



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

*La Universidad Católica de Loja*

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Especies de *Campylobacter* resistentes a fluroquinolonas aisladas en muestras fecales en caninos de la ciudad de Loja durante el periodo abril-julio 2016.

TRABAJO DE TITULACIÓN

**AUTOR:** Ordoñez Armijos, Eduardo Vinicio

**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 DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magíster.

Simaluiza Masabanda Rosa Janneth

### DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación **“Especies de *Campylobacter* resistentes a fluroquinolonas aisladas en muestras fecales en caninos de la ciudad de Loja durante el periodo abril-julio 2016”** realizado por Ordoñez Armijos Eduardo Vinicio; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja,

.....

Mgtr. Simaluiza Masabanda, Rosa Janneth

**Directora**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Eduardo Vinicio Ordoñez Armijos, declaro ser autor del presente trabajo de titulación: **Especies de *Campylobacter* resistentes a fluroquinolonas aisladas en muestras fecales en caninos de la ciudad de Loja durante el periodo octubre-diciembre 2015**, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Rosa Janneth Simaluisa Masabanda, directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

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

.....

Ordoñez Armijos, Eduardo Vinicio

Cédula 1104953615

## DEDICATORIA

*A Dios, por ser el motor de mi vida, fuente de enseñanza, de fe y compromiso; por bendecir cada uno de mis pasos para llegar hasta donde he llegado.*

*A mis padres, por su amor incondicional, porque de ellos aprendí que sin importar la cantidad de obstáculos que se presenten debo luchar y trabajar para conseguir mis ideales.*

*A la Mgtr. Janneth Simaluiza, por la dirección de este trabajo, gracias a su ayuda logre culminar mi carrera profesional.*

L.S.C.P

## **AGRADECIMIENTOS**

*Agradezco a Dios por su infinita bondad, y por haberme acompañado en los momentos en los que más lo necesitaba, por darme salud, sabiduría y fortaleza para culminar un peldaño más de mis metas, y por brindarme la confianza de saber que él siempre va a estar conmigo.*

*A mi familia, por ser los mejores, por haberme guiado y apoyado sobre todas las cosas, por dedicarme tiempo, para forjarme como persona y mantenerme seguro en mí caminar.*

*Mi más sincero agradecimiento a la Mgtr. Janneth Simaluiza, directora de la presente investigación, por su orientación, guía, sabiduría y supervisión de la misma.*

*Agradezco a mis amigos, aquellos que conocí en la universidad y aquellos viejos amigos con los que he forjado grandes lazos de amistad, por sus sabios consejos y sobretodo su cariño.*

*A Lizeth Stefanía, quien ha sido una persona incondicional, mi mejor amiga, mi consejera.*

*A todos ustedes, muchas gracias.*

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA.....	1
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS .....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
RESUMEN.....	10
ABSTRACT .....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
<b>CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>14</b>
1.1. <i>Campylobacter</i> .....	15
1.1.1. Antecedentes.....	15
1.1.2. Características generales del género <i>Campylobacter</i> .....	15
1.1.3. Características de crecimiento. ....	16
1.1.4. Medios de cultivo.....	16
1.2. Clasificación taxonómica .....	17
1.2.1. <i>Campylobacter jejuni</i> subesp. <i>jejuni</i> . ....	17
1.2.2. <i>Campylobacter coli</i> . ....	17
1.2.3. <i>Campylobacter fetus</i> subesp. <i>fetus</i> y subesp. <i>venerealis</i> . ....	18
1.2.4. <i>Campylobacter upsaliensis</i> .....	18
1.2.5. <i>Campylobacter lari</i> .....	18
1.3. Epidemiología .....	18
1.3.1. Fuentes de transmisión y reservorio. ....	19
1.4. Patogenia.....	20
1.4.1. Signos clínicos en canes. ....	20
1.5. Resistencia antibiótica .....	20
1.6. Diagnóstico de laboratorio .....	21
<b>CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
2.1. Muestreo.....	24

2.2.	Aislamiento e identificación de <i>Campylobacter spp.</i> .....	24
2.2.1.	Filtración pasiva y criopreservación. ....	25
2.3.	Pruebas bioquímicas .....	25
2.3.1.	Hidrólisis de hipurato. ....	25
2.4.	Identificación molecular de <i>Campylobacter spp.</i> .....	26
2.5.	Actividad antimicrobiana .....	27
<b>CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>		<b>29</b>
3.1.	Aislamiento e identificación de especies de <i>Campylobacter</i> en perros .....	30
3.2.	Análisis molecular de <i>Campylobacter</i> .....	32
3.3.	Actividad antimicrobiana .....	34
<b>CONCLUSIONES .....</b>		<b>36</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>		<b>37</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>		<b>38</b>
<b>ANEXOS .....</b>		<b>41</b>
	ANEXO 1: Toma de muestra en perros.....	42
	ANEXO 2: Medio Butzler .....	43
	ANEXO 3: Medio de transporte enriquecido para <i>Campylobacter</i> .....	44
	ANEXO 4: Tinción de Hucker .....	45
	ANEXO 5: Filtrado de colonias mediante membrana de nitrocelulosa.....	46
	ANEXO 6: Hidrólisisde hipurato .....	47
	ANEXO 7. Extracción de ADN molecular .....	48
	ANEXO 8. Mix para PCR MULTIPLEX de <i>Campylobacter spp.</i> .....	50
	ANEXO 9. Temperaturas de anillamiento para PCR MULTIPLEX.....	51
	ANEXO 10: Electroforesis en gel de agarosa .....	52
	ANEXO 11: Preparacion de buffer TBE 10X(Tris, Borato y EDTA).....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Morfología de <i>Campylobacter spp.</i> .....	16
<b>Figura 2.</b> Área de recolección de las muestras. ....	24
<b>Figura 3.</b> Aislamiento de cepas de <i>Campylobacter</i> . ....	25
<b>Figura 4.</b> Purificación de <i>Campylobacter</i> mediante filtración. ....	25
<b>Figura 5.</b> Hidrólisis de hipurato. ....	26
<b>Figura 6.</b> Antibiograma .....	28
<b>Figura 7.</b> Prevalencia de <i>Campylobacter spp.</i> .....	30
<b>Figura 8.</b> Identificación de especies de <i>Campylobacter</i> . ....	31
<b>Figura 9.</b> Identificación molecular de especies <i>Campylobacter</i> mediante PCR-MULTIPLEX... .....	33
<b>Figura 10.</b> Identificación de especies de <i>Campylobacter</i> mediante PCR-MULTIPLEX. ....	33
<b>Figura 11.</b> Susceptibilidad bacteriana de las especies de <i>Campylobacter spp.</i> .....	34

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Secuencias de primers empleados para identificación de las especies de <i>Campylobacter spp</i> .mediante PCR-MULTIPLEX. ....	27
<b>Tabla 2.</b> Puntos de corte para susceptibilidad de <i>Campylobacter spp</i> . ....	28

## RESUMEN

*Campylobacter* es una bacteria zoonótica ampliamente distribuida, presente en animales de vida silvestre y domésticos. Es el agente causal de gastroenteritis bacteriana a nivel mundial, responsable del 5 al 15% de casos de diarrea principalmente en niños y personas inmunodeprimidas. Al considerar su importancia en el diagnóstico clínico en las principales fuentes de infección para el ser humano, se realizó un estudio epidemiológico en perros; reservorio que se encuentra en constante contacto con el hombre. Se recolectó 60 muestras de materia fecal, de las cuales el 33.3% (20/60) fueron positivas para *Campylobacter spp.* Entre las especies aisladas *C. coli* representó el 15% (3/20) y *C. jejuni* el 85% (17/20). Al evaluar la actividad antimicrobiana de 6 drogas fluorquinolonas frente a *Campylobacter spp.*, se determinó una resistencia de 15% a ciprofloxacino, gentamicina y ácido nalidíxico, y 100% de sensibilidad frente a ampicilina y amoxicilina/ácido clavulánico.

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

## ABSTRACT

*Campylobacter* is a widespread zoonotic bacteria present in wildlife animals and is considered the causative agent of bacterial gastroenteritis worldwide, accounting for 5 to 15% of cases of diarrhea, mainly in children and immunosuppressed people. Considering its importance in clinical diagnosis as one of the main sources of infection for humans, an epidemiological study in dogs, in constant contact with humans was performed. Sixty stool samples, out of which 33.3% were positive for *Campylobacter spp* were collected (100%). Among the species isolated *C. coli* represented 20% and *C. jejuni* 80% of the isolated species. In evaluation the antimicrobial drug concentration of 6 fluoroquinolone antibiotics against *Campylobacter spp*. We observed low levels of resistance to 15% ciprofloxacin, gentamicin, and nalidixic acid, and 100% sensitivity to ampicillin and amoxicillin/clavulanic acid.

**KEYWORDS:** *Campylobacter*, *C. coli*, *C. jejuni*, dogs, fluoroquinolone.

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias del género *Campylobacter* son una de las principales causas de las enfermedades diarreicas de transmisión alimentaria en el ser humano, y las bacterias más comunes causantes de gastroenteritis en el mundo entero. En los países tanto desarrollados como en vías de desarrollo provocan más casos de diarrea que la *Salmonella* transmitida por los alimentos, debido a su elevada incidencia así como a su duración y posibles secuelas (García *et al.*, 2009).

