la naturaleza tanto en animales domésticos como animales de vida silvestre, es considerado como uno de los agentes principales causantes de gastroenteritis bacteriana a nivel mundial. Con la finalidad de conocer la prevalencia de *Campylobacter* en las principales fuentes de infección para el hombre en nuestra región, se realizó un estudio epidemiológico de los reservorios más comunes de *Campylobacter* spp en el sur del Ecuador. Se recolectaron 120 muestras de hisopados cloacales de gallinas de campo, donde la prevalencia para *Campylobacter* spp fue del 42%; el 78% de *C. jejuni* y 22% *C. coli*. En la materia fecal de perros se analizaron 70 muestras cuya prevalencia fue del 10% para *Campylobacter* spp con el 57% de *C. coli* y 43% *C. jejuni*. Los análisis de la actividad antimicrobiana presentaron 100% de resistencia a la ciprofloxacina y 100% de sensibilidad frente a la eritromicina, gentamicina y amoxicilina/ácido clavulánico en cepas aisladas de gallinas y perros.

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

ABSTRACT

Campylobacter is a zoonotic bacterium, which has a wide distribution in nature, specifically in pets and wildlife animals. It is considered one of the major agents responsible of the bacterial gastroenteritis worldwide. In order to know the prevalence of *Campylobacter* of the main sources of infection for humans in our region, an epidemiological study of the most common reservoirs of *Campylobacter* spp was performed in the South of Ecuador. One hundred twenty samples of cloacal swabs of hens were collected, where the prevalence of *Campylobacter* spp was 42%; with a rate of 78% of *C. jejuni* and 22% of *C. coli*. Seventy dog feces samples were analyzed. The prevalence was 10% for *Campylobacter* spp with a rate of 57% of *C. coli* and 43% of *C. jejuni*. The analysis of antimicrobial activity showed a resistance of 100% to ciprofloxacin and 100% of sensitivity to erythromycin, gentamicin and amoxicillin/clavulanic acid in hens and dogs.

Keywords: *Campylobacter*, *C. jejuni*, *C. coli*, chickens, dogs.

INTRODUCCIÓN

El género *Campylobacter* es un agente patógeno de fundamental importancia en la Salud Pública en todo el mundo, debido a que ha sido catalogado como una bacteria zoonótica de amplia distribución en la naturaleza y responsable de varios casos de enfermedades diarreicas transmitidas por alimentos. Con frecuencia *Campylobacter* afecta a humanos en todos los grupos de edad, pero tienen mayor incidencia en niños menores de 5 años. En España, un estudio reportó que el 56% de los casos era de niños menores de 5 años y el 13% de los casos oscilaba entre 5 y 9 años. Los casos clínicos están asociados a cuadros clínicos de diarrea complicada que requiere hospitalización, sin embargo la manifestación clínica del paciente es muy variable (Rivera *et al.*, 2011). Las especies termotolerantes que han tenido mayor influencia en los brotes epidemiológicos en humanos han sido *C. jejuni* seguido de *C. coli*.

El principal reservorio de *Campylobacter* spp es el tracto intestinal de aves y mamíferos tanto domésticos como salvajes. La variedad de reservorios se encuentra asociado de acuerdo a la especie, por ejemplo *C. jejuni* es la especie que está mayormente difundida en los animales mientras que *C. coli* ha sido aislada con mayor frecuencia en cerdos. La campylobacteriosis está vinculada al contacto directo con sus reservorios naturales o al contacto indirecto por el consumo de alimentos contaminados como agua, leche y carnes, principalmente carne de pollo. No obstante, se debe también considerar la contaminación por convivencia con animales domésticos, además de encontrarnos permanentemente expuestos a animales de vida silvestre como palomas, gorriones, roedores, etc. En las infecciones producidas por las especies de *Campylobacter* el 80% corresponde a *C. jejuni* y el 10% a *C. coli* (AESAN, 2012).

En Estados Unidos, se registra a *Campylobacter* spp como una de las causas más comunes de enfermedad diarreica, además datos de la FoodNet, red de vigilancia activa del país, reporta que se diagnostican 14 casos cada año por cada 100000 habitantes (CDC, 2013).

En los países de América del Sur la incidencia de *C. jejuni* es más frecuente, aunque la incidencia de *C. coli* es mayor a la que se presenta usualmente en países industrializados, con un valor del 25% de casos de diarrea producidas por especies del género frente a una frecuencia del 5-10% en países industrializados (Fernández, 2011).

La contaminación de alimentos por *Campylobacter* spp constituye la fuente de infección más común en las personas. En el Ecuador, la producción de pollos de carne se ha desarrollado y diseminado a lo largo de la historia debido a que existe una gran demanda por parte de la población por las carnes blancas. Existen registros del régimen alimenticio entre los años

2011 al 2013 que revelan cifras del 18% correspondiente al consumo de carne de pollo, 8% carne de res, 8% pescados y mariscos, y el 47% restante se atribuye a otras proteínas de origen diferente. El consumo per cápita de carne de pollo en el país actualmente es de 43,5 kilos al año (ENSANUT-ECU, 2011-2013).

En Chile, se registra que en el 2013, la carne de aves representó un 42% del total de consumo cárnico interno, resaltando que la carne de pollo es más cotizada debido a su bajo costo y accesibilidad de los consumidores (ODEPA, 2014).

En Bolivia, el consumo promedio de carne de pollo ascendió en los últimos siete años del 2007-2014 de 23,43 a 35,52 kilos (Manzilla, 2015).

En Paraguay, un estudio de la cadena avícola que realizó el Viceministerio de Ganadería refleja que el consumo de carne de pollo en el 2004 era de 6,3 kilos por persona, por año; mientras que en la actualidad surge una elevación de la tasa de consumo a 18,5 kilos por persona, por año.

Un estudio de proyecciones donde participaron importantes instituciones del sector agrario determina que la demanda mundial de carne y las importaciones presentarán un fuerte crecimiento del 1,8% al año. Según la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización para la cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) presumen que el crecimiento de consumo de carne de pollo será del 2% al año en esta década (COBB, 2015).

En cuanto a perros domésticos, casi no existen estudios que indiquen la incidencia de *Campylobacter* spp en este reservorio. Sin embargo, se asocian infecciones producidas por esta bacteria en humanos por el contacto con animales domésticos, resaltando que los grupos más vulnerables comprenden niños menores de 3 años que cohabitan con perros y en algunos casos aves de corral (Tenkate & Stafford, 2001).

Un estudio en Chile revela que la tasa de aislamiento de *Campylobacter* fue más común en perros jóvenes y se observó una incidencia significativamente mayor en perros callejeros que en perros domésticos. También los resultados obtenidos en esta investigación relacionan las infecciones de parvovirus canino y el transporte de *Campylobacter*, estableciendo que la colonización intestinal con *Campylobacter* puede predisponer a los perros a la infección con parvovirus o producir una infección secundaria aumentando la gravedad de la infección primaria (Gatica, 2013).

En Ecuador, demostraron en un estudio que *Campylobacter fetus*, es un importante agente enteropatogénico en las zonas periurbanas de la ciudad de Quito y se encuentra vinculado a

condiciones sanitarias deficientes y contacto con personas y animales infectados (Guderian *et al.*, 1987).

En Barbados, en una investigación para determinar los reservorios de *Campylobacter*, reflejó que en una población de estudio de 596 animales, las tasas de aislamiento para *Campylobacter* spp fueron del 94,2% en pollos, 90,5% en cerdos, 46,9% en perros, 37,3% en gatos, 39,3% en aves silvestres y 17,1% en monos. Los resultados obtenidos sugieren que los perros son depósitos significativos de *Campylobacter* y contribuyen a infecciones entéricas en humanos y que la carne de pollo es un vehículo con altas probabilidades de transmisión de esta bacteria a los seres humanos (Workman *et al.*, 2005).

La actividad antimicrobiana es otro factor de importancia clínica en el tratamiento de infecciones producidas por agentes patógenos previniendo la generación de bacterias resistentes. Actualmente no existen estudios que refieren datos de resistencia antimicrobiana de *Campylobacter* en animales de corral y perros en el Ecuador. Sin embargo, el Instituto de Salud Pública (ISP) de Chile, reporta que las tasas de resistencia se presentan con mayor incidencia frente a la ciprofloxacina y tetraciclina del año 2008-2012, en el año 2011 la eritromicina presenta un aumento de la resistencia antimicrobiana del 15%.

Considerando a la campylobacteriosis como una zoonosis frecuente a nivel mundial transmitida principalmente por el consumo de carne de pollo y el contacto con animales domésticos, es de gran interés en esta región realizar un estudio de prevalencia de las especies de *Campylobacter* en animales de corral y en perros, sobre todo al no existir trabajos actualizados en el Ecuador, además al ser estos reservorios vehículos de grandes proporciones de esta bacteria, existe un alto riesgo de contaminación en los humanos que puede desencadenar en enfermedades gastrointestinales debido a la frecuencia de consumo de carnes blancas en la población y la elevada tasa de mascotas como el perro presentes en la mayoría de los hogares.

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes

Las primeras especies características del género *Campylobacter* fueron descritas entre los años 1903 y 1913 en el área de microbiología veterinaria. En un estudio de abortos epizooticos en ganado bovino y ovino realizado en el año de 1918 por Mac Faydean y Stockmann junto con la colaboración de Smith, descubrieron la participación de una bacteria espiral y móvil en fluidos fetales y vaginales con características semejantes a la morfología del género *Vibrio* por lo cual, se le asignó el nombre de *Vibrio fetus* (Herrera *et al.*, 1984).

En el año de 1931, Jones aisló un microorganismo con características típicas de “un vibrión” a partir de bovinos con afecciones intestinales al cual llamaron *Vibrio jejuni*.

En 1944, Doyle aisló de muestras de disentería de cerdo un microorganismo con características propias de un espirilo al que denominaron *Vibrio coli*.

Levy, en el año de 1946, realiza un estudio en un brote de gastroenteritis que afectó a 357 pacientes en un penal en Illinois, y observa en exámenes directos la presencia de un 20 % de *Vibrios* en las muestras, resultado que confirmó la primera idea de asociación de “vibriones” microaerófilos con diarreas en humanos.

En 1947, en Francia se describió el primer caso humano comprobado de un aborto séptico provocado por *Vibrio fetus* (Herrera *et al.*, 1984).

En 1957, estudios realizados por E. King en muestras de diferentes fuentes, revelaron que no todas las características de *Vibrios* obtenidas en el estudio corresponden a *Vibrio fetus* y determinó dos grupos con características serológicas y bioquímicas diferentes, mientras algunos eran capaces de crecer a 25 y 37° C, otros lo hacían a 42° C; así King, asignó a éstas bacterias el nombre de “*Vibrios* relacionados”, confirmando que son agentes causales de diarrea aguda. A partir de este informe, es considerado un agente patógeno en humanos además de animales (Malbrán C, 2001).

En 1963, Sebald y Veron, proponen un nuevo género: *Campylobacter*, nombre asignado por los investigadores basado en su morfología, separándolo del género *Vibrio* por no fermentar carbohidratos y por el diferente porcentaje de guanina + citosina en el ADN (*Vibrio*: 42 mol%; *Campylobacter* 33-35 mol%) (Herrera *et al.*, 1984).

Butzler y Skirrow, Bolton y Robertson, Blaser y colaboradores, desarrollaron medios selectivos que permitieron aislar estos microorganismos con relativa facilidad y establecer su participación en diferentes cuadros infecciosos en el hombre (Malbrán C, 2001).

En 1972 Dekeyser y Butzler aislaron los microorganismos de las heces de pacientes con enteritis aguda y mediante una técnica de filtración obtuvieron bastones curvos característicos de *Campylobacter* (Malbrán C, 2001).

1.2 Género *Campylobacter*

Los diversos nombres con los que se han definido a las especies de *Campylobacter* en el transcurso de las investigaciones han generado dificultad en la utilización de una nomenclatura universal, siendo clasificado en sus primeros estudios dentro del género *Vibrio*. Sin embargo, en años posteriores destacan diferencias fundamentales en sus características moleculares y bioquímicas como son la constitución del ADN y su incapacidad de fermentar hidratos de carbono obteniendo su energía de aminoácidos o intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico no derivados de hidratos de carbono, además son oxidasas positivas; por lo tanto, han sido agrupadas en un nuevo género denominado *Campylobacter* de la familia *Campylobacteriaceae*, compuesta por dos géneros: *Campylobacter* y *Arcobacter* (Malbrán, 2001; Narváez, 2015).

1.2.1 Morfología y crecimiento

El género *Campylobacter* comprende bacterias Gram negativas pequeñas que miden entre 0,3-0,6 μm de diámetro y 0,5-5,0 μm de largo, tienen forma bacilar con aspecto de *Vibrio*, presentan una estructura curva o en forma de S, además poseen un flagelo no envainado único o en ambos extremos, otorgándole una movilidad rápida a modo de sacacorchos. En cultivos viejos degeneran en formas esféricas u ovoides perdiendo su viabilidad.



Microfotografía electrónica de *Campylobacter* spp

Fuente: Hernández *et al.*, 1984

Campylobacter spp crece generalmente en condiciones microaerófilas requiriendo una cantidad de oxígeno que varía entre un 3-10 % a temperaturas de 37 °C y 42 °C \pm 1 °C. La temperatura de crecimiento es una de las características fundamentales que diferencia al género *Campylobacter* del *Arcobacter*, puesto que *Arcobacter* crece a temperaturas que varían entre los 15-34°C además de poseer un solo flagelo en su estructura.

La velocidad de crecimiento de *Campylobacter* es más lenta que la de las bacterias de la microbiota entérica normal, por lo que para su aislamiento a partir de materias fecales requieren medios de cultivo selectivos que inhiban la microbiota acompañante.

