



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**Especies de *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas aisladas en aves
de corral en la provincia de Loja durante el periodo Abril – Junio del
2016.**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Crespo Cabrera, David Israel

DIRECTORA: Toledo Barrigas, Zorayda Patricia, 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.

Zorayda Patricia Toledo Barrigas.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN.

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación **“Especies de *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas aisladas en aves de corral en la provincia de Loja durante el periodo Abril – Junio del 2016”** realizado por Crespo Cabrera David Israel, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, 26 de octubre de 2016

Mgtr. Zorayda Toledo
Directora

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo Crespo Cabrera David Israel declaro ser autor del presente trabajo de titulación **“Especies de *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas aisladas en aves de corral en la provincia de Loja durante el periodo Abril – Junio del 2016”** de la titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo la Mgtr. Zorayda Patricia Toledo Barrigas 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”.

Crespo Cabrera David Israel

C.I. 1104936800

DEDICATORIA

A Dios por permitirme estar con vida y cumplir con este objetivo.

A mis padres y demás familiares por el apoyo incondicional que me han brindado en todo este trayecto que ha sido difícil de llegar.

A mis amigos y compañeros, gracias por su amistad.

AGRADECIMIENTO

A mi directora Mgtr. Zorayda Toledo gracias por la oportunidad y la ayuda que me brindó en todo este trayecto educativo.

Al Dr. Heriberto Fernández gracias por aportarnos sus conocimientos que fueron indispensables para el desarrollo de ésta investigación.

A la Mgtr. Janeth Simaluiza y Eliana Baculima por su valiosa asesoría en el desarrollo investigativo.

A mis compañeros de investigación gracias por tantos momentos agradables.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA.....	i
APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	viii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
1. CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 Antecedentes.....	6
1.2 Campylobacteriosis.....	7
1.3 <i>Campylobacter</i> . Morfología e Identificación.....	7
1.3.1 <i>Campylobacter jejuni</i>	8
1.3.2 <i>Campylobacter coli</i>	9
1.4 Reservorio.....	9
1.5 Mecanismos de Transmisión.....	10
1.6 Patogenia en aves de corral.....	11
1.7 Patogenia en Humanos.....	12
1.8 Factores de Patogenicidad.....	13
1.8.1 Motilidad.....	13
1.8.2 Adherencia.....	14
1.8.3 Invasión.....	14
1.8.4 Producción de Citotoxinas.....	14

1.9 Tratamiento.....	14
1.10 Resistencia Bacteriana.....	15
1.10.1 Resistencia a Fluoroquinolonas.....	16
1.10.2 Resistencia a Beta-lactámicos.....	16
1.10.3 Resistencia a Macrólidos.....	17
1.10.4 Resistencia a Aminoglucósidos.....	17
1.11 Diagnóstico.....	18
2 CAPÍTULO II: METODOLOGÍA	20
2.1 Recolección de Muestras.....	21
2.2 Aislamiento e Identificación de <i>Campylobacter</i>	21
2.2.1 Siembra e Incubación.....	21
2.2.2 Identificación Macroscópica y Microscópica.....	21
2.2.3 Purificación.....	22
2.3 Identificación Bioquímica: Hidrólisis del Hipurato.....	22
2.4 Identificación Molecular: PCR-MULTIPLEX.....	22
2.5 Susceptibilidad Antimicrobiana.....	23
2.6 Crioconservación.....	24
3 CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	25
CONCLUSIONES.....	34
RECOMENDACIONES.....	35
BIBLIOGRAFIA.....	36
ANEXOS.....	44
Anexo 1: Preparación de Medio de Cultivo Butzler.....	45
Anexo 2: Preparación del Medio TEC.....	46
Anexo 3: Aislamiento de <i>Campylobacter</i> spp.....	47
Anexo 4: Tinción de Hucker.....	48
Anexo 5: Método de Filtración en Membrana de Nitrocelusa de 0.45 µm.....	49
Anexo 6: Identificación Bioquímica, Hidrolisis del Hipurato.....	50
Anexo 7: Extracción de DNA de Células Cultivadas.....	51
Anexo 8: Electroforesis en Gel de Agarosa 1.5%.....	54
Anexo 9: Determinación de la Actividad Antimicrobiana.....	55
Anexo 10: Crioconservación de Muestras.....	56