Las infecciones producidas por *Campylobacter*, tienen un carácter híperendémico que afecta a toda la población, con mayor incidencia en niños menores de 5 años; sin embargo, la tasa de infección disminuye con la edad gracias a la adquisición de inmunidad. Por lo general, esta enfermedad causa gastroenteritis en aves, animales de compañía, animales de granja y silvestres, convirtiéndose en la enfermedad zoonótica más representativa a nivel mundial.

Entre las especies que han tenido mayor influencia en los brotes epidemiológicos se encuentran *Campylobacter coli*, reconocido como agente causal de diarrea entre el 5 y 10% de todos los casos de Campilobacteriosis y *Campylobacter jejuni*, especie más frecuente aislada, tanto en países en vías de desarrollo como países industrializados (Fernández, 2011).

Las especies termotolerantes de *Campylobacter* reconocen como reservorio natural a gran variedad de especies animales, que en contacto con el hombre son fuente potencial de infección. Entre las variedades se encuentra el perro, portador común que por su estrecho contacto con el hombre, reviste gran importancia en el origen canino de muchas infecciones humanas. En este animal, la bacteria se aloja en el tracto intestinal y alberga con mayor frecuencia a la variedad *C.jejuni*. Existen estudios limitados sobre la incidencia de *Campylobacter spp* en este reservorio. Aquellas investigaciones realizadas revelan que la tasa de aislamiento de *Campylobacter* es más común en perros jóvenes y con mayor incidencia en perros callejeros que en domésticos (Gómez, 2013).

A nivel mundial, las infecciones producidas por las especies de *Campylobacter*, el 84% corresponde a *C. jejuni* y el 7% a *C. coli* (Gómez, 2013). Según la Organización de las Naciones Unidas (ONU) reporta que se diagnostican 14 casos cada año por cada 100000 habitantes.

En los países de Latinoamérica 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 (Fernández, 2011).

En Ecuador las investigaciones realizadas son limitadas y aquellas existentes evidencian que entre las especies de *Campylobacter*, responsables de infección diarreica se encuentran *C. fetus* y *C. coli* como importantes agentes enteropatógenicos, vinculados a condiciones sanitarias deficientes y al contacto con personas y animales infectados (Manzanillas, 2012).

Tomando en cuenta la existencia de pocos antecedentes en nuestro país, la presente investigación pretende contribuir a un mejor conocimiento del problema de la Campilobacteriosis en nuestro medio, proponiendo determinar la prevalencia de *Campylobacter* en perros de la ciudad de Loja; estableciendo índices de prevalencia de la bacteria, las especies presentes, sus características morfológicas; y los perfiles de resistencia antibiótica en base a la información disponible y la significancia del rol de los perros en enfermedades zoonóticas.

**CAPÍTULO I**  
**MARCO TEÓRICO**

## **1.1. *Campylobacter***

### **1.1.1. Antecedentes.**

Campilobacteriosis es la zoonosis más importante a nivel mundial, causante de infecciones intestinales, producida por el género bacteriano *Campylobacter*. En los años 70, las especies de *Campylobacter* se clasificaban dentro del género *Vibrio*, como resultado de un estudio en abortos epizooticos en ganado bovino y ovino en donde se descubrió la presencia de una bacteria espiral y móvil en fluidos fetales con características similares a la morfología del género *Vibrio* por lo cual se le asignó el nombre de *Vibrio fetus*. Investigaciones realizadas en los años 1931 y 1944, aislaron otros microorganismos con características típicas de “un vibrión” que producían afecciones intestinales e inclusive disentería en animales (Manzanillas, 2012).

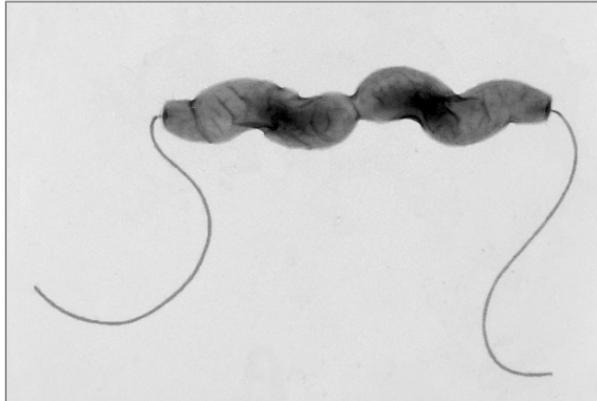
La relación de estos microorganismos con problemas gastrointestinales en humanos surge a partir de un brote epidemiológico de gastroenteritis que afectó a una gran parte de pacientes en Estados Unidos, en donde los resultados de los exámenes directos indicaron la presencia de un 22% de vibrios en las muestras, dando lugar a la idea, de que la presencia de vibriones en las muestras confirma la relación de estas bacterias con diarreas en humanos (Herrera *et al.*, 1964).

Finalmente en 1983, investigadores demostraron que los vibrios aislados presentaban diferencias a las especies del género *Vibrio*, en cuanto a la constitución del material genético y su incapacidad de fermentar hidratos de carbono, por lo que se agruparon en un nuevo género diferente y autónomo denominado *Campylobacter* (*kampulos*, curvo; *bacter*, bacteria) Desde entonces se ha desarrollado medios selectivos que facilitaron el aislamiento de estos microorganismos y determinaron las patologías asociadas a su presencia (Fernández y Farase, 2003).

### **1.1.2. Características generales del género *Campylobacter***

El género *Campylobacter* morfológicamente corresponde a un grupo de bacterias (bacilos Gram negativos), curvos en forma de S, con un tamaño que varía entre los 0,2 a 0,9  $\mu\text{m}$  de ancho y 0,5 a 5  $\mu\text{m}$  de largo. Son móviles, debido a la presencia de un flagelo único polar en uno o ambos extremos, lo que les confiere la capacidad de realizar giros rápidos sobre su propio eje a modo de saca corchos (**Figura 1**); característica por la cual se pueden distinguir de otras bacterias en su observación microscópica. Cuando las bacterias se mantienen en cultivos de varios días adquieren forma ovoide y pierden viabilidad como consecuencia de la

pérdida de su capacidad para multiplicarse en medios de cultivo inertes, que han perdido la mayoría de sus componentes biológicos (Vandamme, 2000).



**Figura 1.** Morfología de *Campylobacter spp.*  
**Fuente:** Vandamme, 2000.

Su metabolismo es únicamente respiratorio por lo que no utilizan azúcares, y emplean como fuentes de carbono y energía algunos aminoácidos u otros compuestos intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico. Todas las especies son oxidasa y catalasa positiva. A nivel genético la composición de citosina-guanina del ADN varía entre 28 y 46 %mol (Vandamme, 2000).

#### **1.1.3. Características de crecimiento.**

Estas bacterias son microaerófilas estrictas que necesitan de 5-6% de O<sub>2</sub> para multiplicarse, además requieren de un tiempo de incubación que fluctúa entre 48 horas para especies termotolerantes y 5 a 7 días para otras especies pertenecientes al género. No fermentan ni oxidan carbohidratos. En cuanto a las condiciones de temperatura y pH, para las especies termotolerantes la temperatura ideal es de 42°C a la cual, alcanzan su mayor desarrollo, pudiendo también ser incubadas a 37°C. Para el grupo de los no termotolerantes, la temperatura a la que mejor se desarrollan es 37°C. Respecto al pH del medio, este deberá encontrarse en el rango de 6,5 a 7,5 (Sáenz, 2007).

#### **1.1.4. Medios de cultivo.**

El género *Campylobacter* constituye un grupo de microorganismos que requieren medios selectivos de cultivo, constituidos por la combinación de agar sangre y un suplemento de varios antibióticos, como por ejemplo agar Skirrow, Butzler y Campy-BAP. El empleo de técnicas de filtración y medios de cultivo selectivo se ha convertido en el método recomendado para el aislamiento primario de estas especies (Hoffer et al, 2010).

En general, las colonias de *Campylobacter* en los medios de cultivo son pequeñas, planas, lisas, brillantes y efusas, dispersas a lo largo de la estría de inoculación. En medios de cultivo fresco y con alto contenido de humedad, se observa la formación de un velo sobre la superficie del agar, lo cual se debe al movimiento activo de las bacterias. La exposición a tiempos de incubación prolongada, produce que las colonias se tornen convexas, de color ámbar o metálico (Hoffer et al, 2010).

## **1.2. Clasificación taxonómica**

Las bacterias pertenecen a la familia *Campylobacteraceae* del orden *Campylobacterales*, incluido en la clase *Epsilonproteobacteria*, *phylum Proteobacteria*. Actualmente comprende 25 especies, la mayoría de las cuales reconoce como reservorio natural a mamíferos, aves domésticas como de vida libre y animales de compañía. Las especies principales reconocidas como zoonóticas, patógenas para el hombre son *C. fetus* subespecie *fetus* causante de aborto en bovinos e infecciones sistémico-opportunistas, en el ser humano; *C. coli*, *C. jejuni* subespecie *jejuni*, *C. upsaliensis*, *C. lari* como importantes agentes de diarrea, especialmente en niños, conocidas también como especies termotolerantes por su capacidad de crecer a 43°C (Carmona, Aguilar y Roa, 1987).

### **1.2.1. *Campylobacter jejuni* subesp. *jejuni*.**

*C. jejuni* es el patógeno humano más importante en la producción de gastroenteritis y el más virulento por su mayor resistencia a la fagocitosis. Esta especie bacteriana se encuentra en una gran variedad de huéspedes como animales domésticos: pollos, pavos, cerdos, ovejas y los animales de compañía como perros y gatos (García, 2008).