1.2.2 Reservorios

La distribución de *Campylobacter* spp es muy amplia en la naturaleza, una gran variedad de animales domésticos y de vida silvestre tales como ganado vacuno, cerdos, ovejas, aves de corral, cabras, perros, gatos y roedores, entre otros, son reservorios naturales de esta bacteria. Las aves de consumo y sus subproductos constituyen uno de los principales reservorios y fuentes de infección para la población que consume éstos alimentos (Cervantes & Cravioto, 2007).

El espectro de reservorios varía con la especie de *Campylobacter*, sin embargo la adquisición primaria del agente contaminante por los animales ocurre en la mayoría de los casos a una edad temprana en su vida y en algunos casos puede ser motivo de morbimortalidad, pero gran parte de éstos animales son portadores del germen de por vida (Franco & Williams, 1999).

En el grupo de los reservorios ambientales han sido considerados el suelo y aguas contaminadas como principales fuentes de brotes de campylobacteriosis, debido a la exposición de los alimentos consumidos por los humanos con el medio ambiente. Aguas estancadas y residuales provenientes de diversas fuentes, como las provenientes de mataderos, plantas de tratamiento de aguas residuales, pantanos y agua de consumo son fuentes donde sobreviven durante semanas *Campylobacter* spp, siendo vías potencialmente infectantes para animales y el hombre (AESAN, 2012).

1.2.3 Mecanismos de transmisión

En los países industrializados *Campylobacter* spp se transmite principalmente a través de alimentos de origen animal principalmente en el consumo de carne de aves de

corral y carne de otros animales con poco tiempo de cocción o mal cocidas, siendo responsables del 50-70% de las infecciones esporádicas (Rivera *et al.*, 2011). Las moscas domésticas pueden participar como vectores mecánicos como fuentes de contaminación. El consumo de carne obtenida de animales infectados, la leche no pasteurizada constituye una fuente frecuente de infección (Franco & Williams, 1999).

En humanos la vía de contaminación es fecal-oral principalmente en personas que son propensas a permanecer en lugares que tengan condiciones sanitarias deficientes y en niños sin control esfinteriano. Otra vía de infección humana menos frecuente es el contacto directo con animales que han sido infectados, ya sean domésticos o como accidente ocupacional en personas que se encuentran expuestas al ganado, por sus actividades rutinarias.

Los reportes de infecciones en humanos adquiridas en el laboratorio son escasos; la transmisión perinatal “in útero”, durante el pasaje a través del canal de parto o durante los primeros días de vida; y la vía transfusional a partir de pacientes infectados (un caso documentado) son casos poco frecuentes para adquirir la infección (Malbrán, 2011).

Los animales de granja como el ganado bovino, ovino y caprino se pueden infectar con *Campylobacter fetus* subsp *fetus* después del contacto con materia fecal, las descargas vaginales, los fetos abortados y las membranas fetales. Este microorganismo y *C. fetus* subsp *venerealis* también se transmiten por vía venérea en el ganado bovino. Las infecciones genitales por *C. fetus* se pueden diseminar a través de fómites, entre ellos el semen, instrumental quirúrgico y las camas contaminadas. Los toros pueden transmitir *C. fetus* durante varias horas, después de aparearse con una vaca infectada; algunos toros se pueden convertir en portadores permanentes. Las vacas también pueden ser portadoras durante varios años (The Center for Food Security & Public Health, 2005).

En animales de corral así como animales domésticos la transmisión del germen es horizontal, debido a que la infección surge pocos días después del nacimiento cuando el animal entra en contacto con materia fecal, otros animales infectados, aguas contaminadas y el medio ambiente.

1.2.4 Viabilidad y periodos de Incubación

Campylobacter spp generalmente pueden sobrevivir en ambientes húmedos, algunas cepas soportan temperaturas de -20 °C, tanto *C. jejuni* como *C. coli* pueden permanecer activas en las camas húmedas de aves de corral durante períodos prolongados, *C. fetus*

puede sobrevivir 24 horas en el estiércol líquido y hasta 20 días en el suelo. En el caso de *C. jejuni*, puede sobrevivir algunas semanas hasta unos pocos meses bajo condiciones de humedad y oxígeno reducido a 4 °C; pero a temperatura ambiente solo pueden sobrevivir unos pocos días. Su viabilidad puede permanecer hasta 9 días en las heces, 3 días en la leche, y de 2-5 días en el agua. Puede sobrevivir en las descargas vaginales o en las pasturas durante varios días bajo condiciones a campo (The Center for Food Security & Public Health, 2005).

Los factores que dificultan la viabilidad de *Campylobacter* spp en alimentos contaminados son el pH y la desecación, la tensión de oxígeno en el aire les inactiva, tienen poca probabilidad de supervivencia a temperaturas inferiores a los 30 °C. La congelación de alimentos es considerado un sistema viable de control de *Campylobacter* spp. Sin embargo, hay que considerar que existen cepas que pueden sobrevivir en estas condiciones durante meses (AESAN, 2012).

El periodo de incubación de las infecciones entéricas por *Campylobacter* en animales suelen ser cortos. Los síntomas de enteritis aparecen dentro de los tres días en los cachorros gnotobióticos, y rápidamente en pollos y pavos recién nacidos. Los abortos en los bovinos suelen ocurrir después de 7-25 días de haber contraído la bacteria (The Center for Food Security & Public Health, 2005).

1.2.5 Patogenia

La campylobacteriosis es una infección producida en el hombre por *C. jejuni* y en menor grado por *C. coli*. Se han descrito episodios de enteritis similares con sintomatología y lesiones en ovinos, bovinos, porcinos y caninos. Sin embargo en todas estas especies animales la infección es muy frecuente y puede involucrar a todos los individuos de una población, los que generalmente no demuestran signos clínicos de la enfermedad.

Los mecanismos de patogenicidad deben considerar factores de adherencia, colonización, invasión y producción de toxinas.

El primer contacto que tiene *Campylobacter* con el hospedador, ocurre en la mucosa intestinal. El patógeno logra adherirse a la mucosa de la pared intestinal, permaneciendo en contacto con la flora intestinal acompañante. Cuanto mayor es el número de bacterias que logran adherirse y atravesar esta capa, más grande será la probabilidad de que logren unirse con las células epiteliales.

En las células epiteliales intestinales la adhesión celular es un proceso reversible, complejo, que se encuentra influenciado por numerosos factores. El flagelo polar compuesto por una flagelina mayor FlaA y una menor FlaB, juega un papel importante para el abordaje de los sitios de unión sobre las células epiteliales del intestino y posterior invasión, incluye quimiotaxis y la secreción de proteínas debido a que *Campylobacter* no posee sistemas de secreción tipo 3 o tipo 4 (SST3 y SST4); que son indispensables en otras especies patógenas (Guerry, 2007; Konkel *et al.*, 2001).

La adhesión de *Campylobacter* a las células epiteliales se ve favorecida por diversos componentes, especialmente por las glicoproteínas de pared (Karlyshev *et al.*, 2000), y por algunas proteínas codificadas por genes como *flaA* (Newell *et al.*, 1985), *cadF* (Ziprin *et al.*, 2001), *ciaB* (Rivera-Amill *et al.*, 2001) y *pldA* (Ziprin *et al.*, 2001).

Una vez adherido *Campylobacter* a las células epiteliales intestinales, se produce una reorganización del citoesqueleto de las células entéricas para el ingreso del patógeno, esta invasión esta mediada por la producción de sustancias extracelulares por parte de la bacteria, denominadas invasinas, que afectan los mecanismos de defensa del hospedador y que se encuentran codificadas por genes, principalmente el *ciaB* y el *pldA* (Ziprin *et al.*, 2001).

Cuando *Campylobacter* ha invadido al hospedador puede sobrevivir por largos periodos de tiempo dentro del epitelio celular, hasta que las condiciones ambientales sean óptimas para la inducción de la respuesta citotóxica (Konkel *et al.*, 2001).

Las citotoxinas de distensión (CDT`s) son responsables del arresto del ciclo celular y la muerte celular en cultivos celulares humanos, la CDT`s que produce *Campylobacter* spp está constituida por tres subunidades codificadas por los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*. La proteína CdtB ingresa en la célula hospedera y se une en la superficie celular con las proteínas CdtA y CdtC produciendo daño en el ADN celular. La subunidad CdtB tiene actividad DNAasa que rompe el ADN iniciando el mecanismo de reparación que concluye con el arresto celular y la muerte de la célula (Cuenca, 2015).

1.2.6 Sintomatología y lesiones en aves de corral y perros

Los animales infectados con *Campylobacter* en su tracto digestivo tienen un comportamiento como portadores asintomáticos, rara vez desarrollan la enfermedad presentando sintomatología.

La contaminación con *Campylobacter* spp en animales de corral está asociada con casos de hepatitis presentando muerte repentina, los pollos que sobrevivieron fueron encontrados con temperaturas altas e hígados agrandados (Burch, 2005).

La colonización de *C. jejuni* en pollos recubre las células epiteliales principalmente del ciego e intestino delgado, pudiendo alcanzar la contaminación del bazo e hígado. La dosis infectante en pollos es muy baja 40 ufc/mL pero pueden alcanzar una proliferación de 10⁹ UFC en el contenido cecal. Los pollos son conocidos como coprófagos y mediante la eliminación de materia fecal es el medio por el cual se difunde la bacteria infectando extremadamente rápido a bandadas de pollos (Newell & Fearnley, 2003).

La colonización de *Campylobacter* spp está asociada con la edad del pollo, en pollos recién nacidos no presentan la existencia de la bacteria hasta la segunda o tercera semana después de la colonización en las naves de pollos sin presentar sintomatología de la infección, se cree a que esta manifestación se presenta debido a la presencia de anticuerpos maternos protectores (Wassenaar, 2011).

Otro factor determinante en la colonización de la bacteria es la especie de ave que ha sido contaminada; así, las gaviotas pueden ser negativas para *Campylobacter* spp hasta un periodo de 4 semanas. La inmunidad adquirida en los pollos induce la respuesta de anticuerpos circulantes y en la mucosa que limitan la colonización de *Campylobacter* spp (Newell & Fearnley, 2003).

En perros domésticos se ha asociado *Campylobacter* spp con algunos procesos entéricos, se describe anomalías intestinales graves asociadas con este agente, como flacidez del intestino delgado y grueso, y contenido espumoso maloliente, a veces con aspecto mucoide. En un examen microscópico del intestino delgado se puede evidenciar uniones y atrofia de las vellosidades e infiltrados linfoplasmocíticos en la lámina propia, mientras que en el colon se pueden llegar a observar erosiones superficiales, aumento del número de linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia e hiperplasia epitelial en las criptas (Brown *et al.*, 1999).

1.2.7 Diagnóstico

En animales de corral solo se considera realizar un diagnóstico epidemiológico debido a que estos reservorios no manifiestan enfermedad, para lo cual se debe tomar un lote definido para evaluar la presencia de *Campylobacter* spp, también debe considerar

incluir en el estudio otros animales que se encuentren cercanos a la población de aves de corral.

En el laboratorio, el protocolo de análisis comienza con un coprocultivo realizado a partir de muestras de materia fecal o hisopados cloacales, este método sigue siendo el que se utiliza de forma rutinaria en la mayoría de los laboratorios de microbiología para detección de agentes patógenos que produzcan enfermedades diarreicas (Abubakar *et al.*, 2007).

En el caso de sospechar de una posible cepa de *Campylobacter* se utiliza un medio selectivo que contenga antibióticos que inhiba la microbiota acompañante del intestino (Medio Selectivo Butzler, CAT o Blaser) en condiciones de microaerofilia durante 48-72 horas.

El examen microscópico de materia fecal fresca, ya sea con la tinción de Gram o con el microscopio de contraste de fases permite la identificación de la morfología espiral y los movimientos rotatorios característicos de *Campylobacter*, confirmando la presencia de la bacteria en el cultivo primario, para posteriormente aislar la cepa pura de la flora microbiana acompañante. La identificación de especies de *Campylobacter* se realiza mediante el análisis de las pruebas bioquímicas como la oxidasa, catalasa o hidrólisis del hipurato (Butzler, 2004).

La hidrólisis del hipurato se fundamenta en la producción de hipuricasa que resulta en la hidrólisis del hipurato de sodio con la formación de benzoato de sodio y glicina; es utilizada para diferenciar las cepas de *C. jejuni* de otras especies de *Campylobacter* siendo la única especie positiva para esta prueba (Bolton, 2001).

Una de las técnicas que han revolucionado el diagnóstico microbiológico es la técnica *MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry)* que es un método rápido y preciso que permite identificar el microorganismo en minutos a partir de colonias en los medios de cultivo mediante ionización de las proteínas ribosómicas que proporcionan un espectro proteico único y específico de género, especie e incluso subespecie (Torralbo, 2013).

Los análisis serológicos en humanos están indicados cuando a pesar de obtener cultivos negativos, se sospeche de una infección con *Campylobacter* en personas que presentan complicaciones como artritis reactiva o síndrome de Guillain-Barré, se pueden realizar otros ensayos como ELISA o el uso de anticuerpos monoclonales (Torralbo, 2013).

La técnica más sensible y específica para la identificación de *Campylobacter*, la cual reduce el tiempo de detección en comparación con los métodos tradicionales es la reacción en cadena de polimerasa (PCR). La PCR permite la identificación de especies de *Campylobacter* incluyendo especies poco comunes y difíciles de cultivar, confirma los resultados de las reacciones fenotípicas que pueden ser variables y difíciles de leer (Silva *et al.*, 2011).

La identificación de subespecies utiliza métodos moleculares más avanzados entre los cuales se encuentra la PCR múltiple basada en el locus *nap*, diseño de cebadores y sondas específicas para cada especie, que son necesarios para efectuar estas pruebas y también otro tipo de ensayos como hibridación.

En perros domésticos el análisis presuntivo de posibles cepas de *Campylobacter* implica considerar algunos factores que pueden relacionarse con la adquisición de la bacteria en el huésped, como es la alimentación que reciben estos animales, principalmente cuando existe contacto directo con pollos y contaminación indirecta por el consumo de carne de pollo o aguas contaminadas.

En el caso de que *Campylobacter* causará procesos entéricos en perros, habría que realizar el diagnóstico diferencial que permita la identificación de otros organismos que pueden provocar diarrea en estos animales como parásitos, virus y bacterias, que pueden estar asociados con esta patología: *Giardia*, *Isospora*, *Cryptosporidium*, *Parvovirus*, *Calicivirus* y *Norovirus* y bacterias como *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Brachyspira*, *Salmonella*, *etc.* El protocolo de análisis de laboratorio para identificación de posibles cepas de *Campylobacter* es el mismo que se realiza en aves de corral.

1.3 Principales especies zoonóticas de *Campylobacter*

El género *Campylobacter* comprende 25 especies, tomando como principales *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis*, *C. lari* y *C. fetus*, las últimas tres especies asociadas con menor frecuencia en infecciones en humanos, *C. jejuni* tiene dos subespecies (*C. jejuni* subsp. *jejuni* y *C. jejuni* subsp. *doylei*) (Gomes, 2013).

1.3.1 *Campylobacter jejuni*

En 1970, las especies *C. coli*, *C. lari* y *C. upsaliensis* fueron denominadas “especies termotolerantes” debido a su capacidad para crecer en ambientes con intervalos de

temperaturas entre 42-43°C. En esta especie se reconoce como taxones independientes a las subespecies *C. jejuni* subsp. *jejuni* y *C. jejuni* subsp. *doylei*.

C. jejuni carece de fimbrias y se ha demostrado que elementos estructurales como el flagelo, algunas proteínas de membrana externa y el LPS actúan como adhesinas que le permiten fijarse a la célula epitelial y a la mucosa intestinal (Fernández *et al.*, 2008).

La diversidad fenotípica y genética que presenta *C. jejuni*, le condiciona de acuerdo a las características que manifieste expresar sus factores de virulencia, presumiendo que este fenómeno se debe a la plasticidad del genoma dependiendo del orden y localización de sus genes.

C. jejuni presenta una estructura antigénica diversa derivada de sus componentes LPS (lipopolisacáridos) o lipooligosacáridos. El lípido A de los LPS de la pared celular de *C. jejuni* posee actividad endotóxica por lo que la infección sistémica que desarrolla puede originar sepsis y shock, presumiblemente por la liberación de LPS.

C. jejuni subespecie *jejuni* es considerado el agente causal de enteritis en animales domésticos y en humanos, produciendo mayor virulencia y resistencia a la fagocitosis, luego le sigue *C. coli*, la cual produce diarreas más benignas.

C. jejuni subsp. *doylei* fue inicialmente descrita como GCL0-2 (*Gastric Campylobacter like organisms type 2*) en el año 1985 en Europa y, posteriormente, en Australia y África. Su distribución ha sido extendida en todos los continentes. Se caracterizan por ser bacilos Gram-negativos curvos, con un único flagelo en uno o ambos extremos. Son microaerófilos, de desarrollo relativamente lento, cuya temperatura óptima de crecimiento es de 35-37°C. Los reservorios animales identificados de esta bacteria son las gallinas y perros (Fernández *et al.*, 2008).

1.3.2 *Campylobacter coli*

Campylobacter coli es a menudo la segunda especie más aislada después de *C. jejuni* y responsable de casos de campylobacteriosis humana. Esta especie presenta características muy semejantes a *C. jejuni*. No existe grandes diferencias entre ambas especies en relación a su patogenicidad, composición antigénica, bacteriología y características epidemiológicas relacionadas con los mecanismos de transmisión y distribución en animales y en el medio ambiente, pero *C. coli* tiene como reservorio natural al cerdo. Ambas especies se diferencian bioquímicamente por la hidrólisis del hipurato que

es positiva para *C. jejuni* y negativa para *C. coli*. En los países desarrollados, *C. coli* es responsable de más o menos el 3% de los casos de diarrea producidos por las especies termotolerantes del género. En los países en vías de desarrollo esta frecuencia puede llegar hasta el 25% (Fernández *et al.*, 2008).

1.3.3 *Campylobacter lari*

Esta especie inicialmente fue denominada NARTC (*nalidixic acid resistant thermophilic Campylobacter*) y después, *C. laridis*. Actualmente *C. lari* se le considera como agente responsable de importantes brotes de diarrea y septicemia en el hombre producidos por la ingestión de agua contaminada, tiene menor frecuencia de aislamiento que *C. coli*. El reservorio más preponderante de esta especie son las aves marinas, particularmente las gaviotas. También se puede aislar de otros animales como perros y terneros (Fernández *et al.*, 2008).

Una característica que la diferencia de *C. coli* y *C. jejuni*, es la prueba de indoxyl acetato siendo para *C. lari* negativo.

1.3.4 *Campylobacter upsaliensis*

Esta especie fue aislada inicialmente en 1983 a partir de perros con y sin diarrea, presentando como principales características fenotípicas su capacidad de crecer a 37 y a 42°C y una débil o nula producción de catalasa. Por esta última característica fueron denominadas CNW (*catalase-negative or weakly positive group*). Estas bacterias también han sido aisladas de la materia fecal de gatos. Es difícil aislar esta especie debido a que la mayoría de las cepas son sensibles a los antibióticos -particularmente las cefalosporinas- incluidos en los medios selectivos para *Campylobacter*. Es recomendable usar técnicas de filtración de suspensiones fecales a través de membranas de 0,45µm para su aislamiento (Fernández *et al.*, 2008).

C. upsaliensis es responsable de bacteriemias en hospedadores inmunocomprometidos, pueden sobrevivir en sangre debido a que presentan resistencia al poder bactericida del suero de la sangre. Su identificación se encuentra relacionada con aislamientos en perros, otros animales y alimentos no pasteurizados.

1.3.5 *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*

Esta especie ha sido aislada de diversos animales. Es capaz de producir aborto esporádico en el ganado bovino y ovino. Para el hombre es considerada un patógeno oportunista por su capacidad de producir infección en pacientes inmunocomprometidos. Su participación etiológica en la diarrea es escasa, siendo más importante como agente de infecciones sistémicas. La presentación clínica más frecuente es la septicemia, la que a veces se puede presentar como una bacteremia simple. Excepcionalmente puede participar en infecciones supurativas localizadas, tales como artritis, pleuritis o abscesos subcutáneos. A diferencia de las especies termotolerantes, salvo raras excepciones, las cepas de *C. fetus* subsp. *fetus* deben ser cultivadas a 37°C. También pueden crecer a 26°C, característica que se utiliza para su identificación (Fernández *et al.*, 2008).

En el humano *C. fetus* subsp. *fetus* es causante de infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos, ha sido aislado del intestino de ovejas, vacas y cerdos; *C. fetus* subsp. *veneralis* es responsable de infertilidad en las vacas al ser aislados de su aparato genital.

C. fetus subsp. *fetus* (también conocida como *C. fetus* subsp. *intestinalis* y *Vibrio fetus* var. *intestinalis*), *C. fetus* subsp. *veneralis* y algunas cepas de *C. jejuni*, causan infertilidad y abortos en el ganado ovino y bovino (Center for Food Security & Public Health, 2005).

1.3.6 *Campylobacter hyointestinalis*

Esta bacteria, que originalmente fue aislada de cerdos con ileítis proliferativa, ha sido aislada también del contenido intestinal de bovinos y hámsters. En el hombre ha sido encontrada en asociación con diarrea y proctitis en homosexuales. *C. hyointestinalis* también ha sido aislado de casos de diarrea en adultos y niños inmunosuprimidos e inmunocomprometidos (Fernández *et al.*, 2008).

C. hyointestinalis crece a 42°C y produce SH₂ en Triple Sugar Iron Agar (TSI), tiene reacciones similares a *C. fetus* subsp. *fetus*, se ha recuperado de hisopados rectales de hombres homosexuales con proctitis (Malbrán, 2001).

1.4 Actividad Antimicrobiana

A lo largo del tiempo, en el tratamiento antibiótico para pacientes sintomáticos con campylobacteriosis se utiliza la administración de fluidos y electrolitos, pero en los casos más graves y/o prolongados se aplican macrólidos, azólidos y fluoroquinolonas para combatir las infecciones sistémicas. Sin embargo, existen diversos reportes donde ya se presenta resistencia a las fluoroquinolonas y tetraciclinas (Butzler, 2004; Cardinale *et al.*, 2003). Considerando esta información clínica la OMS recomienda no aplicar un tratamiento empírico en los casos de campylobacteriosis sino combatir la infección previo un análisis de susceptibilidad antimicrobiana.

A pesar del conocimiento de estos antecedentes, no se ha realizado la vigilancia epidemiológica profunda debido a los requerimientos que demanda *Campylobacter* spp para su crecimiento in vitro (García, 2009).

En América Latina está permitido el uso de quinolonas para el tratamiento veterinario y la alimentación en aves. Se emplean antibióticos como enrofloxacin, danofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacina, sarafloxacin, difloxacina, flumequina y ácido oxolínico (Serrano, 2011).

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Población de Estudio.

El estudio para la determinación de *Campylobacter* en aves de corral fue realizado en fincas de criaderos de gallinas criollas en la ciudad de Zamora perteneciente a la provincia de Zamora Chinchipe y en la parroquia de San Pedro de Vilcabamba en la provincia de Loja (**Figura 1**), en el periodo de septiembre-noviembre 2014. En el mismo periodo también se recolectaron muestras de materia fecal de perros en los parques: Parque Recreacional Jipiro y Parque Lineal La Tebaida, en la ciudad de Loja. Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología Clínica del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Técnica Particular de Loja.

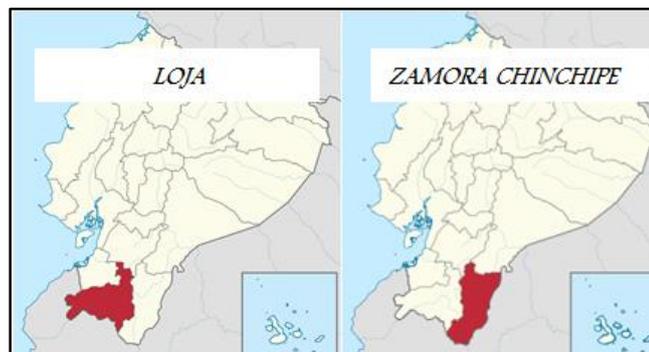


Figura 1. Localización de las provincias muestreadas.

Elaborado por:

[https://es.wikipedia.org/wiki/Provincia_de_Loja#/media/File:](https://es.wikipedia.org/wiki/Provincia_de_Loja#/media/File:Loja_in_Ecuador_(%2BGalapagos).svg)

[Loja_in_Ecuador_\(%2BGalapagos\).svg](https://es.wikipedia.org/wiki/Provincia_de_Loja#/media/File:Loja_in_Ecuador_(%2BGalapagos).svg)

2.2 Características generales del lugar de muestreo.

Las muestras recolectadas en el periodo septiembre-noviembre del 2014 en animales de corral se realizaron en época seca, las temperaturas en la ciudad de Zamora oscilaban entre los 26°C hasta los 30°C; mientras que en San Pedro de Vilcabamba, de la provincia de Loja las temperaturas variaban entre los 22°C y 25°C.

Las condiciones físicas y ambientales en las que se encontraban las gallinas criollas fueron: estar en contacto físico con otras aves como pavos o patos, estar expuestas a la presencia de aves silvestres propias del lugar, y estar cercanas a animales de compañía como perros. Las estructuras de la construcción del corral para gallinas son hechas con mallas de alambre que lo rodean, las jaulas también son elaboradas con alambre y madera para las camas (**Figura 2**). Los lotes de aves de corral muestreadas no recibieron ningún

tratamiento antibiótico desde su día de llegada hasta el día de la toma de la muestra, tampoco se utiliza tratamiento desinfectante para las camas de las mismas. Las personas encargadas de cuidar la crianza de las aves alternan entre hombres y mujeres, donde algunos no usan una indumentaria adecuada para prevenir una posible contaminación con éstos animales y su materia fecal.

La recolección de la materia fecal de perros en la ciudad de Loja se realizó en época seca con temperaturas que oscilaban entre los 18°C y los 22°C en los parques: Parque Recreacional Jipiro y Parque Lineal La Tebaida, las muestras fueron tomadas al azar. No existen datos clínicos específicos de la población muestreada.



Figura 2. Aves de corral muestreadas en Vilcabamba-Loja.

Elaborado por: La autora

2.3 Identificación fenotípica de *Campylobacter* spp en aves de corral y perros.

La toma de muestras en aves de corral se detalla en el **Anexo 1**. En el caso de perros callejeros como perros de casa, el procedimiento de la recolección de muestras se encuentra detallado en el **Anexo 2**.

Las cepas *C. jejuni* DMS 4688 y *C. coli* DMS 4689 fueron utilizadas como cepas control, los mismos que fueron donados por el Instituto de Microbiología Clínica de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile.

2.3.1 Siembra e Incubación

En la siembra del inóculo primario se utilizó placas de agar sangre suplementado con antibióticos Butzler, CAT o Blaser (**Anexo 4**), e incubadas en jarras de anaerobiosis creando

un ambiente de microaerofilia con sobres *CampyGen*TM 2.5L (Thermo SCIENTIFIC) a 42°C ± 2°C durante 48 horas.

Los tubos con medio de transporte (**Anexo 3**) fueron incubados en microaerofilia por 24 horas a 42°C ± 2°C, y posteriormente sembrados en el medio de cultivo selectivo Butzler en las mismas condiciones del cultivo del inóculo primario.

2.3.2 Aislamiento y Purificación

Transcurrido el tiempo de incubación, en el cultivo primario se identificaron colonias planas no hemolíticas, de aspecto acuoso, color grisáceo, brillantes con bordes irregulares que siguen la línea del estriado; posteriormente se confirmaron las colonias aisladas mediante la tinción Hucker (**Anexo 5**), donde identificamos su morfología característica. En los casos de cepas de *Campylobacter* spp contaminadas por flora bacteriana acompañante, se realizaron resiembras por aislamiento en cuadrantes en el medio selectivo Butzler con el fin de recuperar las cepas (**Figura 3**).