La patogenia de *C. jejuni* se asocia a la capacidad que tiene la bacteria para movilizarse y adherirse a la mucosa colónica gracias a los flagelos que posee y la estructura antigénica diversa derivada de sus componentes lipopolisacáridos que tiene actividad endotóxica por lo que la infección sistémica que desarrolla puede originar sepsis y shock (Ziprin et al, 2003).

### **1.2.2. *Campylobacter coli*.**

*C. coli* es el segundo agente causal aislado con mayor frecuencia después de *C. jejuni* y se encuentran estrechamente relacionados al compartir características de cultivo como la sensibilidad al ácido nalidíxico y la resistencia a cefalotina, la manera de poder diferenciarlos es a través de la prueba de hidrólisis de hipurato; *C. jejuni* hidroliza mientras que *C. coli* no lo realiza. Esta especie es la responsable del 10% de los casos reportados a nivel mundial de enfermedades intestinales bacterianas en humanos (Koneman y Allen, 2008).

### **1.2.3. *Campylobacter fetus* subesp. *fetus* y subesp. *venerealis*.**

*C. fetus* es la especie causante de la denominada Campilobacteriosis bovina; se asocia con abortos infecciosos en ganado vacuno y es el causal poco frecuente de infecciones humanas; cuando las llega a producir puede causar infecciones intestinales y sistémicas, siendo la septicemia la presentación clínica más frecuente. Ambas subespecies habitan naturalmente en el tracto reproductor bovino y se multiplican escasamente en el tracto intestinal. A nivel molecular son similares, al comparar la región hipervariable del ARNr región parcial 16S de las dos subespecies, mostrando una homología del 99,9% y sólo una base diferente entre 1400 pares de bases secuenciadas (Koneman y Allen, 2008).

### **1.2.4. *Campylobacter upsaliensis*.**

Esta especie bacteriana se caracteriza por ser catalasa negativa y utilizar como fuentes de reservorio a perros sanos y gatos asintomáticos; y suele ser un agente oportunista para producir infecciones en niños. El aislamiento de estas bacterias suele verse dificultado por la alta sensibilidad a los fármacos presentes en los medios de cultivo selectivo y solo se puede llegar a recuperar unas pocas cepas a partir de métodos de filtración (Fernández, 2008).

*C. upsaliensis* es responsable de la mayoría de gastroenteritis y bacteriemias en humano transmitida por contacto directo con las heces de los animales; y la causa primordial de diarreas en perros (Fernández, 2008).

### **1.2.5. *Campylobacter lari*.**

*C. lari* es una de las bacterias patógenas casi infrecuentes en los seres humanos; son endémicos de aves silvestres especialmente gaviotas marinas. Se caracterizan por ser termófilas, halotolerantes y resistentes al ácido nalidíxico; aspectos que la distinguen de las especies morfológicamente similares a *C. jejuni* y *C. coli*. Tienen la probabilidad de llegar a producir enteritis parecida a la generada por *C. jejuni* en personas inmunodeprimidas (Gómez, 2007).

## **1.3. Epidemiología**

*Campylobacter* produce una de las infecciones gastrointestinales más importantes del mundo que afecta en su mayor parte a los países en vías de desarrollo, en donde la epidemiología se asocia a la contaminación fecal-ambiental; en países industrializados se involucra el consumo de alimentos contaminados especialmente el pollo, aunque la incidencia de la infección en humanos se estima alrededor del 1% de la población por año.

La Organización Mundial de la Salud describe a la Campilobacteriosis como la infección gastrointestinal que se manifiesta con dolor abdominal, malestar general, fiebre, náuseas, vómito, diarrea que en ocasiones presenta moco y sangre. El tiempo de duración de la enfermedad varía entre 2 a 5 días y puede llegar a prolongarse en casos de recaída. En los niños, la infección puede ser leve, pero mortal en niños muy pequeños, personas de edad avanzada e individuos inmunodeprimidos (WHO, 2011).

A nivel mundial la incidencia de *Campylobacter* en infecciones gastrointestinales se encuentra en un 20 a 30% de la población; en donde la mayor incidencia se da en Latinoamérica con una frecuencia del 5 a 20% (Hoffer et al, 2010).

### **1.3.1. Fuentes de transmisión y reservorio.**

Un alto porcentaje de infecciones gastrointestinales es provocado por la ingesta de carne de ave mal cocida, productos lácteos y agua contaminada con heces infectadas. La vía de contacto suele ser la ingesta accidental de heces de animales infectados, a través de la manipulación directa o indirecta. Otro modo de infección que afecta principalmente a los niños suele ser el contagio al mantener contacto con animales de compañía, perros y gatos (Sáenz, 2007).

Las fuentes reservorio de esta especie bacteriana suele proliferar en diversos ambientes como animales, seres humanos e incluso en los alimentos de consumo masivo. En los reservorios animales las especies de *Campylobacter* se encuentran como comensales en el tracto gastrointestinal de animales domésticos y de vida silvestre como ganado vacuno, cerdos, aves de corral, perros, gatos entre otros. La adquisición del germen en los animales suele ocurrir a una edad temprana y puede causar morbimortalidad o en la mayoría de las veces las bacterias se fijan en la pared intestinal e inclusive órganos genitales en el caso del ganado bovino sin producir sintomatología y conducir al animal a un estado de portador de por vida (Gacitua, 2006).

Al referirse a un reservorio humano, se establece la posibilidad de que se pueda dar la transmisión entre persona infectada-sana, esto sucede cuando las personas infectadas sintomáticas manipulan alimentos contaminados o cuando existe contaminación cruzada en la manipulación o cocción de alimentos; estos últimos constituyen el reservorio ambiental, en donde los alimentos de origen animal mal cocidos, agua contaminada con heces e inclusive leche no pasteurizada pueden ser la fuente de brotes de Campilobacteriosis (Sáenz, 2007).

## **1.4. Patogenia**

Las especies termotolerantes de *Campylobacter* reconocen como reservorio natural una gran variedad de especies animales, las que pueden actuar como fuente de infección para el ser humano, entre ellas se encuentra el perro que por su estrecho contacto con el hombre, reviste gran importancia como reservorio de estas bacterias, especialmente si se considera el origen canino de muchas infecciones humanas. (Fernández, 2008).

### **1.4.1. Signos clínicos en canes.**

El principal signo es la diarrea que puede ser desde leve hasta acuosa o mucoide sanguinolenta. Además puede presentarse fiebre, anorexia y vómitos. La condición generalmente dura 1-3 semanas. *C. jejuni* puede causar diarrea aguda o crónica comúnmente con moco y sangre del intestino grueso en animales menores de 6 meses y llegar a ocasionar enfermedad sistémica y colecistitis (inflamación de la vesícula biliar). Sin embargo sucede en ciertos casos que animales infectados eliminan el germen en las heces y no presentan sintomatología clínica (Sáenz, 2007).

## **1.5. Resistencia antibiótica**

Desde los años 50, los antibióticos se utilizaban para controlar enfermedades en animales y humanos, sin embargo se observó que su uso no solo tenía efectos terapéuticos sino que también actuaban como promotores de crecimiento en animales sanos. Al usarlos en patologías no clínicas ha provocado que las bacterias generen resistencia o cambien su forma génica y el medicamento no cumpla su función o pierda su efecto por completo produciendo que se vuelvan ineficaces para inhibir el desarrollo de la bacteria. Los antibióticos se usan como promotores de crecimiento en dosis sub-terapéuticas durante largos períodos en animales de crianza, más no en animales de compañía. El mecanismo por el cual los antibióticos favorecen el crecimiento de los animales no se conoce con exactitud, pero actúan modificando cuantitativa y cualitativamente la flora microbiana intestinal, provocando una disminución de los microorganismos causantes de enfermedades sub-clínicas.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que la resistencia a los antimicrobianos es un complejo problema mundial que requiere la creación de un sistema de monitoreo global en medicina humana y animal. Países industrializados poseen programas de monitoreo divididos en tres grupos bacterianos, bacterias patógenas, bacterias zoonóticas y bacterias indicadoras. Generalmente los programas buscan monitorear la resistencia de las bacterias entéricas provenientes de animales sanos para detectar la

tendencia al actuar como reservorios de genes resistentes que pueden transmitirse entre bacterias y causar infecciones (Pantozzi *et al*, 2009).

El tratamiento de primer orden para Campilobacteriosis es la ingesta de fluidos y bebidas ricas en electrolitos, pero además existen casos en los cuales es necesario el uso de antibióticos, por ejemplo las fluoroquinolonas que en la mayoría de situaciones su uso ha sido ineficaz y ha provocado resistencia ante este grupo de bacterias (OMS, 2011). Las fluoroquinolonas han sido usadas por varias décadas desde su descubrimiento en humanos como en animales, son la tercera familia de antibióticos más consumidos a nivel mundial después de las penicilinas y los macrólidos; en el campo veterinario en algunos países se han prohibido ya que el enlace flúor se adhiere a proteínas y no pueden ser sintetizadas por lo que se ha prohibido el uso de este grupo de antibióticos en especial en animales destinados para consumo humano (Orden y López, 2001).

La pérdida progresiva de sensibilidad a quinolonas debida a la adquisición de mutaciones aditivas tiene importantes consecuencias de tipo epidemiológico. El tratamiento con fluoroquinolonas de infecciones producidas por microorganismos con alguna mutación inicial en sus topoisomerasas tiene un riesgo elevado de seleccionar resistencia de más alto nivel como consecuencia de la aparición de nuevas mutaciones que se suman a la preexistente (Oteo y Campos, 2011).