Figura 3. Cepas de *Campylobacter* spp aisladas en aves de corral.

Elaborado por: La autora

Otro método utilizado para la purificación de las cepas de *Campylobacter* spp es mediante la filtración en membrana de nitro-celulosa de 0.45 micras (**Anexo 6**). Una vez obtenidas las cepas puras se crioconservaron a -70°C (**Anexo 7**).

2.3.3 Pruebas bioquímicas

La identificación de las especies termotolerantes de *Campylobacter* spp fueron determinadas mediante las pruebas bioquímicas oxidasa, catalasa e hidrólisis del hipurato (**Anexo 8**), siendo esta última prueba de gran importancia para diferenciar las especies *C. jejuni* y *C. coli* (**Figura 11**).

2.4 Identificación molecular de *Campylobacter* spp.

La identificación molecular se realizó por medio del análisis de la PCR Múltiplex (**Anexo 10**), para lo cual fue extraído previamente el ADN bacteriano de cada una de las cepas estudiadas según el protocolo del Kit de extracción EZNA*Tissue ADN Protocolo Kit-Células Cultivadas OMEGA Bio-Tek (**Anexo 9**).

Los cebadores utilizados se encuentran detallados en la **Tabla 1**; el volumen de la PCR Múltiplex para cada reacción fue de 25 µl; la amplificación se realizó en el termociclador Veriti® 96 Well-Thermal Cycler PCR. Los resultados se revelaron en un gel de agarosa al 1,5% (**Anexo 11, Figura 12**) a 300 nm de luz ultravioleta en el equipo Transluminador UV Labnet. El marcador molecular utilizado fue de 100 bp (Trackit™ 100 pb DNA Ladder INVITROGEN). La identificación molecular de *Campylobacter* fue analizada de acuerdo al peso molecular de las especies correspondientes.

Tabla 1. Secuencias de cebadores utilizados para PCR Múltiple para identificación de especies de *Campylobacter* spp.

ESPECIE	TAMAÑO (bp)	GenBank	Primer	Secuencia (5' a 3')
Género <i>Campylobacter</i>	816	16S rRNA	C412F	5' -GGATGACACTTTTCGGAGC-3'
			C1228R*	5' -CATTGTAGCACGTGTGTC-3'
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	611	23S rRNA	HYO1F	5' -ATAATCTAGGTGAGAATCCTAG-3'
<i>C. coli</i>	502	<i>AskI</i>	CC18F	5' -GGTATGATTTCTACAAAGCGAG-3'
			CC519R	5' -ATAAAAGACTATCGTCGCGTG-3'
<i>C. fetus</i>	359	<i>CstA</i>	MG3F	5' -GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT-3'
			CF359R	5' -AGCCAGTAACGCATATTATAGTAG-3'
<i>C. lari</i>	251	<i>glyA</i>	CLF	5' -TAGAGAGATAGCAAAAGAGA-3'
			CLR	5' -TACACATAATAATCCCACCC-3'
<i>C. jejuni</i>	161	<i>cj0414S</i>	C-1	5' -CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT-3'
			C-3	5' -CCATAAGCACTAGCTAGCTGAT-3'
<i>C. upsaliensis</i>	86	<i>lpxA</i>	CU61F	5' -CGATGATGTGCAAATTGAAGC-3'
			CU146R	5' -TTCTAGCCCCTTGCTTGATG-3'

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

2.5 Actividad Antimicrobiana.

El análisis de la actividad antimicrobiana de las cepas puras de *Campylobacter* fueron determinadas mediante el método de difusión en agar o Kirby Bauer (**Anexo 12**), se utilizó seis tipos de antibióticos: ciprofloxacina (CIP-5 µg), tetraciclina (TE-30 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (AMC-20/10 µg), ampicilina (AMP-10 µg), gentamicina (GM-10 µg), y eritromicina (ER-15 µg). Los resultados fueron interpretados de acuerdo a las recomendaciones del Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad (EUCAST) y el Comité de Antibiogramas de la Sociedad Francesa de Infectología (CA-SFM) (**Tabla 9**).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Prevalencia de *Campylobacter* spp en aves de corral.

De las 120 muestras obtenidas de hisopados cloacales de aves de corral (gallinas criollas), se determinó una prevalencia del 42% (50) de *Campylobacter* spp (**Tabla 2**), dato concordante con un estudio realizado en una comunidad de bajos recursos en Buenos Aires-Argentina, donde se aisló el 40% de *Campylobacter* spp en aves de corral (López *et al.* 2002). En Perú, otro estudio en pollos domésticos registraron el 54% de *Campylobacter* spp (Tresierra *et al.* 1995).

Tabla 2. Prevalencia de *Campylobacter* spp en aves de corral.

RESULTADOS	N° de muestras	Porcentaje (%)
Positivo	50	42
Negativo	70	58
Total	120	100

Elaborado por: La autora

También se reportan tasas superiores a los valores obtenidos en nuestra investigación, en un estudio en Chile, la frecuencia de aislamiento de *Campylobacter* spp fue 66,7% en aves sometidas a explotación (Fernández *et al.* 1993). En Brasil, registraron el 71,3% de prevalencia de *Campylobacter* spp en canales de pollos de engorde, recomendando cocinar adecuadamente los alimentos antes del consumo (Franchin *et al.* 2007). La EFSA reportó una de prevalencia del 75,8 % de *Campylobacter* en canales de pollo en diferentes países de la Unión Europea. En España, una investigación determinó que la prevalencia de *Campylobacter* spp en pollos fue del 82,02%, lo cual supone un alto riesgo para el consumidor debido al marcado factor de estacionalidad que favorece el crecimiento de esta bacteria (Urdaneta, 2013).

Sin embargo existen datos donde existe una tasa disminuida de *Campylobacter* spp; en Dinamarca determinaron el 36% de aislamientos de *Campylobacter* spp en carne de pollo (Yan *et al.* 2005). En tres ciudades del Sur de Chile reportaron una incidencia de *Campylobacter* spp del 25,7% en muestras fecales de gallinas (Fernández *et al.* 2000).

La colonización de *Campylobacter* a través de la coprofagia es un factor determinante para propagar la bacteria con gran rapidez, a la vez infecta aguas y alimentos destinados al consumo del lote de pollos, así revelan datos de estudios realizados en

plantas productoras de pollos, prácticamente el 100% de los pollos presentes en las plantas son contaminados en unos pocos días (Mifflin *et al.*, 2001; Shreeve *et al.*, 2000). En España, una investigación realizada en pollos recién nacidos negativos para *Campylobacter* spp, al ser alojados por siete días junto con las aves inoculadas con la bacteria, el 100% del lote de pollos resultaron positivos para *Campylobacter* spp, confirmando la extrema sensibilidad del reservorio para adquirir la bacteria (Biarnés *et al.* 2010). La colonización por *Campylobacter* spp en los pollos de engorde se relacionan con la edad, y una vez producida la colonización, la transmisión por coprofagia es muy rápida y alcanza el 100% de contaminación de los pollos en un periodo de 72 horas (OIE, 2008).

Los brotes de infección de *Campylobacter* en los lotes de pollos también están determinados por factores de estacionalidad, mostrando mayor proporción de lotes infectados en periodos cálidos que en épocas frías. En Europa, se ha señalado al verano y otoño como las estaciones donde hay mayor incidencia de *Campylobacter*. En España se observaron en el año 2011 picos de incidencia de junio a noviembre con una tasa del 91,3-100 % y de diciembre a febrero un índice del 60,8-68,4 % (Instituto de Salud Carlos III, 2013). El factor de estacionalidad no es muy marcado en la región estudiada debido a que Ecuador sufre cambios climáticos muy variables sin poder determinar una estación específica sino época seca o lluviosa.

El consumo de carne de pollo ha sido considerado a nivel mundial como una de las principales fuentes de contaminación de *Campylobacter* spp. La Unión Europea de acuerdo a un informe de la EFSA en el 2012, reporta 698 brotes de Enfermedades de Transmisión Alimentaria, donde el 3,9% de los casos se le atribuye a *Campylobacter*. En EEUU el 1,9% de las infecciones fueron atribuidas a *Campylobacter*; en Inglaterra, en el año 2011, registran que la mayoría de los brotes de *Campylobacter* estuvieron asociados al consumo de productos de pollo principalmente paté de hígado de pollo poco cocinado (16 casos de un total de 20). En América Latina se estima que del 1-5% de los casos de diarrea del viajero son provocados por este agente infeccioso. Otro estudio reporta que se aislaron 50% de especies de *Campylobacter* en palomas urbanas, 35% en aves migratorias y del 20-70% en gaviotas (Center for Food Security and Public Health, 2005), factor que debería ser considerado para futuras investigaciones. El foco de propagación de esta bacteria son las carnes mal cocidas, hecho que requiere la implementación de programas de vigilancia sanitaria para que la población tome medidas preventivas al momento de consumir estos alimentos.

Las diferencias del porcentaje de aislamiento de *Campylobacter* spp entre los países se deben a diferentes factores determinantes en la adquisición, así como la diseminación de

esta bacteria que incluyen la edad de las aves, nivel de contaminación del lote, sistemas de manejo del área productiva y procesamiento, densidad de animales, reglamentaciones zoonosanitarias establecidas en cada país, etc. Las condiciones ambientales tanto fisiológicas como climáticas juegan un papel muy importante en la supervivencia de esta bacteria, en el caso de las aves de corral la temperatura corporal (42°C) predispone al animal a ser el principal reservorio de *Campylobacter* spp, condiciones óptimas para el crecimiento y desarrollo del agente infeccioso (Horrocks *et al.*, 2008), así también los periodos climáticos cálidos húmedos incrementan las posibilidades de supervivencia de esta bacteria.

Las condiciones higiénico-sanitarias por parte del personal en los criaderos de gallinas, infraestructura, así como la exposición con otros animales domésticos, silvestres y aves migratorias son vehículos determinantes en la propagación de *Campylobacter* spp; datos que deberían ser considerados para la implementación de protocolos de seguridad industrial con el fin de disminuir la contaminación de los reservorios y proteger a la población.

3.2 Identificación de especies de *Campylobacter* en aves de corral.

La especie predominante en el estudio epidemiológico de *Campylobacter* en aves de corral fue *C. jejuni* alcanzando una cifra del 78% (39) seguida de *C. coli* con 22% (11), (Tabla 3).

Tabla 3. Identificación de especies de *Campylobacter* en aves de corral.

RESULTADOS	N° de muestras positivas	Porcentaje (%)
<i>C. coli</i>	11	22
<i>C. jejuni</i>	39	78
Total	50	100

Elaborado por: La autora

Datos similares obtenidos en un estudio en Chile en la materia fecal de aves de corral demostró que el 77% (13) correspondían a *C. jejuni* y el 23% (4) a *C. coli* (Rivera *et al.*, 2011). Sin embargo, se registran tasas de prevalencia de *C. jejuni* superiores en relación

con las otras especies. En Argentina, en una comunidad de bajos recursos se obtuvo el 94% de *C. jejuni* en aves de corral incluyendo otros reservorios (Giacoboni *et al.*, 2002).

Otros estudios reportan una incidencia menor a los datos obtenidos en nuestra investigación. En Brasil un estudio realizado en pollos reporta una tasa del 66,9% de aislamientos de *C. jejuni* y 17,8% de *C. coli* (Fernández, 1983). En Perú, se aisló *C. jejuni* en un 61% y *C. coli* 22% en pollos (Grados *et al.*, 1988). En Chile registran 45% de *C. jejuni* y *C. coli* 15% en aislamientos realizados en pollos (Fernández, 2011). En un estudio realizado en varios laboratorios de los EEUU, se comprobó que alrededor del 30% (300) de las muestras de pollos contenía *C. jejuni* (Stern *et al.*, 1985). La EFSA reportó que dos tercios de las muestras, tanto fecales como en canales, se aisló *C. jejuni* y un tercio de las mismas *C. coli*. Se estima que las aves de corral de granja son colonizadas sobre todo por *C. jejuni* entre un 65-95%, con menos frecuencia por *C. coli* y raramente por otras especies (Newell *et al.*, 2000).

En los animales como pollos y otras aves de corral *C. jejuni* puede colonizar en un número elevado que rebasa 10^{10} unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de intestino infectado, siendo el sitio de colonización principal el ciego, donde *C. jejuni* se aloja en las células epiteliales del intestino (Achen *et al.*, 1998).

En un estudio en humanos y muestras provenientes de origen aviar en Valdivia, se determinó que el 18% de las muestras de carne de ave estaban infectadas con *C. jejuni* subespecie *jejuni*; el 28% de las muestras infectadas correspondían a humanos, demostrando que los alimentos actúan como vehículo de infección para producir campylobacteriosis en humanos (Fernández *et al.*, 2005).

La prevalencia de aislamientos de *C. jejuni* y *C. coli* frente a *C. upsaliensis* y *C. lari*, se debe a que estas especies son muy sensibles a los antibióticos que contienen los medios de cultivo (Fernández *et al.*, 2008), siendo uno de los motivos de no encontrar estas especies en ésta investigación, pero podría utilizarse otro tipo de protocolos para recuperar esas cepas en investigaciones futuras. De las especies de *Campylobacter*, *C. jejuni*, es la que más frecuentemente se aísla tanto en humanos como en animales, le sigue *C. coli* y *C. lari* (EFSA, 2011).

El congelamiento no inactiva a *C. jejuni* instantáneamente, las temperaturas de congelación reducen la carga inicial en un ciclo logarítmico para luego extenderse a la reducción gradual durante el almacenamiento que varía en relación al tipo de alimento y temperatura. La cápsula de la cepa de *C. jejuni* brinda resistencia al complemento humano, lo que permite junto con otros factores de virulencia invadir el epitelio intestinal y causar

enfermedad diarreica, este hecho le brinda a esta especie mayor probabilidad de supervivencia (Lynch *et al.* 2010). Sin embargo, el proceso de enfriamiento por aire que por inmersión reduce la incidencia de *C. jejuni* y *C. coli* sobre canales de pollo de engorde.