### **1.6. Diagnóstico de laboratorio**

La detección de especies de *Campylobacter* se pueden realizar mediante muestras de heces (hisopados rectales) y de sangre. La identificación se basa en características fenotípicas y genotípicas clásicas, en cuanto a la primera se realiza observación morfológica, reacciones bioquímicas y se determina la temperatura de crecimiento (Farance y Viñas, 2007).

La detección directa se puede dar a través de su morfología microscópica, es decir identificar la presencia de bacilos pequeños y curvos con “alas de gaviota”, teñidos débilmente como gramnegativos mediante tinción directa en la materia fecal. El aislamiento de estos microorganismos se realiza con el empleo de medios de cultivo selectivos que contiene como ingrediente principal 5% de sangre para proporcionar aminoácidos esenciales y suplementos biológicos para el crecimiento bacteriano, además de antibióticos y antimicóticos que inhibe la flora acompañante (Farance y Viñas, 2007).

A nivel molecular es posible realizar la identificación de *Campylobacter* y la especie a la que pertenece mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la que se basa en la

amplificación de un fragmento o del gen completo de la flagelina o los genes ribosómicos; esta técnica se ha utilizado para la detección en alimentos, en aguas y muestras clínicas (Hernández, 2007).

**CAPÍTULO II**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1. Muestreo

Se recolectaron 60 muestras fecales de perros en zonas recreacionales y veterinarias particulares de la Ciudad de Loja, Provincia de Loja (**Figura 2**) en el periodo abril-julio 2016. Las muestras fueron obtenidas mediante hisopado rectal y evacuación espontánea (**Anexo 1**) y procesadas en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Técnica Particular de Loja.



**Figura 2.** Área de recolección de las muestras.  
Fuente: Google maps.org.

## 2.2. Aislamiento e identificación de *Campylobacter* spp.

Las muestras obtenidas se inocularon directamente en Medio Butzler (**Anexo 2**) y medio de transporte enriquecido para *Campylobacter* spp (**Anexo 3**). Se incubaron a 42° C durante 48 y 24 horas respectivamente en condiciones de microanaerobiosis.

Posterior a las 48 horas se identificaron colonias presuntivas de *Campylobacter* spp, en base a su morfología y color. La morfología implicó la forma y consistencia, destacando aquellas de aspecto acuoso, plano, diseminadas por la línea del estriado y de color grisáceo (**Figura 3**). Las características se ratificaron mediante tinción de Hucker (**Anexo 4**).



**Figura 3.** Aislamiento de cepas de *Campylobacter*.  
Fuente. El autor.

### 2.2.1. Filtración pasiva y criopreservación.

Los cultivos se filtraron mediante membrana de nitro-celulosa de  $0,45\mu$  (Anexo 5) (Figura 4) para eliminar la flora bacteriana acompañante y obtener cultivos puros que se criopreservaron en tubos CRYOBANK TM a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

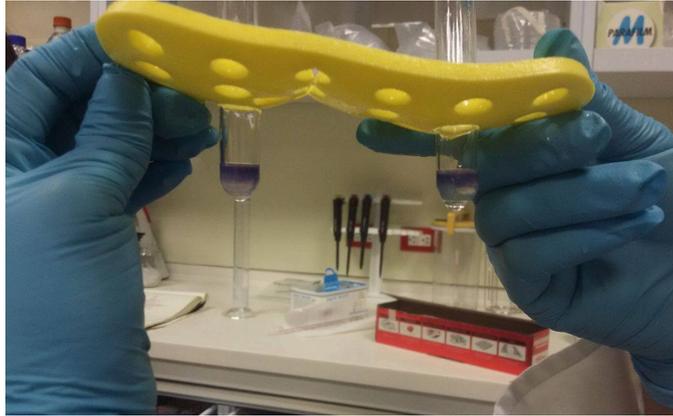


**Figura 4.** Purificación de *Campylobacter* mediante filtración.  
Fuente. El autor.

## 2.3. Pruebas bioquímicas

### 2.3.1. Hidrólisis de hipurato.

La identificación de las especies termotolerantes se realizó mediante Hidrólisis de hipurato (Anexo 6) (Figura 5).



**Figura 5.** Hidrólisis de hipurato.  
**Fuente.** El autor.

#### **2.4. Identificación molecular de *Campylobacter* spp.**

Previo a la extracción de ADN, se obtuvo 1mL de cada cepa bacteriana pura en medio líquido tioglicolato. El ADN fue extraído siguiendo el protocolo del Kit de extracción para bacterias Gram negativas, según las especificaciones de manufactura presentadas en Wizard® Genomic DNA Purification Kit (**Anexo 7**).

La amplificación del ADN se llevó a cabo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la combinación de primers universales para bacterias del Género *Campylobacter* C412F (5'-GGATGACACTTTTCGGAGC-3') y C1228R (5'-CATTGTAGCACGTGTGTC-3') de la región parcial 16S rRNA y cebadores específicos de cada especie (**Tabla 1**). El volumen de PCR Múltiplex para cada reacción fue de 25µl; la amplificación se realizó en el termociclador SimpliAmp Biosystem. Cada uno de los productos de PCR fueron probados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (**Anexo 8**) a 300nm de luz ultravioleta en el equipo Transilluminador UV Labnet. El marcador molecular utilizado fue de 100bp (Trackit™ 100pb DNA Ladder INVITROGEN). Finalmente la identificación molecular de *Campylobacter* se analizó de acuerdo al peso molecular de las especies correspondientes.

**Tabla 1.** Secuencias de primers empleados para identificación de las especies de *Campylobacter* spp. mediante PCR-MULTIPLEX.

ESPECIE	TAMAÑO (bp)	GENBANK	PRIMER	SECUENCIA (5' A 3')
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	611	23S rRNA	HYO1F	5' -ATAATCTAGGTGAGAATCCTAG-3'
<i>C. coli</i>	502	Ask	CC18F	5' -GGTATGATTTCTACAAAGCGAG-3'
			CC519R	5' -ATAAAAGACTATCGTCGCGTG-3'
<i>C. fetus</i>	359	CstA	MG3F	5' -GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT-3'
			CF359R	5' -AGCCAGTAACGCATATTATAGTAG-3'
<i>C. lari</i>	251	glyA	CLF	5' -TAGAGAGATAGCAAAAGAGA-3'
			CLR	5' -TACACATAATAATCCCACCC-3'
<i>C. jejuni</i>	161	cj0414§	C-1	5' -CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT-3'
			C-3	5' -CCATAAGCACTAGCTAGCTGAT-3'
<i>C. upsaliensis</i>	86	lpxA	CU61F	5' -CCATAAGCACTAGCTAGCTGAT-3'
			CU146R	5' -TTCTAGCCCCTTGCTTGATG-3'

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

## 2.5. Actividad antimicrobiana

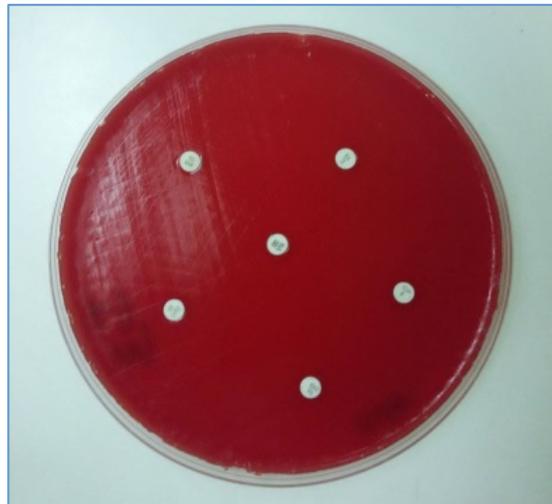
La actividad antimicrobiana de las cepas de *Campylobacter* se determinó mediante el método de difusión en agar Muller Hinton, según las recomendaciones del Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad (EUCAST 2016 V.6.0) y el Comité de Antibiógramas de la Sociedad Francesa de Infectología (CA-SFM. 2016 V.1.0).

Se utilizó seis tipos de discos de sensibilidad: Ácido nalidíxico (NA-30µg), Ciprofloxacina (CIP-5µg), Amoxicilina-ácido clavulánico (AMC-20/10µg), Eritromicina (E-15µg), Ampicilina (AMP-10µg), y Gentamicina (GM-10µg) (**Tabla 2**) (**Figura 6**).

**Tabla 2.** Puntos de corte para susceptibilidad de *Campylobacter* spp.

<b>GRUPO</b>	<b>ANTIBIOTICO</b>	<b>SENSIBLE</b>	<b>RESISTENTE</b>
<b>Beta-lactámicos</b>	AMP-10	S ≥ 19	R < 14
	AMC-20/10	S ≥ 19	R < 14
<b>Fluorquinolonas</b>	CIP-5	S ≥ 26	R < 26
	NA-3	S ≥ 23	R < 23
<b>Macrólido</b>	E-15	S ≥ 20	R < 20
<b>Aminoglucósido</b>	GM-10	S ≥ 17	R < 17

**Fuente.** CA-SFM/EUCAST, 2016.

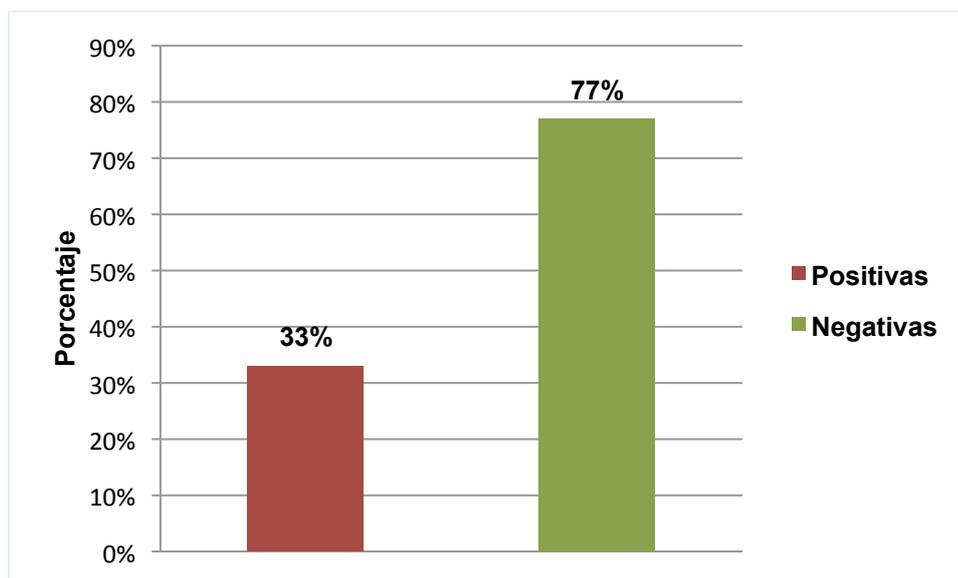


**Figura 6.** Antibiograma  
**Fuente:** El autor.

**CAPÍTULO III**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3.1. Aislamiento e identificación de especies de *Campylobacter* en perros

Del total de muestras recolectadas, el 33,33% (20/60) fueron positivas para *Campylobacter spp.*, dato similar a los obtenidos en Argentina y Chile, con un 33% (12/36) y 32,2% respectivamente (Tamborini *et al.*, 2012; Gutiérrez y de la Fuente, 2001), en investigaciones realizadas sobre la resistencia de *Campylobacter* en perros callejeros y la determinación de la prevalencia de *Campylobacter spp.*, en animales de compañía.



**Figura 7.** Prevalencia de *Campylobacter spp.*

**Fuente.** El autor.

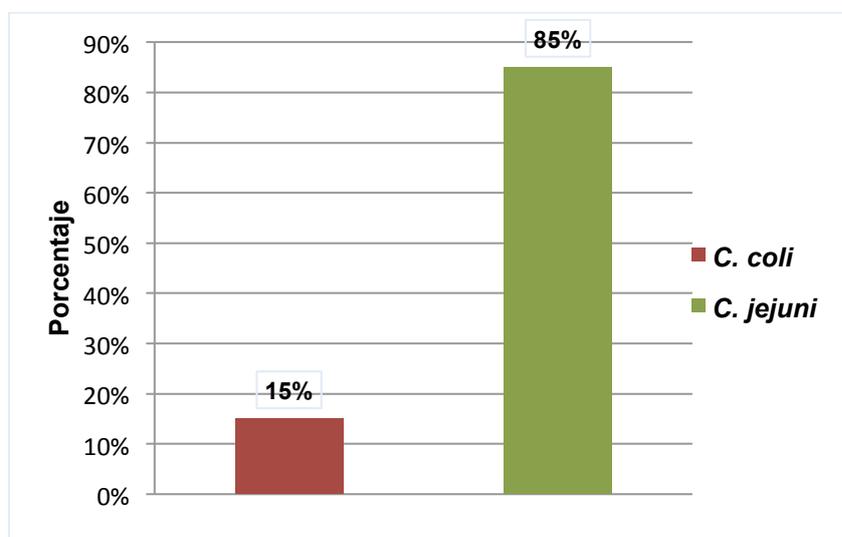
En otras investigaciones se registran valores superiores a los resultados obtenidos en este estudio. En Loja, Ecuador, se obtuvo una incidencia del 65,12% en perros con sintomatología diarreica (Manzanillas, 2012). En Suecia determinaron un 63% de incidencia de *Campylobacter spp* en animales diarreicos (Sandstedt y Walder, 1983). En Argentina, un estudio indicó que el 51,3% de los perros analizados fue portador de las especies termotolerantes de *Campylobacter* (Fernández *et al.* 1999). En India la investigación bacteriológica realizada a perros en veterinarias reveló una prevalencia del 51% (Kurnar *et al.*, 2012). Por otro lado, en el estudio realizado en Barbados, sobre la determinación de reservorios de *Campylobacter* la prevalencia fue de 46,9% en perros sanos (Workman *et al.*, 2005).

Existen estudios en los que se reportó incidencias inferiores, en Dinamarca, el 29% de un total de 100 muestras resultó positivo para *Campylobacter* en perros sanos (Workman, 2005). En Chile, se reportó el 23% de incidencia de un total de 305 muestras (García *et al.*, 2009). Otro estudio realizado en Chile, muestra cifras bajas 10,96% al estudiar perros domésticos aparentemente sanos (Fernández, 2011).

Los datos encontrados en el presente estudio se encuentran cerca de la media 40% de los resultados obtenidos en los estudios antes citados, donde la gran parte de la población canina analizada es portador asintomático del patógeno. El contacto inadecuado con estos animales podría constituir un factor de riesgo para la infección, que se puede agravar en zonas con hábitos higiénicos deficientes (Sandstedt y Walder, 1983).

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 y Public Health, 2005).

En cuanto a la identificación de las especies de *Campylobacter* mediante PCR MULTIPLEX, se obtuvo una prevalencia del 85% (17/20) para *C. jejuni* y 15% (3/20) para *C. coli* (Figura 8, 9,10).



**Figura 8.** Identificación de especies de *Campylobacter*.  
Fuente. El autor.

*C. jejuni* es la especie con mayor prevalencia 85% (17/20) reportada en el presente estudio, cuya incidencia es idéntica a la obtenida en Estados Unidos 85% en el análisis molecular directo de muestras diarreicas (Linton *et al.* 1997). En Chile se analizó muestras de perros presumiblemente portadores aislando *C. jejuni* en un 68,6% mientras en Brasil, se registró un 58% de aislamientos que contenían esta especie, (Hernández y Vergara, 2001; Rodríguez, 2011). Existen países en los cuales la incidencia ha sido inferior como en Brasil en un estudio de perros que viven en albergues se aisló 35,2% de cepas de *C. jejuni* (Fernández, 2011). En Suecia, en un estudio donde se analizó muestras de perros sanos se encontró una prevalencia de 10,9% de *C. jejuni* (Engvall *et al.*, 2003).

*C. coli* es la otra especie aislada que evidenció un aislamiento de 15% (3/20) cifra similar en comparación con el 16,7% reportado en dos ciudades de Chile (Hernández y Vergara,

2001). Dato similar se encuentra en Estados Unidos donde se reportó una prevalencia de 15% en muestras diarreicas (Linton *et al.* 1997).

Por su parte en otros países se reportan cifras superiores pero se mantienen bajas con respecto a *C. jejuni*. En Brasil se aisló *C. coli* en un 33% de muestras de perros con sintomatología (Rodríguez, 2011).

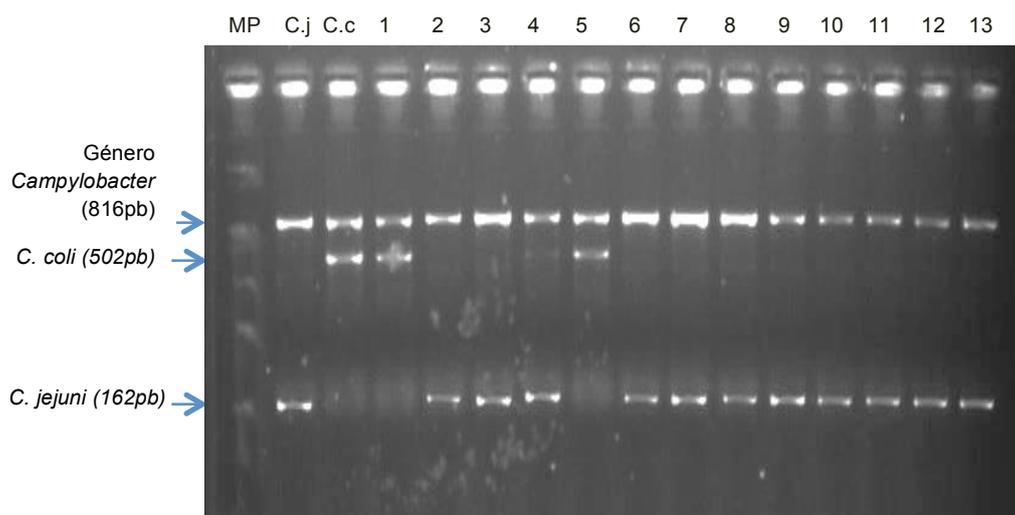
Existen estudios que evidencian cifras inferiores a los obtenidos en la presente investigación; en Brasil el 7,6% de muestras resultaron positivas para *C.coli* (Fernández, 2011) y en Suecia, el 2,19% de bacterias *C. coli* se encuentran presente en perros sanos (Engvall *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos ponen en evidencia que las especies que se aíslan con mayor frecuencia son *C. jejuni* en primer lugar, siendo el responsable del 80% de los casos de *Campylobacteriosis*, seguido de *C.coli* como la segunda especie con incidencia del 10-18%, valores que en la mayoría de estudios se obtiene, debido a que *C. coli* tiene como reservorio natural a los animales de consumo como el cerdo (Hernández *et al.*, 2013).