3.3 Prevalencia de *Campylobacter* spp en perros.

De las muestras recolectadas (70) provenientes de materia fecal de perros se determinó una prevalencia del 10% (7) de *Campylobacter* spp en este reservorio (**Tabla 4**). No se encontraron datos similares a los resultados obtenidos en este estudio.

Tabla 4. Prevalencia de *Campylobacter* spp en materia fecal de perros.

RESULTADOS	N° de muestras	Porcentaje (%)
Positivo	7	10
Negativo	63	90
Total	70	100

Elaborado por: La autora

Otras investigaciones reportan datos que presentan una incidencia más elevada. En Ecuador, un estudio realizado en Loja reportó una incidencia de *Campylobacter* spp del 65% en perros que presentaban sintomatología clínica (Manzanillas, 2012). En Barbados, en un estudio para determinar los reservorios de *Campylobacter* spp en algunos animales reportó el 46,9% (596) de *Campylobacter* spp en perros (Workman *et al.*, 2005). En Suiza, en el Instituto de Bacteriología de la Universidad de Berna se realizó un estudio comparativo de las tasas de transporte de *Campylobacter* spp en animales de compañía sanos y diarreicos donde se incluyeron perros y gatos, registrando una prevalencia del 31% (714) de la presencia de la bacteria; donde presentaron una incidencia del 44% en perros diarreicos y 21% en perros asintomáticos (Burnens *et al.*, 1992). En Guatemala determinaron una incidencia del 19,6% de *Campylobacter* spp en perros diarreicos (Sáenz, 2007). En Brasil, en el Hospital Veterinario de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Federal de Uberlândia, reportaron una incidencia de *Campylobacter* spp del 18,3% (22/120) en perros y gatos (Rodrigues, 2011). En Argentina en una comunidad de bajos recursos económicos registraron el 16,96% de *Campylobacter* spp en perros (Giacoboni *et al.*, 2002).

Existe un estudio que reporta una tasa inferior a la incidencia determinada en éste estudio. En Brasil, una investigación reportó que la frecuencia de aislamientos de especies

de *Campylobacter* fue del 9% en cerdos y del 5-8% de las muestras estaban relacionadas con perros y gatos (Aquino *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos sugieren que los perros son depósitos significativos de *Campylobacter* y contribuyen a infecciones entéricas en humanos y que la carne de pollo es un vehículo con altas probabilidades de transmisión de esta bacteria a los seres humanos (Workman *et al.*, 2005). La diferencia de las tasas de prevalencia de infección por *Campylobacter* spp en las mascotas depende de las condiciones físicas y fisiológicas a las que se encuentre expuesto el animal. Las tasas de incidencia son relativamente bajas en perros domésticos o de casa pero elevada en refugios de animales callejeros y animales de campo que están en contacto con el ganado (Center for Food Security & Public Health, 2005). Las condiciones de hacinamiento es uno de los factores que favorecen la colonización de *Campylobacter* spp en personas y animales. Existe un alto porcentaje de caninos y casi la totalidad de los felinos que deambulan por las calles en el mundo, incrementando la tasa de riesgo de contagio con otros animales infectados con *Campylobacter* spp. Otro factor de riesgo para contraer la infección en animales domésticos es la edad, en Loja un estudio presentó mayor frecuencia de contaminación en cachorros y gatos entre 1-6 meses de edad, los veterinarios lo relacionan con el desarrollo prematuro de anticuerpos protectores, también pueden estar asociados a otros patógenos que pueden actuar sinérgicamente para producir la infección (Manzanillas, 2012).

La ausencia de diarrea en perros no indica que este reservorio no esté libre de la infección por *Campylobacter* spp, pueden haber animales infectados que eliminen la bacteria por las heces sin presentar sintomatología, siendo necesario clasificar las poblaciones de animales estudiados en (perros sintomáticos y asintomáticos) para poder obtener datos más precisos (Sáenz, 2007).

3.4 Identificación de especies de *Campylobacter* en perros.

La tasa de prevalencia de *C. jejuni* en muestras de materia fecal de perros fue del 43% (7) y el 57% (4) fueron positivas para *C. coli* (**Tabla 5**).

Tabla 5. Identificación de especies de *Campylobacter* en perros.

RESULTADOS	N° de muestras positivas	Porcentaje (%)
<i>C. coli</i>	4	57
<i>C. jejuni</i>	3	43
Total	7	100

Elaborado por: La autora

En otros estudios se registran valores superiores en la incidencia de especies de *Campylobacter* como en un estudio en Brasil, se registró un 58% (19/33) de aislamientos que contenían *C. jejuni*, 33% (11/33) *C. coli* y 9% (3/33) en otras especies (Rodrigues, 2011).

Existen reportes de valores inferiores en otros países en comparación a los resultados obtenidos en esta investigación. En Chile en un estudio en deposiciones de perros se aisló el 34,7% de cepas de *C. jejuni* y 16,7% de *C. coli* (Fernández *et al.*, 2002); otro estudio en Brasil reportó que el 35,2% de muestras contenían *C. jejuni* y el 7,6% *C. coli* (Fernández *et al.*, 1983). En países desarrollados la tasa de prevalencia de *C. jejuni* en caninos sanos va del 20-34% (Moreno *et al.*, 1993); mientras que en los países que se encuentran en vías de desarrollo se determina una incidencia del 26-51,4% (Fernández *et al.*, 1994).

Otro estudio realizado en Brasil reporta cepas aisladas de *C. jejuni* y *C. coli* de muestras fecales de niños asociadas al contacto con éstos animales que sufrieron episodios de diarrea (Rossi *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos evidencian la importancia epidemiológica que tiene *Campylobacter* spp en sus reservorios debido a que son potenciales fuentes de infección para el hombre y en especial para niños ya que mantienen una estrecha relación de convivencia (Jara, 2006).

3.5 Análisis molecular de *Campylobacter* spp en aves de corral y perros.

En el análisis molecular se pueden apreciar las bandas que distinguen las especies de *Campylobacter*, el género *Campylobacter* se marca con intensidad aproximadamente a 816 pb, *C. coli* a 502 pb y *C. jejuni* a 162 pb (**Figura 4**).

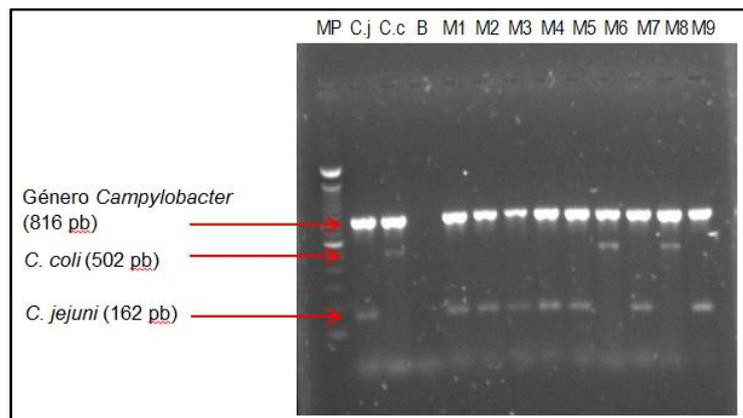


Figura 4. Electroforesis de especies de *Campylobacter* spp. (MP=marcador de peso molecular 1Kb; C.j=control positivo *C. jejuni*; C.c= control positivo *C.coli*; B= Blanco; M1-M9= muestras estudiadas)

Elaborado por: La autora

Sin embargo, es importante recalcar que para conseguir la amplificación de cada una de las especies es necesario conocer con precisión las temperaturas de anillamiento de cada cebador (**Tabla 8**), debido a que puede haber grandes variaciones en los intervalos de temperatura de los cebadores. Las temperaturas de anillamiento fueron calculadas por medio del *software Oligo Calculator Tool* de *Gen Script*.

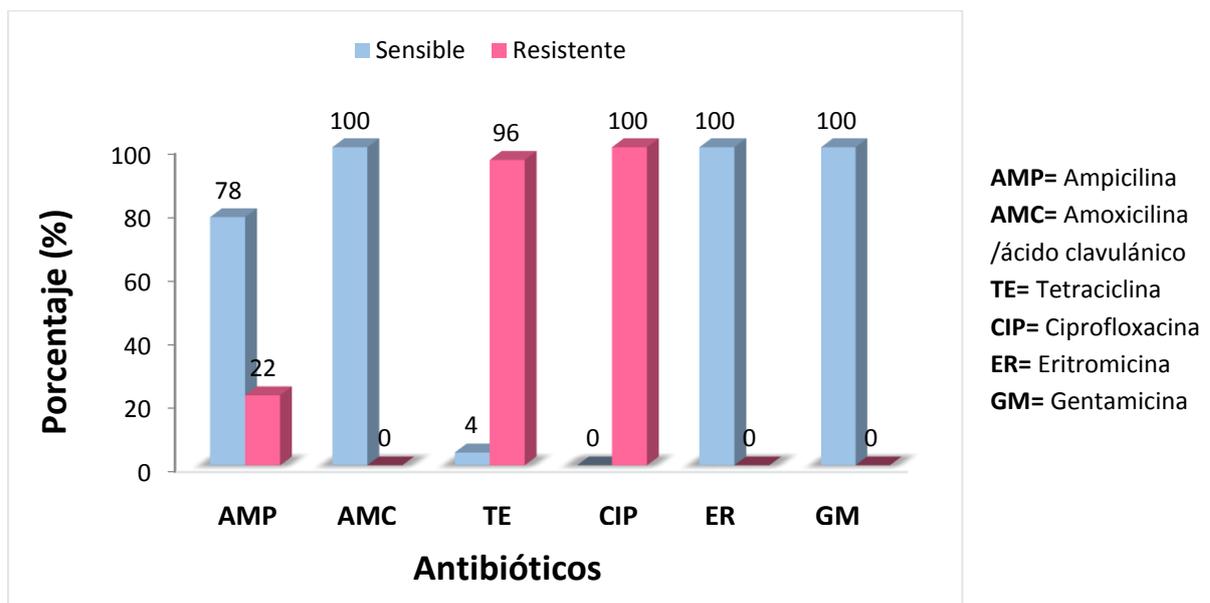
El proceso de amplificación del producto de la PCR en esta experimentación, se efectuó realizando una PCR *Touch-down* previa a la etapa del *cycling*, para amplificar las especies de *Campylobacter*. La etapa de *Touch-down* permitió aumentar la especificidad del anillamiento de cada cebador en un mismo proceso, realizando múltiples reacciones en una sola PCR. Ésta etapa fue incorporada al proceso de la PCR basado en un Manual de Procedimientos para Aislamiento y Caracterización de *Campylobacter* spp (Farace M & Viñas M, 2007).

El tiempo y temperatura de desnaturalización inicial está determinado por el tipo de polimerasa que se utilizará en la PCR debido a que en tiempos muy cortos o prolongados a lo establecido por el fabricante puede ocasionar que no se active la polimerasa, esta

referencia que se encuentra descrita en el inserto adjunto al kit con las especificaciones del fabricante.

3.6 Actividad antimicrobiana de seis antibióticos frente a *Campylobacter* spp en aves de corral.

La actividad antimicrobiana de seis antibióticos frente a *Campylobacter* spp en aves de corral registró una resistencia del 100% a la ciprofloxacina y 96% a la tetraciclina; los antibióticos: amoxicilina/ácido clavulánico, eritromicina y gentamicina presentan una sensibilidad del 100% y ampicilina del 78% (**Gráfica 1**); datos concordantes a un estudio realizado en Argentina donde reportaron el 100% de resistencia frente a la ciprofloxacina de materia fecal de pollos en establecimientos industriales (Notorio R, 2011). En Chile a partir del año 2003, presentan resistencia antimicrobiana a la ciprofloxacina del 42,5% y tetraciclina del 20% (Gatica, 2013).



Gráfica 1. Actividad antimicrobiana de seis antibióticos frente a *Campylobacter* spp en aves de corral.

Elaborado por: La autora

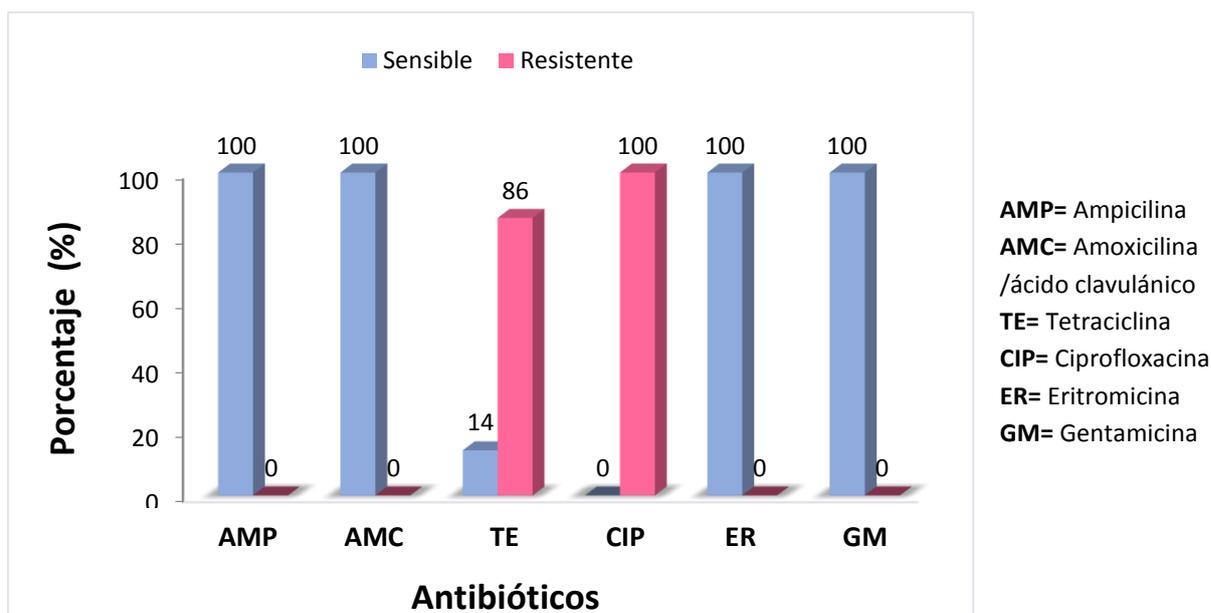
La resistencia a las fluoroquinolonas por *Campylobacter*, está asociado al uso frecuente de este antibiótico en la producción animal, a diferencia de la ciprofloxacina; en la familia de los macrólidos, el desarrollo de resistencia de *Campylobacter* spp requiere una serie de mutaciones y una exposición prolongada al antibiótico; este antecedente se ve reflejado en los niveles bajos de resistencia que presenta la eritromicina (Gatica, 2013).