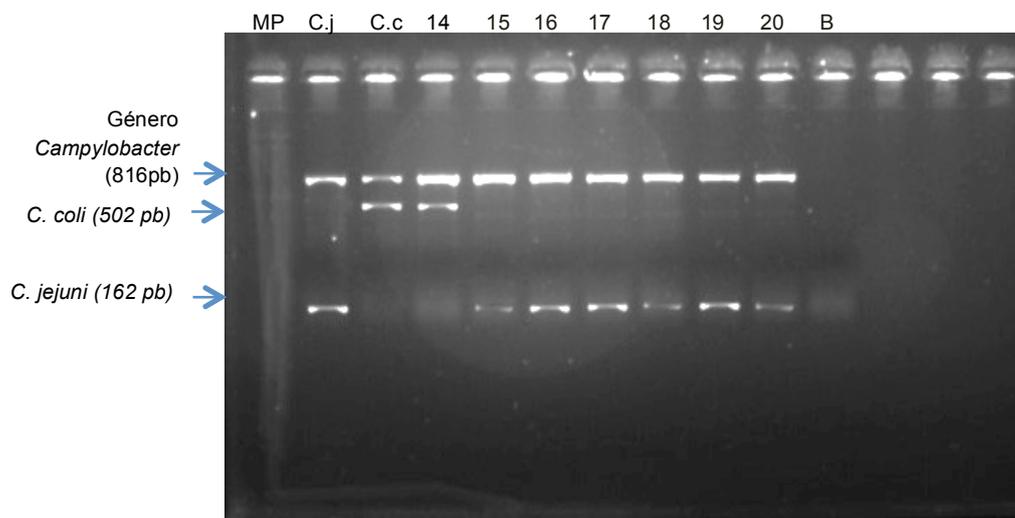
*C. jejuni* tiene la capacidad de alojarse en distintos reservorios, debido a que es una de las pocas especies que se adapta a los cambios de temperatura, la escasez de nutrientes o los distintos grados de acidez y de concentración de sales en la bilis de cada reservorio animal (Lund *et al.*, 2004).

### **3.2. Análisis molecular de *Campylobacter***

En el análisis molecular se pueden apreciar las bandas que distinguen el género *Campylobacter* que se marca aproximadamente a 816 pb, y sus especies *C. coli* a 502 pb y *C. jejuni* a 162 pb (**Figuras 9 y 10**).



**Figura 9.** Identificación molecular de especies *Campylobacter* mediante PCR-MULTIPLEX.  
 (MP= marcador de peso molecular; C.j= control positivo *C. jejuni*; C.c= control positivo *C.coli*; 1-13= muestras estudiadas.  
**Fuente.** El autor.



**Figura 10.** Identificación de especies de *Campylobacter* mediante PCR-MULTIPLEX.  
 (MP= marcador de peso molecular; C.j= control positivo *C. jejuni*; C.c= control positivo *C.coli*; B= Blanco; 14-20= muestras estudiadas.  
**Fuente.** El autor.

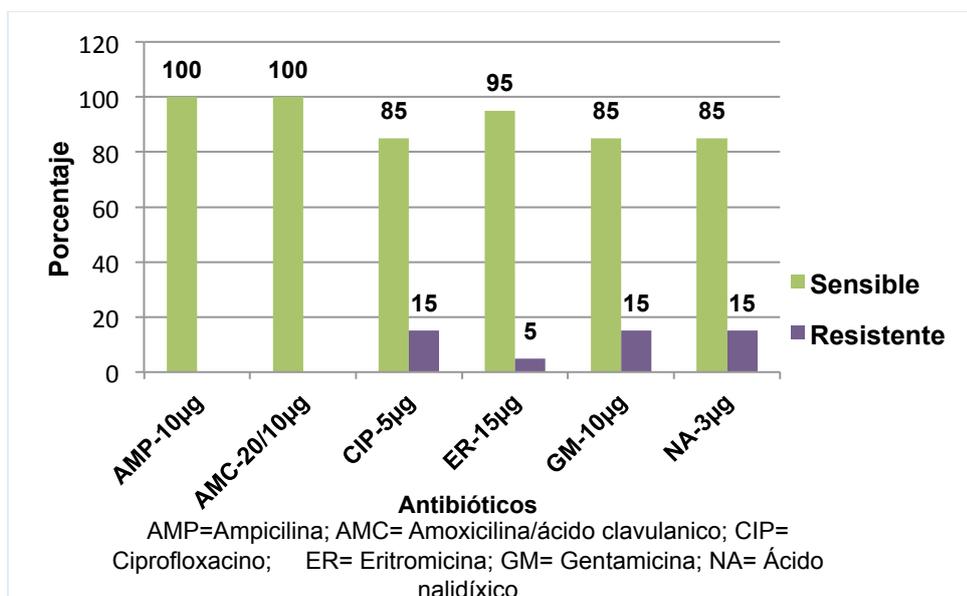
Se utilizaron cebadores diseñados para la detección y diferenciación de *C. jejuni* y *C.coli*. La prueba permitió la identificación de las dos especies en base a las secuencias de sus genes 16S rRNA. El ensayo se combinó con un protocolo para la purificación de ADN total a partir de muestras aisladas. Del 100% de muestras *Campylobacter spp*, se detectó *C. jejuni* en un 85% y *C.coli* en un 15%. Estos resultados son similares a los obtenidos en Estados Unidos;

*C.jejuni* en un 89,4% y *C.coli* 10,5% en la identificación de especies de *Campylobacter* en muestras diarreicas de perros, quién indica además que el método de PCR permite definir rápidamente la ocurrencia, la incidencia específica de especies y genotipos (Linton *et al*, 1997).

### 3.3. Actividad antimicrobiana

La evaluación de la actividad antimicrobiana exhibió que el 33% (20/60) de muestras positivas para *Campylobacter spp*, son resistentes en un 15% a ciprofloxacino; en Argentina se determinó una resistencia del 20% (Pantozzi *et al.*, 2009). Gentamicina presenta una resistencia de 15%, cifra concordante con la obtenida en un estudio ejecutado en India 11,76% (Kurnar *et al.*, 2012). De igual manera se reportó una resistencia del 15% a ácido nalidíxico; una investigación efectuada en Brasil presenta similar resultado al obtenido 14% (Fernández, 2011). Con respecto a eritromicina la resistencia fue de 5%, dato similar 1% reportado en Argentina (Pantozzi *et al.*, 2009).

Se registró además sensibilidad de 100% a ampicilina, cifra similar a la registrada en Argentina 100%, y en un estudio desarrollado en Chile con un 93% (Pantozzi *et al.*, 2009; García *et al.*, 2009). En relación a amoxicilina/ácido clavulánico la sensibilidad fue de 100%; una investigación efectuada en Bolivia presenta igual sensibilidad 100% a amoxicilina/ácido clavulánico (Gatica, 2009).



**Figura 11.** Susceptibilidad bacteriana de las especies de *Campylobacter spp*.  
**Fuente.** El autor.

A nivel mundial los valores tanto de resistencia y sensibilidad microbiana varían como resultado de la elección primaria indistinta de cualquiera de los antibióticos y la forma de

actuar del mismo una vez que ingresó en la membrana celular de la bacteria (Kurnar *et al.*, 2012).

La resistencia a fluorquinolonas y aminoglucósidos suele variar dependiendo del uso concomitante que se les dé, en animales de crianza los niveles suelen ser mayores por su uso como profiláctico. Las quinolonas como el ciprofloxacino son comúnmente usadas en humanos y animales para tratar infecciones por *Campylobacter*, sin embargo, en animales de compañía la incidencia suele ser inferior, debido a que en estos no se realiza ningún tipo de tratamiento profiláctico como si se realiza en animales de crianza y consumo.

La resistencia a fluoroquinolonas se produce principalmente por mutaciones secuenciales en las dianas de estos antibióticos, topoisomerasas IV y ADN girasas. Una mutación en una de estas dianas produce un aumento discreto de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) que se va aumentando con la adición de mutaciones sucesivas en la misma diana o en otras. Esta forma de adquirir resistencia en distintas fases se diferencia de la aparición de resistencia mediante la adquisición de material genético exógeno (plásmidos) en que este último suele generar un incremento brusco de la CIM (Oteo y Campos, 2011).

En los macrólidos, en cambio los niveles de resistencia suelen ser bajos debido a que la unión del antibiótico con la bacteria es débil y se deben dar una serie de mutaciones y estar expuestos durante largos periodos para que el macrólido actúe (Gatica, 2013). Por ello, para reducir la resistencia de *Campylobacter spp.* a fluoroquinolonas se ha recomendado no utilizar estos antimicrobianos en animales con fines profilácticos (Orden y De la Fuente, 2001).

Los altos niveles de sensibilidad antimicrobiana de *Campylobacter spp.*, frente a las penicilinas se debe a la presencia de porinas en la pared de la bacteria que facilitarían el ingreso de moléculas como la ampicilina permitiendo la acción de estos agente a pesar de la presencia de  $\beta$ -lactamasas en la bacteria (García *et al.*, 2009).

Las propuestas de puntos de corte para cada especie y para cada antibiótico deberían permitir la detección no sólo de los aislados que pueden ser tratados con cualquier tipo de antibiótico, sino también aquellos que presentan un riesgo elevado de seleccionar resistencia de alto nivel (Oteo y Campos, 2011).

## CONCLUSIONES

- De las 60 muestras analizadas el 33% (20) resultaron positivas para *Campylobacter spp.*
- Se aislaron dos especies termotolerantes de *Campylobacter*; *C jejuni* en un 85% y *C.coli* en un 15%.
- La actividad antimicrobiana frente a las cepas aisladas determinó, que *Campylobacter spp.*, presenta resistencia de 15% a ciprofloxacino, gentamicina, ácido nalidíxico y 5% a eritromicina.
- La sensibilidad microbiana registrada es de 100% para ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico.

## RECOMENDACIONES

- Ampliar los estudios epidemiológicos de los reservorios de *Campylobacter spp.* en otros puntos del país, con la finalidad de aportar información necesaria y suficiente para el pronto diagnóstico y prevención de enfermedades gastrointestinales.
- Implementar programas de prevención y control de contaminación por *Campylobacter spp.*, dirigidos a la población que tiene permanente contacto con animales de producción y de compañía.
- Fomentar la participación de entidades de Salud Pública, Laboratorio, Clínica Humana y Veterinaria, en la investigación de posibles reservorios de *Campylobacter*, la elección de tratamientos y su uso adecuado.
- Realizar campañas de concientización, dirigidos a la sociedad en general acerca de los cuidados que se debe tener con los animales de compañía, dando a conocer las posibles enfermedades que pueden portar y como prevenirlas.
- Recomendar a las autoridades cantonales correspondientes, la búsqueda de una solución para estos animales portadores de todo tipo de bacterias, con la finalidad de realizar campañas de salud y sanidad.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carmona, F., Aguilar, L. E., & Roa, J. A. (1987). *Campylobacter jejuni* en niños con enfermedad diarréica aguda (EDA). *Biomédica*, 7(1-2), 13-20.
- Engvall, E. O., Brändström, B., Andersson, L., Båverud, V., Trowald-Wigh, G., & Englund, L. (2003). Isolation and identification of thermophilic *Campylobacter* species in faecal samples from Swedish dogs. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 35(10), 713-718.
- Farance, M., & Viñas, M. (2007). Manual de Procedimientos para el Aislamiento y Caracterización de *Campylobacter spp.* Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur.
- Fernández, H. (2011). *Campylobacter* and *Campilobacteriosis*: a view from South America. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28 (1), 121-127.
- Fernández, H (2008). Género *Campylobacter*: un grupo de bacterias de importancia en Salud Pública. *Temas de Zoonosis*, 4 (1), 205-214.
- Fernández, H., & Farace, M. (2003). Manual de procedimientos; diagnóstico de *Campylobacter* en muestras clínicas y de alimentos. Universidad Austral de Chile e Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Argentina.
- Gacitua, M. G. J. (2006). Especies del Género *Campylobacter* y del Genero *Arcobacter* en muestras de deposiciones humanas y animales.
- 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(2), 216-220.
- García, P., Valenzuela, N., Rodríguez, L., Victoria, M., León, E., & Fernández, H. (2009). Susceptibilidad antimicrobiana de *Campylobacter jejuni* aislado de coprocultivos en Santiago de Chile. *Revista chilena de infectología*, 26(6), 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.

- Gómez, Marcos JP. (2013). Genero *Campylobacter spp.* FAVET-UFRGS. Recuperado el 4 de diciembre del 2015, de: [http://www.ufrgs.br/labacvet/files/Gênero\\_Campylobacter\\_4-2013-1.pdf](http://www.ufrgs.br/labacvet/files/Gênero_Campylobacter_4-2013-1.pdf)
- Hernández, E. (2007). *Campylobacter* líder en patología intestinal infecciosa. Académico numerario ILMO SR. 7-8. Valencia-España.
- Hernández, H., Vergara, M. (2001). Prevalencia de especies termotolerantes de *Campylobacter* en dos poblaciones caninas de la provincia de Valdivia. Valdivia-Chile.
- 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(4), 9-18.
- Hoffer, A., Farace, M., Della, A., Rocca, F, Lucero, C. (2010). Aislamiento de *Campylobacter spp.* de localización extraintestinal. Instituto Nacional de enfermedades infecciosas. Buenos Aires-Argentina.
- Koneman, E. W., & Allen, S. (2008). *Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color*. Ed.España. Médica Panamericana.
- Kurnar, R., Verma, A. K., Kurnar, A., Srivastava, M., & Lal, H. P. (2012). Prevalence and Antibiogram of *Campylobacter* Infections in Dogs of Mithura, India. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, 7(5), 434-440.
- Linton, D., Lawson, A. J., Owen, R. J., & Stanley, J. (1997). PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (10), 2568-2572.
- Lund, Marianne, *et al.* (2004). "Detection of *Campylobacter spp.* in chicken fecal samples by real-time PCR." *Journal of clinical microbiology* 42 (11). 5125-5132.
- Manzanillas Vélez, A. L. (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 (Doctoral dissertation).
- Orden Gutiérrez, J. A., & de la Fuente López, R. (2001). Repercusiones en la salud pública de la resistencia a quinolonas en bacterias de origen animal. *Revista Española de Salud Pública*, 75(4), 313-320.
- Oteo, J., & Campos, J. (2004). Uso de quinolonas y resistencia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(04), 201-203.

- Pantozzi, F. L., Moredo, F. A., Vigo, G. B., & Giacoboni, G. I. (2009). Antimicrobial resistance in indicator and zoonotic bacteria isolated from domestic animals in Argentina. *Revista Argentina de microbiología*, 42(1), 49-52.
- Sáenz, S. (2007). Determinación de la presencia de *Campylobacter spp.*, en perros de la ciudad de Guatemala 6(12), p 3-20.
- Sandstedt, K., Ursing, J., & Walder, M. (1983). Thermotolerant *Campylobacter* with no or weak catalase activity isolated from dogs. *Current Microbiology*, 8(4), 209-213.
- Tamborini, A. L., Casabona, L. M., Viñas, M. R., Asato, V., Hoffer, A., Farace, M. I & Pichel, M. (2012). *Campylobacter spp.* prevalencia y caracterización fenotípica de aislamientos de pacientes con diarrea y de sus mascotas en la provincia de La Pampa, Argentina.
- Vandamme P. (2000). Taxonomy of the family *Campylobacteraceae*. En: *Campylobacter*, Second Edition, Nachamkin I. & M.J. Blaser, eds. ASM Press, Washington DC, USA, 3–26.
- WHO (2011). World Health Organization. *Campylobacter Retrieved*.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/es/>
- 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 (6), 2642-2650.
- Ziprin, R. L., Droleskey, R. E., Hume, M. E., & Harvey, R. B. (2003). Failure of viable nonculturable *Campylobacter jejuni* to colonize the cecum of newly hatched leghorn chicks. *Avian diseases*, 47(3), 753-758

## **ANEXOS**

## PROTOCOLOS

### ANEXO 1: Toma de muestra en perros

1. Recolectar muestras fecales frescas, de consistencia blanda o diarreica.
2. Tomar las muestras con ayuda de un hisopo estéril, introduciéndolo en las heces.
3. Realizar un inóculo primario de la muestra en el Medio Butzler (**Anexo 2**); y, adicionalmente inocular la muestra en un tubo con medio de transporte enriquecido para *Campylobacter*.

**Nota:** Al momento de tomar la muestra, no debe topar el hisopo con el suelo ni césped; la muestra no puede estar mojada por lluvia o líquidos cercanos; y, se debe rotular tanto la caja petri con Medio Butzler como el tubo de medio de transporte enriquecido para que no existan confusiones con las diferentes muestras.



## ANEXO 2: Medio Butzler

Para preparación de 500ml.

1. En 470 ml de agua destilada disolver: 12,5g de caldo nutritivo, 5g de levadura y 8g de agar agar.
2. Ajustar el pH a 7.0 utilizando ácido clorhídrico diluido al 25%.
3. Esterilizar mediante calor húmedo en autoclave a 121°C a 1,5 atmósferas de presión por 20 minutos.
4. Esperar a que enfríe hasta los 50°C en baño maría durante 30 minutos y adicionar 5ml de antibiótico (*Campylobacter selective supplement Butzler*) previamente reconstituido con agua estéril y homogenizar.
5. Añadir 25 ml de sangre y homogenizar de nuevo suavemente para no formar burbujas.
6. Dispensar en cajas petris plásticas de 94x16 mm en una zona estéril y esperar hasta que se solidifiquen, rotular las cajas y almacenarlas a 4°C hasta su utilización.

### **ANEXO 3: Medio de transporte enriquecido para *Campylobacter***

Para preparación de 250ml.