Las bajas tasas de resistencia a los aminoglucósidos por *Campylobacter* están relacionadas a que la gentamicina es una droga no utilizada en la producción aviar a pesar de esto, existen cepas resistentes que han sido probadas mediante un estudio donde revelan que cuatro cepas aisladas de carnes de pollos Broilers fueron resistentes a la gentamicina, mientras que otras investigaciones también han dado a conocer cepas de *C. coli* en aves de corral resistentes a este antimicrobiano, esto puede ser debido a un proceso que favorece la selección de cepas con resistencia cruzada (Marinou *et al*, 2012).

3.7 Actividad antimicrobiana de seis antibióticos frente a *Campylobacter* spp en perros.

La actividad antimicrobiana de seis antibióticos frente a *Campylobacter* spp en las muestras de perros registró que existe una resistencia del 100% frente a la ciprofloxacina y 86% a la tetraciclina (**Gráfica 2**), datos similares a un estudio realizado en Argentina donde las tasas de resistencia son elevadas frente al ácido nalidíxico 60% (3/5), tetraciclina 80% y ciprofloxacina que contrasta con una incidencia del 20% (1/5) (Pantozzi *et al.*, 2010).

Se presentó un 100% de sensibilidad antimicrobiana frente a la ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, eritromicina y gentamicina. En el mismo estudio de Argentina se comprobó que *Campylobacter* registra 100% (5/5) de sensibilidad antimicrobiana frente a ampicilina y eritromicina.



Gráfica 2. Actividad antimicrobiana de seis antibióticos frente a *Campylobacter* spp en perros.

Elaborado por: La autora

El mayor porcentaje de resistencia y multirresistencia se observa animales de cría intensiva como bovinos y producción avícola; sin embargo existen muy pocos estudios de actividad antimicrobiana en animales domésticos como el perro. La atención veterinaria puede ser un factor asociado a la resistencia bacteriana en estos reservorios, debido a que algunos tratamientos son aplicados de forma empírica. En América Latina está permitido el uso de quinolonas para el tratamiento veterinario y la alimentación de aves. Se emplean enrofloxacin, danofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacina, sarafloxacin, difloxacin, flumequina y ácido oxolínico (Serrano, 2011).

CONCLUSIONES

- ✓ La prevalencia de *Campylobacter* spp en aves de corral fue del 52% (50/120).
- ✓ La prevalencia de *Campylobacter* spp en perros fue del 10% (7/70).
- ✓ La prevalencia de las especies de *Campylobacter* en las aves de corral fue del 78% (39) para *C. jejuni* y el 22% (11) restante para *C. coli*.
- ✓ En las muestras de perros la prevalencia de las especies de *Campylobacter* fue del 57% (4) para *C. coli* y el 43% (3) restante *C. jejuni*.
- ✓ La actividad antimicrobiana de *Campylobacter* spp en aves de corral determinó el 96% de resistencia a tetraciclina y 100% a la ciprofloxacina. La sensibilidad antimicrobiana para amoxicilina–ácido clavulánico, gentamicina y eritromicina fue del 100%; mientras que para ampicilina fue del 78%.
- ✓ La actividad antimicrobiana de *Campylobacter* spp en perros mostró que el 86% de las muestras presenta resistencia a la tetraciclina y 100% a la ciprofloxacina. La sensibilidad antimicrobiana fue del 100% para los discos de ampicilina, amoxicilina – ácido clavulánico, gentamicina y eritromicina.

RECOMENDACIONES

- ✓ Se recomienda ampliar los estudios epidemiológicos de los reservorios de *Campylobacter* spp en otros puntos del país, considerando la participación de equipos de vigilancia sanitaria para aportar esta información a Instituciones de Salud Pública.
- ✓ Implementar programas de prevención y control de contaminación por *Campylobacter* spp, dirigidos a la población que tiene permanente contacto con animales de producción por sus actividades laborales con el fin de reducir el riesgo de contaminación.
- ✓ Educar a la población en general sobre los riesgos que implica el consumo de alimentos mal procesados posiblemente infectados con *Campylobacter* spp y las medidas preventivas que pueden tomar para consumirlos, principalmente en el caso de carne de aves y sus productos derivados puesto que son el principal reservorio de esta bacteria.
- ✓ Impedir que las mascotas deambulen por las calles, debido a que pueden contraer la bacteria por contacto con otros animales infectados o en la basura y porque los animales portadores contribuyen a la contaminación ambiental.
- ✓ Evitar el uso indiscriminado de antibióticos en animales de producción debido a que esa podría ser una fuente indirecta de generación de resistencia bacteriana para el hombre por el consumo de los mismos.
- ✓ Profundizar en el estudio bioquímico y molecular de *Campylobacter* spp, debido a que se ha observado con diverso grado de frecuencia, complicaciones clínicas producidas por este agente en humanos, degenerando en enfermedades que comprometen la vida de los pacientes.
- ✓ Realizar estudios de la actividad antimicrobiana de diferentes tipos de antibióticos en medicina humana como medicina veterinaria, con el fin de establecer los antibióticos de elección para el tratamiento de las infecciones provocadas por *Campylobacter* spp, con el fin de evitar la multirresistencia bacteriana.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abubakar, I., Irvine, L., Aldus, C.F., Wyatt, G.M., Fordham, R., Schelenz, S., Shepstone, L., Howe, A., Peck, M., Hunter, P.R. (2007). A systematic review of the clinical, public health and cost-effectiveness of rapid diagnostic tests for the detection and identification of bacterial intestinal pathogens in faeces and food. *Health Technology Assessment*. 11, 1-216.
- Achen, M., Morishita, TY., Ley, EC. (1998). Shedding and colonization of *Campylobacter jejuni* in broilers from day-of-hatch to slaughter age. *Avian Diseases*, 42, 732–7.
- AESAN. (2012). *Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición con relación a las medidas de control para reducir la presencia de Campylobacter spp en carne fresca de aves (pollo)*. Recuperado de http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/comite_cientifico/COMPLEMENTOS_1.pdf
- Aquino, M.H.C., Pacheco, A.P.G., Ferreira, M.C.S., Tibana, A. (2002). Frequency of isolation and Identification of Thermophilic *Campylobacters* from Animals in Brazil. *The Veterinary Journal*, 164, 159-161.
- Biarnés, Mar., Blanco A., Camprubí Q., Canals N & Porta R. (1998-2010). *Prevalencia de Campylobacter en pollos. Estudios epidemiológicos y de transmisión. Centro de Sanidad Avícola de Aragón y Cataluña*. Recuperado de www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/ramon_porta.pdf
- Bolton, F.J. (2001). Methods for isolation of *Campylobacter* from humans, animals, food and water. The increasing incidence of campylobacteriosis in humans. Report and proceedings of a WHO consultation of experts. *Geneva: World Health Organization*, 87-94.
- Brown, C., Martin, V., Chitwood, S. (1999). An outbreak of enterocolitis due to *Campylobacter* spp in a beagle colony. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 11. 374-376.
- Burch, D.G.S. (2005). Avian vibronic hepatitis in laying hens. *Veterinary Record*, 157. 528.
- Burnens, A., Wick, B. and Nicolet, J. (1992). Comparison of *Campylobacter* Carriage Rates in Diarrheic and Healthy Pet Animals. *Journal Veterinary Medicine*. 13, 175-180.

- Butzler, J.P. (2004). *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clinical Microbiology and Infection* 10, 868-876. doi: 10.1111/j.1469-0691.2004.00983.x
- CA-SFM/EUCAS. (2014). *Determinación de la sensibilidad de antibióticos*.
- Cardinale, E., Dromigny, JA., Tall, F., Ndiaye, M., Konte, M., Perrie-Gros-Claude, J. (2003). Fluoroquinolone susceptibility of *Campylobacter* strains, Senegal. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 9, 79-81.
- Cervantes, E., Alejandro, Cravioto. (2007). *Campylobacter* y enfermedades asociadas. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 50, No.1.
- CDC (2013). *Campylobacter* general Information. http://www.cdc.gov/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter/#how_common
- COBB (2015). La evolución en el consumo de carne de pollo. Recuperado el 7 de septiembre del 2015 de: <https://avicultura2015.com/cobb-la-evolucion-en-el-consumo-de-carne-de-pollo/>
- Clark, B., McKendrick, M. (2004). A review of viral gastroenteritis. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 17, 461-469.
- Cuenca, V. (2015). Prevalencia de las especies termotolerantes de *Campylobacter* (*C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. coli*, *C. lari* y *C. upsaliensis*) en niños con y sin diarrea del Hospital del Día, durante el periodo septiembre-diciembre 2014. (Tesis de pregrado). Universidad Técnica Particular de Loja. Loja-Ecuador.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2011). Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and / or targets at different stages of the food chain. *EFSA Journal*, 9, 1–141.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2012). The European Union Summary Report Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010, *EFSA Journal*, 10, 2597.
- ENSANUT-ECU. (2011-2013). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Instituto nacional de estadística y censos. Ministerio de Salud Pública. Quito, Ecuador.

- Farace, M. & Viñas, M. (2007). Manual de Procedimientos para Aislamiento y Caracterización de *Campylobacter* spp. Departamento de Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Buenos Aires-Argentina.
- Fernandez H. (1983). Especies termófilas de *Campylobacter*: Aspectos bacteriológicos, epidemiológicos e patogênicos. Mestrado em Microbiologia e Imunologia. Escola Paulista de Medicina. São Paulo.
- Fernández H. (1993). Occurrence of thermotolerant species of *Campylobacter* in three groups of hens maintained under different environmental conditions. *Review Microbiology*, 24, 265-9.
- Fernandez, H., Kahler, K., Salazar, R. & Rios, M. (1994). Prevalence of thermotolerant species of *Campylobacter* and their biotypes in children and domestic birds and dogs in Southern Chile. *Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo*, 36, 433-436.
- Fernández, H., Torres, N. (2000). *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en tres grupos de gallinas de diferente origen geográfico del sur de Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 32, 241-4.
- Fernández, H., García, A., Villanueva, MP. (2005). Serotipos de *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni* aislado en carne de ave para consumo humano y en muestras de heces de niños con diarrea. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 37, 79-81.
- Fernández, H., Vera, F., Villanueva, M. P. (2007). Especies de *Arcobacter* y *Campylobacter* en aves y mamíferos del sur de Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 39, N°2.
- Fernández, H., Vera, F., Villanueva, MP., García A. (2008). Occurrence of *Campylobacter* species in healthy well-nourished and malnourished children. *Brazilian Journal Microbiology*. 39, 56-8.
- Fernández, H. (2011). *Campylobacter* y campilobacteriosis: una mirada desde América del Sur. *Revista Perú Medicina Experimental Salud Publica*. 28.
- Franco, DA., Williams, CE. (1999). *Campylobacter jejuni*. In: Hui YH, Pierson MD, Gorham JR, eds: Foodborne disease handbook. 2nd. ed. *New York: Marcel Dekker*.
- Franchin, PR., Ogliari, PJ., Batista, CRV. (2007). Frecuencia de termófilo *Campylobacter* en pollos de engorde pollos durante el procesamiento industrial en un matadero del sur de Brasil. *British Poultry Science*. 48, 127-132.

- García, J.A., Alarcón, D., Menéndez, M., López, M. (2003). Sensibilidad de *Campylobacter jejuni* a ocho antibióticos en cepas aisladas de muestras clínicas de niños. *Revista Española de Quimioterapia*. 16, 216-220.
- García, P., Valenzuela, N., Rodríguez, V., León, E., y Fernández, H. (2009). Susceptibilidad antimicrobiana de *Campylobacter jejuni* aislado de coprocultivos en Santiago de Chile. *Revista Chilena Infectología*, 26, 511-514.
- Gatica, M. (2013). Determinación de la Sensibilidad Antimicrobiana de Cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas de deyecciones de aves, carnes de pollos broiler y pacientes humanos. (Tesis de pregrado). Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Giacoboni, G., López, C., Tellechea, D., Agostini, A. (2002). *Campylobacter jejuni* en una granja de pollos camperos. *Analecta Veterinaria*, 22,42-47.
- Gomes, Marcos JP. (2013). Gênero *Campylobacter* spp. FAVET-UFRGS. Recuperado el 4 de diciembre del 2015, de: http://www.ufrgs.br/labacvet/files/Gênero_Campylobacter_4-2013-1.pdf
- Guderian, RH., Ordoñez, GR., Bossano, RR. (1987). Acute diarrhea associated with *Campylobacter* and other pathogens in Quito, Ecuador. *Bol of Sanit Panam*. 102. 333-9.
- Grados, O., Bravo, N., Black, R.E., Butzler, J.P. (1988). Paediatric *Campylobacter* diarrhoea from house hold exposure to live chickens in Lima, Peru. *Bull WHO*, 66, 369-74.
- Hernández, F., Herrera, M.L., Rivera, P., Rodríguez, R.M. (1984). Alteraciones morfológicas ocurridas espontáneamente en cultivos de *Campylobacter fetus* spp *jejuni*. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas* 5, 61-70.
- Herrera, M., Guevara, J., Badilla, G., & Rivera, P. (1984). Infección por *Campylobacter* en Humanos Revisión a propósito del primer caso de septicemia en Costa Rica. *Revista Médica Hospital Nacional de Niños "Dr. Carlos Sáenz Herrera"*, 19, 9-18.
- Horrocks, S.M., Anderson, R.C., Nisbet, D.J., Ricke, SC. (2008). Incidencia y ecología de *Campylobacter jejuni* y coli en los animales. *Anaerobe, Ames*, 1-8.

- Instituto de Salud Carlos III – Centro Nacional de Epidemiología (2013). Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual. Año 2011. Madrid (España). En Internet: <http://publicaciones.isciii.es>
- Jara M. (2006). Especies del género *Campylobacter* y del género *Arcobacter* en muestras de deposiciones humanas y animales. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- Karlyshev, A.V., Linton, D., Gregson, N.A., Lastovica, A.J. and Wren, B.W. (2000). Genetic and biochemical evidence of a *Campylobacter jejuni* capsular polysaccharide that accounts for Penner serotype specificity. *Molecular Microbiology* 35, 529-541.
- Konkel, M., Monteville, M., Rivera-Amill, V., Joens, L. (2001). The Pathogenesis of *Campylobacter jejuni* – Mediated Enteritis. *Current Issues Intestinal Microbiology* 2, 55-71.
- López, C. M., Giacoboni, G., Agostini, A., Cornero, F.J., Tellechea, D.M., Trinidad, J.J. (2002). Thermotolerant *Campylobacteres* in domestic animals in a defined population in Buenos Aires, Argentina. *Preventive Veterinary Medicine*. 55, 193-200.
- Lynch, O.A., Cagney, C., McDowell, D.A., Duffy, G. (2010). A method for the growth and recovery of 17 species of *Campylobacter* and its subsequent application to inoculated beef. *Journal of Microbiological Methods*, 83, 1–7.
- Macartney, L., Al-Mashar, R.R., Taylor, D.J., McCandlish, I.A. (1988). Experimental infection of dogs with *Campylobacter jejuni*. *Veterinary Record*. 122, 245-249.
- Malbrán C. (2001). Manual de Procedimientos *Campylobacter*. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Departamento Bacteriología. Buenos Aires.
- Manzanillas A. (2012). Determinación de la presencia de *Campylobacter* spp en perros con sintomatología clínica de diarrea en las Clínicas Veterinarias de la ciudad de Loja y el Hospital Docente Veterinario de la UNL. Loja.
- Marinou, I., Bersimis, S., Ioannidis, A., Nicolaou, C., Mitroussia-Ziouva, A., John Legakis, N., Chatzipanagiotou, S. (2012). Identification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from animal sources. *Frontiers in Microbiology*. 3. 58.
- Modolo, JR., Giuffrida, R. (2004). *Campylobacter upsaliensis* isolated from young dogs with and without diarrhea. *Journal of Brazilian Society of Tropical Medicine*, 37, 72-73.

- Miflin, J.K., Templeton, J.M., (2007). "Antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from poultry in the South-East Queensland region. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 59, 775-778.
- Moreno, G., Griffiths, P., Connerton, I., y Park, R. (1993). Occurrence of *Campylobacters* in small domestic and laboratory animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 49-54.
- Narváez, I. (2015). Prevalencia de las especies termotolerantes de *Campylobacter* (*C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. coli*, *C. lari* y *C. upsaliensis*) en niños con y sin diarrea del Hospital Manuel Ygnacio Monteros, durante el periodo Septiembre-Diciembre 2014. (Tesis de pregrado). Universidad Técnica Particular de Loja. Loja-Ecuador.
- Newell D.G. & Wagenaar J.A. (2000). Poultry infections and their control at the farm level. In: *Campylobacter*, Second Edition, Nachamkin I. & M.J. Blaser, eds. ASM Press, Washington DC, USA, 497–509.
- Newell, D.G., McBride, H., Saunders, F., Dehele, Y. and Pearson, A.D. (1985). The virulence of clinical and environmental isolates of *Campylobacter jejuni*. *J. Hyg*, 94, 45-54.
- Newell, D.G., Fearnley, C. (2003). Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 4343-4351.
- Notario, R., Borda, N., Gambande, T., Bermejo, J., Ponessa, A., Toledo, V. (2011). Cepas de *Campylobacter jejuni* resistentes a quinolonas aisladas de humanos, gallinas y pollos. *Medicina*, 71, 331-335.
- ODEPA. (2014). Carne de aves, producción y comercio. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. Ministerio de Agricultura. Gobierno de Chile.
- OIE (2008). Manual de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) sobre animales terrestres 2008. *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. Capítulo 2.9.3.
- OIE (2013). Organización Mundial de Sanidad Animal. http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Zoonoses
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2001). The increasing incidence of human campylobacteriosis. *Report and proceedings of a WHO consultation of experts, Copenhagen, Denmark, 21-25 November 2000*.

- Pantozzi, F., Moredo, F., Vigo, G., Giacoboni, G. (2010). Resistencia a los antimicrobianos en bacterias zoonóticas aisladas de animales domésticos. *Revista Argentina de Microbiología*. 42, 49-52.
- Rivera, N., Bustos, R., Montenegro, S., Sandoval, M., Castillo, J., Fernández, H., Maturana, M., Delgado, L., Contreras, A., Chávez, D. y Quevedo, I. (2011). Genotipificación y resistencia antibacteriana de cepas de *Campylobacter* spp. aisladas en niños y en aves de corral. *Revista Chilena Infectología*, 28, 555-562.
- Rivera-Amill, V., Kim, B.J., Seshu, J. and Konkel, M.E. (2001). Secretion of the virulence associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. *Journal of Infectious of Disease*, 183, 1607-1616.
- Rodrigues C. G. (2011). Ocorrência e suscetibilidade antimicrobiana de *Campylobacter* spp. em cães, gatos, crianças e sua Importancia zoonótica. 2011. 63 f. Dissertatation (Master) - Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinarias de la Facultad de Medicina Veterinária, Universida de Federal de Uberlândia.
- Rosenquist, H., Nielsen, N.L., Sommer H.M., Nørrung, B., Christensen, B.B. (2003). Quantitative risk assessment of human Campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *International Journal of Food Microbiology*. 83, 87–103.
- Rossi, M., Hanninen, M.L., Revez, J., Hannula, M., Zanoni, R.G. (2008). Occurrence and species level diagnostics of *Campylobacter* spp, enteric *Helicobacter* spp and *Anaerobiospirillum* spp in healthy and diarrheic dogs and cats. *Veterinary Microbiology*, 129, 304-314.
- Sáenz S. (2007). Determinación de la presencia de *Campylobacter* spp, en perros de la ciudad de Guatemala.
- Serrano L. (2011). Biodisponibilidad y farmacocinética de antibacterianos en avicultura. Recuperado el 15 de Julio del 2015, en: <http://www.engormix.com/MA-avicultura/sanidad/articulos/biodisponibilidadfarmacocinetica-antibacterianos-avicultura-t231/165-p0.htm>
- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P.A., Teixeira, P. (2011). *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Frontiers in Microbiology* 2, Art. 200.

- Shreeve, J.E., Toszeghy, M., Pattison, M., Newell, D.G. (2000). Sequential spread of *Campylobacter* infection in a multi-pen broiler house. *Avian Diseases*, 44, 983-988.
- Skirrow M.B. (1981). *Campylobacter* enteritis in dogs and cats: a “new zoonosis”, *Veterinary Research Communications*. 5, 13-19.
- Stern, N.J., Hernández, M., Blankenship, L., Deibel, K. E., Doores, S., Doyle, M. P., Ng, H., Pierson, M. D., Sofos, J. N, Sveum, W. H., Westhoff, D. C. (1985). Prevalence and Distribution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Retail Meats. *Journal of Food Protection*. 48, 595-599.
- The Center Food Security & Public Health (2005). *Campylobacteriosis*. Iowa State University. College of Veterinary Medicine Iowa.
- Torrálbo A. (2013). *Campylobacter* spp en granjas y matadero de broilers y en perros domésticos en Andalucía: estudio microbiológico, epidemiológico y de sensibilidad antimicrobiana. Universidad de Córdoba. Córdoba.
- Tresierra-Ayala, Alvaro., Fernández, Heriberto., Bendayán, María E., Pereyra, Gustavo., & Bernuy,, Alfonso. (1995). Aislamiento de especies termotolerantes de *Campylobacter* en dos poblaciones de pollos criados con y sin confinamiento. *Revista de Saúde Pública*, 29, 389-392.
- Urdaneta, S., Dolz, R. & Cerdà-Cuéllar, M. (2013). Prevalencia y estacionalidad de *Campylobacter* termófilos en granjas de pollos de engorde de Cataluña. Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA). Barcelona, España.
- Van, Deun K, Pasmans, F., Ducatelle, R., Flahou, B., Vissenberg, K., Martel, A., Van Den Broeck, W., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F. (2008). Colonization strategy of *Campylobacter jejuni* results in persistent infection of the chicken gut. *Veterinary Microbiology*, 130, 285-297.
- Wassenaar, T.M. (2011). Following an imaginary *Campylobacter* population from farm to fork and beyond: a bacterial perspective. *Letters in Applied Microbiology*, 53, 253-263.
- WHO, 2011. World Health Organization. *Campylobacter*. Fact sheet N° 255. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>
- Wikipedia®. (s.f). Mapa de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe, Ecuador. Recuperado el 12 de julio del 2015, de:

[https://es.wikipedia.org/wiki/Provincia_de_Zamora_Chinchipec#/media/File:Zamora-Chinchipec_in_Ecuador_\(%2BGalapagos\).svg](https://es.wikipedia.org/wiki/Provincia_de_Zamora_Chinchipec#/media/File:Zamora-Chinchipec_in_Ecuador_(%2BGalapagos).svg);

[https://es.wikipedia.org/wiki/Provincia_de_Loja#/media/File:Loja_in_Ecuador_\(%2BGalapagos\).svg](https://es.wikipedia.org/wiki/Provincia_de_Loja#/media/File:Loja_in_Ecuador_(%2BGalapagos).svg)

- Workman, S.N., Mathison, G.E., Lavoie, M.C. (2005). Pet dogs and chicken meat as reservoirs of *Campylobacter* spp in Barbados. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 2642-2650.
- 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, 1467-1473.
- Yan, S., Pendrak, M., Foley, S., Poderes J. (2005). *Campylobacter* infecciones y el síndrome de Guillain-Barré: problemas de salud pública desde la perspectiva de la seguridad alimentaria microbiana. *Clínica y Aplicada Inmunología críticas*, 5, 285-305.
- Ziprin, R.L., Young, C.R., Hume, M.E. and Konkel, M.E. (1999). The absence of cecal colonization of chicks by a mutant of *Campylobacter jejuni* not expressing bacterial fibronectin-binding protein. *Avian Diseases*. 43, 586-589.

ANEXOS

PROTOCOLOS

ANEXO 1: Toma de muestras en aves de corral

1. Coger a las gallinas de manera que la cloaca quede expuesta en la parte superior.
2. Introducir el hisopo estéril en la cloaca de la gallina con una profundidad de 3 cm aproximadamente.
3. Recolectar la materia fecal de la pared de la ampolla rectal realizando movimientos rotatorios con el hisopo.
4. Realizar un inóculo primario en el medio selectivo Butzler.
5. Colocar el hisopo en el medio de transporte (**Anexo 3**), romper el mango para evitar contaminación externa, cerrar el tubo y rotular el número o código que corresponda (**Figura 5**).

Nota: En el caso de no disponer del medio Butzler en el momento de la toma de la muestra, se puede realizar el inóculo primario del medio de transporte en el medio Butzler en un periodo máximo de dos horas, caso contrario se puede recurrir a la refrigeración temporal de la muestra (4°C).



Figura 5. Hisopado cloacal en aves de corral.

Elaborado por: La autora.

ANEXO 2: Toma de muestras en perros

1. Recolectar la materia fecal fresca de perros preferiblemente de consistencia blanda o diarreica.
2. Introducir el hisopo estéril en la materia fecal realizando movimientos rotatorios, procurar no tocar el suelo o césped.
3. Realizar un inóculo primario en el medio selectivo Butzler.
4. Colocar el hisopo en el medio de transporte (**Anexo 3**), romper el mango para evitar contaminación externa, cerrar el tubo y rotular el número o código que corresponda (**Figura 6**).

Nota: En el caso de no disponer del medio Butzler en el momento de la toma de la muestra, se puede realizar el inóculo primario del medio de transporte en el medio Butzler en un periodo máximo de dos horas, caso contrario se puede recurrir a la refrigeración temporal de la muestra (4°C).



Figura 6. Recolección de muestras de materia fecal en perros.

Elaborado por: La autora.

ANEXO 3: Medio de transporte para *Campylobacter*

Nota: Para un volumen de 250 ml.

1. Pesar 9,3 g de BHIB (Brain heart infusion broth)
2. Pesar 2,5 g de Extracto de levadura
3. Pesar 0,3 g de Agar- Agar
4. Colocar en un Erlenmeyer de 500 ml el BHIB, extracto de levadura y el Agar- Agar.
5. Medir 237,5 ml de agua destilada y verter en el Erlenmeyer.
6. Mezclar la solución hasta disolver completamente el medio.
7. Ajustar el pH a 7.
8. Esterilizar mediante calor húmedo en una autoclave a 121°C y 1,5 atm de presión por 20 minutos.
9. Enfriar el medio a 50°C.
10. Agregar 7,5 ml de suplemento y 2,5 ml de antibiótico CAT previamente reconstituido.
11. Adicionar 2,5 ml de sangre y homogenizar la mezcla.
12. Dispensar 3ml del medio de transporte en tubos con tapa rosca estériles.
13. Conservar el medio a 4°C.