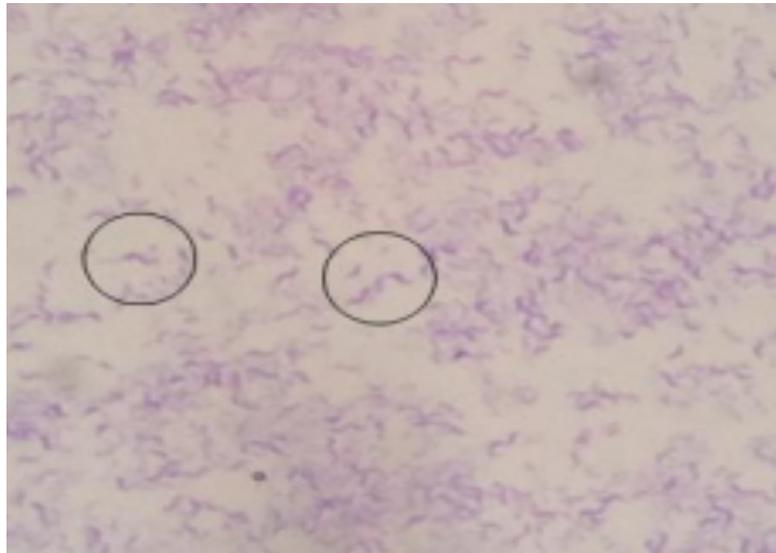
1. En 237,5ml de agua destilada disolver: 6,2g de caldo nutritivo, 0,3g de agar-agar y 2,5g de extracto de levadura.
2. Ajustar el pH a 7.0 utilizando ácido clorhídrico diluido al 25%.
3. Esterilizar mediante calor húmedo en autoclave a 121°C a 1,5 atmósferas de presión por 20 minutos.
4. Esperar a que enfríe hasta los 50°C y adicionar 2,5ml de antibiótico (*Campylobacter selective supplement Butzler*) previamente reconstituido con agua estéril y homogenizar.
5. Añadir 10 ml de sangre y homogenizar de nuevo suavemente para no formar burbujas.
6. Dispensar en tubos previamente esterilizados con un volumen aproximado de 4 ml por tubo, dispensar en un área estéril y esperar a que se enfríen a temperatura ambiente.
7. Almacenar los tubos a 4°C hasta su utilización.

#### **ANEXO 4: Tinción de Hucker**

1. Realizar una dilución de la muestra en un porta objetos de una a dos colonias en una gota de agua destilada.
2. Fijar mediante calor con un mechero.
3. Colocar sobre la muestra una gota de colorante violeta y una gota de bicarbonato de sodio al 1% y dejar reposar durante 2 minutos.
4. Lavar la placa y secar al ambiente.
5. Observar en el microscopio con aceite de inmersión a 100X.

#### **Interpretación de resultados:**

- Presencia de bacterias curvas en forma de s o gaviota.



### **ANEXO 5: Filtrado de colonias mediante membrana de nitrocelulosa**

1. Tomar de 2 a 3 asadas de colonias y disolver en 500µl de agua destilada y dar vortex para homogenizar.
2. Colocar 200µl de la primera dilución sobre un filtro de nitrocelulosa previamente ubicado en la superficie de una placa de agar sangre.
3. Esperar entre 30 minutos a una hora hasta que se filtre.
4. Retirar el filtro con ayuda de una pinza estéril.
5. Incubar a 42°C durante 48 horas en condiciones de microaerófilia.

**Nota:** Realizar Anexo 3 para confirmar pureza del cultivo.

## **ANEXO 6: Hidrólisis de 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 vortex.
3. Incubar en baño María a 37°C por un periodo de 2 horas.
4. Agregar 200 µl de solución de ninhidrina y reposar 10 minutos más en el baño María.

### **Interpretación de resultados:**

- Positivo: coloración azul-violeta intenso.
- Negativo: coloración azul tenue o ausencia de coloración.

## ANEXO 7. Extracción de ADN molecular

Para bacterias Gram negativas:

### **Materiales:**

- Tubos de microcentrifuga de 1.5ml
- Baño maría a 80°C
- Baño maría a 37°C
- Isopropanol a temperatura ambiente
- Etanol al 70% a temperatura ambiente
- Baño maría a 65°C (opcional; para la rehidratación rápida del ADN)
- Para bacterias Gram positiva: EDTA a 50mM y pH 8.0
- Para bacterias Gram positivas: 10mg/ml de lisozima (Sigma # L7651)
- Para bacterias Gram positivas: 10mg/ml de lisostafina (Sigma # L7386)

### **Procedimiento**

1. Añadir 1ml del cultivo a un microtubo.
2. Centrifugar a 13,000-16,000 rpm durante 2 minutos hasta obtener el sedimento de las células. Eliminar el sobrenadante.
3. Añadir 600µl de la solución lisada (Nuclei Lysis Solution). Pipetear suavemente hasta que las células se resuspendan.
4. Incubar a 80°C durante 5 minutos para que las células se lisen y a continuación enfriar a temperatura ambiente.
5. Añadir 3µl de RNasa al lisado celular. Invertir el tubo de 2-5 veces para mezclar.
6. Incubar a 37°C durante 15 a 60 minutos. Enfriar a temperatura ambiente.
7. Añadir 200 µl de (Protein Precipitation Solution) al lisado celular tratado con RNasa. Someter a vortex durante 20 segundos para mezclar la solución precipitada de proteínas con el lisado celular.
8. Incubar las muestras en hielo durante 5 minutos.
9. Centrifugar a 13,000-16,000 rpm durante 3 minutos.
10. Transferir el sobrenadante que contiene el ADN a un microtubo limpio que contenga 600µl de isopropanol.  
Nota: algunos sobrenadantes pueden quedarse en el tubo principal que contiene el sedimento de las proteínas. Se debe dejar este líquido residual en el tubo para evitar la contaminación de la solución de ADN con el precipitado de las proteínas.
11. Mezclar suavemente invirtiendo el microtubo hasta que las hebras de ADN formen una masa visible.

12. Centrifugar a 13,000-16,000 rpm durante 2 minutos.
13. Cuidadosamente verter el sobrenadante y drenar el tubo en un papel absorbente limpio. Añadir 600µl de etanol al 70% y suavemente invertir el tubo varias veces para lavar el sedimento de ADN.
14. Centrifugar a 13,000-16,000 rpm durante 2 minutos. Cuidadosamente aspirar el etanol.
15. Drenar el tubo en un papel absorbente limpio y dejar que el sedimento se seque al aire durante 10 a 15 minutos.
16. Añadir 100µl de DNA Rehydration Solution al tubo y rehidratar el ADN mediante incubación a 65°C durante una hora. Periódicamente mezcle la solución golpeando suavemente el tubo. Alternativamente, rehidratar el ADN incubando la solución durante la noche a temperatura ambiente 0 a 4°C.
17. Conservar el ADN a 2 u 8°C.

**ANEXO 8. Mix para PCR MULTIPLEX de *Campylobacter spp.***

<b>Especies</b>	<b>Componentes</b>	<b>1X (ul)</b>	<b>30X(ul)</b>
	Buffer	5,00	150,00
	dNTPs	0,50	15,00
	Cl2Mg	1,50	45,00
	Primers:		
<i>Campylobacter</i>	C412F	0,05	1,50
	C1228R	0,05	1,50
<i>C. jejuni</i>	C-1	0,05	1,50
	C-3	0,05	1,50
<i>C. coli</i>	CC18F	0,05	1,50
	CC519R	0,05	1,50
<i>C. upsaliensis</i>	CU61F	0,05	1,50
	CU146R	0,05	1,50
<i>C. fetus</i>	MG3F	0,05	1,50
	CF359R	0,05	1,50
<i>C. lari</i>	CLF	0,05	1,50
	CLR	0,05	1,50
<i>C. hyointestinalis</i> <i>subsp. hyointestinalis</i>	HYO1F	0,05	1,50
	HYOFET235R	0,05	1,50
	Taq	0,125	3,75
	H2O	16,17	485,1
	DNA	1,00	
		25,00	719,9
			749,9

Fuente. El autor.

### ANEXO 9. Temperaturas de anillamiento para PCR MULTIPLEX

<b>Condiciones:</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>N° ciclos</b>
Desnaturalización inicial	95	2	1
Desnaturalización	95	0,5	6
Anillamiento	68	1,5	
Extensión	72	1	
Desnaturalización	95	0,5	25
Anillamiento	56	1,5	
Extensión	72	1	
Extensión final	72	10	1
Mantenimiento	4	-	-

Fuente. El autor.

## **ANEXO 10: Electroforesis en gel de agarosa**

**NOTA: Gel de agarosa al 1,5%, volumen final 120 ml.**

1. Pesar 1,8 g de Agarosa UltraPure™ de Invitrogen y colocar en un vaso de precipitación de 200 ml.
2. Adicionar 12 ml de buffer TBE 10X, 40 ml de red gel y aforar a 120 ml con agua destilada.
3. Disolver por calentamiento la solución evitando llegar a la temperatura de ebullición para no perder producto con la evaporación.
4. Verter la solución en la bandeja para electroforesis.
5. Colocar la peineta para la formación de pocillos.
6. Retirar la peineta cuando se haya solidificado el gel.
7. Colocar la bandeja que contiene el gel en la cubeta para electroforesis horizontal Enduro™.
8. Llenar la cubeta con el buffer TBE 1X hasta cubrir completamente el gel.
9. Adicionar 1 µl del marcador de peso molecular y 2 µl de los productos de la PCR Múltiplex (controles y muestras).
10. Tapar la cubeta conectando a la fuente de poder Enduro™ marca Labnet.
11. Programar la corrida inicial por 10 minutos a 100 Volt y 300 mA, para que descienda todo el producto de los pocillos al gel.
12. Programar la corrida por 40 minutos a 28 Volt y 300 mA.
13. Revelar el gel mediante luz UV a 300 nm en el Transluminador UV Labnet.

## **ANEXO 11: Preparacion de buffer TBE 10X(Tris, Borato y EDTA)**

### **NOTA: Para preparación de 1000 ml**

1. En 980 ml de agua destilada colocamos 20 ml de EDTA.
2. Adicionamos 54 g de tris y disolvemos.
3. Una vez disuelto el tris adicionamos 27,59 g ácido bórico y ajustamos el pH a 7.
4. Terminado el paso anterior se procede a protegerlo de la luz y guardandolo a 4 °C.