ANEXO 4: Preparación de medios de cultivo

Nota 1: Para un volumen de 500 ml.

1. Pesar 20 g de Agar Sangre Base y 2,5 g de Extracto de levadura, colocarlos en un frasco estéril de 1000 ml.
2. Agregar 470 ml de agua destilada.
3. Ajustar el pH a 7 utilizando ácido clorhídrico diluido al 25%.
4. Esterilizar mediante calor húmedo en una autoclave a 121°C y 1 atm de presión por 20 minutos.
5. Reconstituir los antibióticos (*Campylobacter selective supplement Butzler, CAT o Blaser*) **Ver Nota 2.**
6. Adicionar el contenido del vial seleccionado en el medio de cultivo autoclavado cuando se encuentre a 50°C.
7. Agregar 25 ml de sangre al medio de cultivo y homogenizar evitando la formación de burbujas.
8. Dispensar aproximadamente 20 ml del medio por cada caja Petri o Bipetri de 94 x 16 mm, y esperar a que se solidifique el medio.
9. Guardar las cajas de forma invertida a 4°C previamente rotulada la fecha de elaboración del medio de cultivo.

Nota 2: Contenido de antibióticos de cada vial. Reconstituir cada uno con 5 ml de agua estéril.

a. Butzler:

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

b. CAT:

- Cefoperazona 16 mg
- Anfotericina B 5 mg

c. Blaser:

- Polimixina B 2500 U.I.
- Vancomicina 10 mg

- Anfotericina B 2 mg
- Trimetoprim 5 mg
- Cefalotina 15 mg

ANEXO 5: Tinción de Hucker

1. Realizar un frotis de las colonias sospechosas en una placa porta objetos y fijar con calor.
2. Colocar sobre el frotis una gota de colorante violeta y una gota de bicarbonato de sodio al 1% por 2 minutos.
3. Lavar la placa con agua de la llave y dejar secar.
4. Observar en el microscopio óptico de campo claro con el lente de 100X.

Nota: Los cultivos viejos pueden variar la morfología de *Campylobacter* spp tomando una forma esférica no viable.



Figura 7. *Campylobacter* spp visto desde microscopio óptico lente 100 X.

Elaborado por: La autora

ANEXO 6: Método de filtración en membrana de nitrocelulosa

1. Tomar de dos a tres asadas de las colonias de *Campylobacter* spp, colocarlas en 250 µl de solución salina y dar un Vórtex.
2. Colocar el filtro de membrana de nitro celulosa sobre las placas de medio selectivo (Butzler, Blasser o CAT).
3. Colocar los 200 µl de la disolución sobre el poro del filtro con una micropipeta, esperar hasta que se complete la filtración por un tiempo mínimo de 30 minutos.
4. Retirar el filtro con la ayuda de pinzas estériles.
5. incubar las placas de forma invertida en una atmósfera de microaerofilia a $42^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas.
6. Verificar la pureza de las cepas mediante una tinción Hucker.

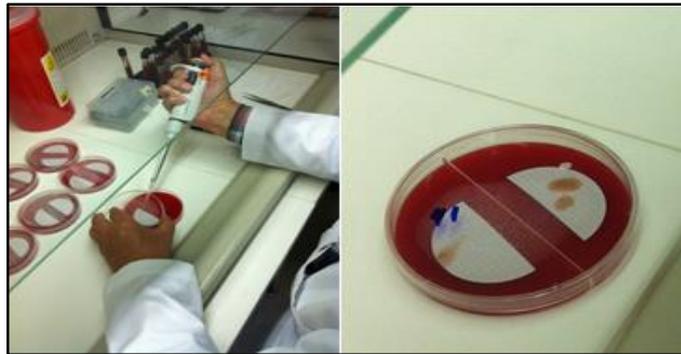


Figura 8. Filtración en membrana de Nitro-celulosa.

Elaborado por: La autora

ANEXO 7: Crioconservación

1. Tomar con un hisopo estéril las colonias puras de un cultivo fresco.
2. Inocular asépticamente el hisopo dentro del criotubo CRIOBANK™ MIXED (COPAN Diagnostics, Inc.).
3. Agitar el criotubo por 10 segundos.
4. Dejar los criotubos invertidos por 20 minutos.
5. Retirar el exceso de glicerina con la ayuda de una micropipeta.
6. Almacenar los criotubos a -70°C .

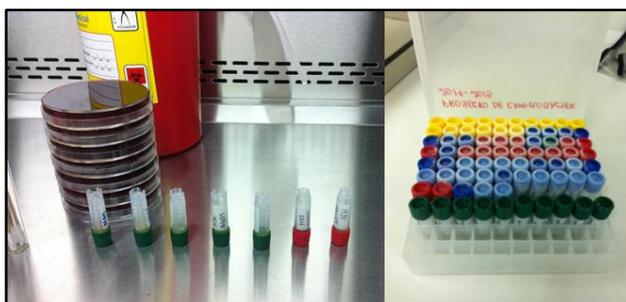


Figura 9. Crioconservación de *Campylobacter* spp.

Elaborado por: La autora

ANEXO 8: Pruebas bioquímicas para identificación de *Campylobacter* spp.

a. CATALASA

1. Tomar con un asa estéril colonias puras de un cultivo fresco y colocar en un porta objetos.
2. Adicionar una gota de peróxido de hidrógeno al 3%.
3. Leer los resultados.

Positivo: Formación de burbujas (**Figura 10a**).

Negativo: Ausencia de burbujas.

b. OXIDASA

1. Tomar con un asa estéril las colonias puras de un cultivo fresco.
2. Inocular en tiras reactivas Oxistrip de Hardy Diagnostics.
3. Leer los resultados.

Positivo: Coloración azul-violeta en la tira reactiva (**Figura 10b**).

Negativo: Ausencia de coloración en la tira reactiva.

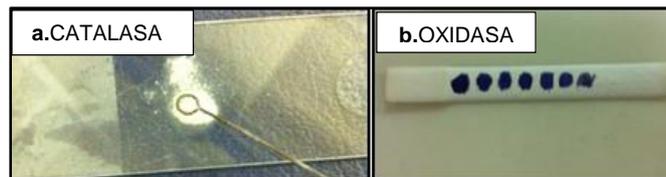


Figura 10. Catalasa y oxidasa en *Campylobacter* spp.

Elaborado por: La autora

c. HIDRÓLISIS DEL HIPURATO

1. Tomar 400 µl de solución de hipurato de sodio al 1% en un tubo.
2. Colocar de tres a cuatro asadas del cultivo puro en la solución de hipurato y dar un vortex.
3. Incubar en un baño María a 37°C por un periodo de dos horas.

4. Agregar 200 μ l de solución de ninhidrina y reposar 10 minutos más en el baño María.
5. Leer los resultados.

Positivo: Coloración azul-violeta intenso

Negativo: Coloración azul tenue o ausencia de coloración.

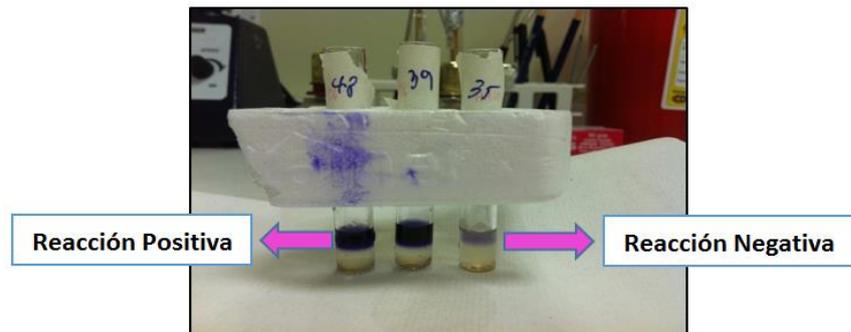


Figura 11. Hidrólisis del hipurato.

Elaborado por: La autora

ANEXO 9: Extracción de ADN bacteriano

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 de tres a cuatro asadas del cultivo fresco y dar vórtex.
 - Centrifugar por 30 segundos a velocidad máxima (13000 rpm).
 - Eliminar el sobrenadante y colocar 200 µl de PBS y dar vórtex.
 - Centrifugar por 30 segundos a velocidad máxima.
 - Eliminar el sobrenadante y colocar 200 µl de PBS, seguir al paso 2.
2. Añadir 25 µl de OB Proteasa Solution, dar vórtex para homogenizar la mezcla.
3. Añadir 220 µl de BL Buffer.
4. Incubar a 70°C durante 10 minutos, dar vórtex durante la incubación.
5. Añadir 220 µl de etanol al 100% dar vórtex para homogenizar la mezcla.
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.
8. Centrifugar a velocidad máxima durante 1 minuto.
9. Descartar 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 y 16 para una segunda etapa de lavado con ADN tampón de lavado.
18. Centrifugar la columna a velocidad máxima durante 2 minutos y 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 durante 2 minutos.
22. Centrifugar a velocidad máxima durante 1 minuto.
23. Repetir los pasos 20 a 22 para la segunda etapa de elución.

ANEXO 10: PCR Múltiplex para *Campylobacter* spp.

Tabla 6. Máster mix para PCR Múltiplex.

Nombre de la bacteria	Componentes	Volumen 1X (μl)	Concentración final
	Buffer	5,00	1x
	dNTPs	0,50	200uM
	Cl2Mg	1,50	1,5mM
	Primers:		
Género <i>Campylobacter</i>	C412F	0,08	0,2uM
	C1228R	0,08	0,2uM
<i>C. jejuni</i>	C-1	0,08	0,2uM
	C-3	0,08	0,2uM
<i>C. coli</i>	CC18F	0,08	0,2uM
	CC519R	0,08	0,2uM
	Taq 5U/μl	0,125	1.25U
	H2O	16,39	
	DNA	1,00	
	Volumen final	25,00	

Tabla 7. Condiciones de temperaturas para PCR Múltiplex.

ETAPAS PARA PCR		Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial		95	2	----
Touchdown	Desnaturalización	95	0,5	6
	Anillamiento	68-56	1,5	
	Extensión	72	1	
Cycling	Desnaturalización	95	0,5	30
	Anillamiento	56	1,5	
	Extensión	72	1	
Extensión final		72	10	----
Mantenimiento		4	----	----

Tabla 8. Temperaturas de anillamiento para PCR Múltiplex.			
	Primers	Temperatura de anillamiento (°C)	Temperatura final (°C)
Género	C412F	58	56
Campylobacter	C1228R*	54	
<i>Campylobacter jejuni</i>	C-1	65,3	67,4
	C-3	69,5	
<i>Campylobacter coli</i>	CC18F	67,6	67,25
	CC519R	66,9	

Elaborado por: La autora

ANEXO 11: Electroforesis en gel de agarosa.

NOTA: Para preparación de un gel de 35 ml al 1,5%.

1. Pesar 0,525 g de Agarosa UltraPure™ de Invitrogen y colocar en un vaso de precipitación de 50 ml.
2. Adicionar 35 ml de buffer TBE 1X.
3. Disolver por calentamiento la solución evitando llegar a la temperatura de ebullición para no perder producto con la evaporación.
4. Adicionar 3 µl de SYBR safe DNA de Invitrogen™.
5. Verter la solución en la bandeja para electroforesis.
6. Colocar la peineta para la formación de pocillos.
7. Retirar la peineta cuando se haya solidificado el gel.
8. Colocar la bandeja que contiene el gel en la cubeta para electroforesis horizontal Enduro™.
9. Llenar la cubeta con el buffer TBE 1X hasta cubrir completamente el gel.
10. Adicionar 1µl del marcador de peso molecular y 2 µl de los productos de la PCR Múltiplex (controles y muestras).
11. Tapar la cubeta conectando a la fuente de poder Enduro™ marca Labnet.
12. Programar la corrida inicial por 10 minutos a 100 Volt y 300 mA, para que descienda todo el producto de los pocillos al gel.
13. Programar la corrida por 40 minutos a 28 Volt y 300 mA.
14. Revelar el gel mediante luz UV a 300 nm en el Transluminador UV Labnet.

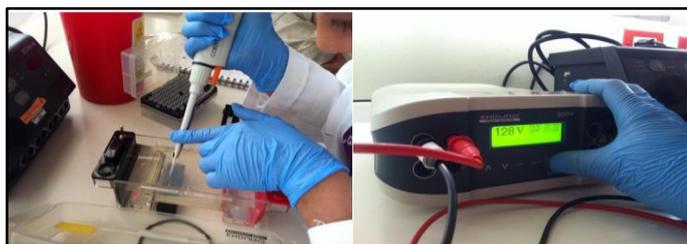


Figura 12. PCR Múltiplex en gel de agarosa.

Elaborado por: La autora

ANEXO 12: Determinación de la Actividad Antimicrobiana

1. Tomar con un hisopo estéril las colonias del cultivo puro.
2. Colocar el hisopo en un tubo que contenga 4 ml de solución salina, homogenizar y ajustar a una turbidez de 0.5 en la escala McFarlan.
3. Hidratar el Medio Agar Mueller Hinton ajustando el pH a 7.
4. Esterilizar el Medio Agar Mueller Hinton.
5. Suplementar con 5% de sangre el Medio Agar Mueller Hinton cuando alcance una temperatura de 50°C.
6. Sembrar mediante hisopado continuo las placas.
7. Colocar los discos de antibióticos con una pinza estéril a una distancia de 30 mm del borde de la caja y entre los discos.
8. Incubar las placas a 42°C por 48 horas en una atmósfera de microaerofilia.
9. Leer los resultados en base a la **Tabla 8**.

Tabla 9. Puntos de corte para lecturas de antibiogramas.

ANTIBIÓTICO	S≥	R≤
Amoxicilina+ácido clavulánico	19	14
Ampicilina	19	14
Ciprofloxacina	26	26
Eritromicina	20	20
Gentamicina	17	17
Tetraciclina	30	30

Fuente: CA-SFM/EUCAS, 2014.



Figura 13. Antibiograma de las cepas de *Campylobacter* spp.

Elaborado por: La autora