INDICE DE TABLAS

TABLA 1: Principales especies de <i>Campylobacter</i> y su reservorio.....	10
TABLA 2: Secuencia de Primers usados en la PCR – MULTIPLEX.....	23
TABLA 3: Puntos de sensibilidad y resistencia de <i>Campylobacter</i>	24
TABLA 4: Frecuencia de aislamiento de <i>Campylobacter</i> spp y especies en materia fecal de aves de corral.....	26

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Colonias de <i>Campylobacter</i> en medio de cultivo Butzler.....	19
FIGURA 2: <i>Campylobacter</i> spp. Observado con tinción de Hucker.....	21
FIGURA 3: Crecimiento de colonias <i>Campylobacter</i> por filtración.....	22
FIGURA 4: Electroforesis de productos de PCR de <i>Campylobacter</i>	29

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICO 1: Susceptibilidad Antimicrobiana de <i>Campylobacter</i>	30
GRÁFICO 2: Susceptibilidad Antimicrobiana de <i>Campylobacter jejuni</i>	31
GRÁFICO 3: Susceptibilidad Antimicrobiana de <i>Campylobacter coli</i>	32

RESUMEN

Campylobacter spp es uno de los patógenos de gastroenteritis más frecuentes a nivel mundial tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo. *Campylobacter* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, uno de los principales reservorios y fuente de infección humana lo constituyen las aves de corral y sus subproductos. La utilización de antimicrobianos como terapia constituye un acontecimiento importante tanto para el tratamiento como para la resistencia bacteriana. Considerando su importancia en el diagnóstico clínico y la falta de datos sobre resistencia bacteriana, se determinó el aislamiento de especies de *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas en aves de corral en la provincia de Loja durante el periodo Abril – Junio del 2016. Se recolectaron 60 muestras de heces de gallinas de las cuales el 68.33% (41) resultaron positivas para *Campylobacter*. Considerando la especie se aisló 90.24% (37) de *C. jejuni* y 9.75% (4) de *C. coli*. Para la determinación de la resistencia bacteriana se utilizó 6 antibióticos, de los cuales se encontró resistencia a ciprofloxacino de 82.92%, eritromicina 7.31%, amoxicilina/ácido clavulánico 2.43%, ampicilina 12.19% y gentamicina 4.87%.

PAABRAS CLAVES: *Campylobacter*, *C. coli*, *C. jejuni*, fluoroquinolonas, resistencia.

ABSTRACT

Campylobacter spp is one of the most frequent pathogens of gastroenteritis worldwide in both developed countries and developing countries. *Campylobacter* is widely distributed in nature, one of the main reservoirs and source of human infection is poultry and its by-products. The use of antimicrobial therapy is an important event for both treatment for bacterial resistance. Considering its importance in clinical diagnosis and lack of data on bacterial resistance, the isolation of *Campylobacter* species resistant to fluoroquinolones in poultry in the province of Loja was determined during the period April - June 2016. 60 samples were collected chicken feces of which 68.33% (41) were positive for *Campylobacter*. Whereas the species 90.24% (37) of *C. jejuni* and 9.75% (4) of *C. coli* was isolated. 6 antibiotics was used for the determination of bacterial resistance, which were resistant to ciprofloxacin of 82.92%, 7.31% erythromycin, amoxicillin / clavulanate 2.43%, 12.19% ampicillin and gentamicin 4.87%.

KEYWORDS: *Campylobacter*, *C. coli*, *C. jejuni*, fluoroquinolones, resistance.

INTRODUCCIÓN

La campylobacteriosis es una zoonosis de distribución mundial que se transmite de animales a seres humanos y es una de las principales causas de enfermedades diarreicas en el ser humano. El género *Campylobacter* es considerado uno de los principales agentes etiológicos de gastroenteritis en el mundo entero, las especies de *Campylobacter* se encuentran habitualmente como comensales del tracto gastrointestinal de una gran variedad de mamíferos y de aves, tanto domésticos como de vida libre. Los principales factores de riesgo de la transmisión de *Campylobacter* que han sido identificados en países en desarrollo son la manipulación y consumo de carne de pollo (Cevallos, 2008).

En Latinoamérica se ha realizado varios estudios en aislamiento de *Campylobacter* en aves de corral, tanto en muestras fecales como en su carne. Países como: Argentina, Brasil, Chile y Perú han aislado *Campylobacter* desde ya más de una década con importantes resultados en cuanto al número de muestras procesadas (Tresierra, *et al* 1995). Tanto Argentina como Brasil catalogados como países desarrollados, *Campylobacter* se presenta como agente importante de enfermedades diarreicas, ésta importancia de salud pública se refleja en los resultados de aislamiento de 66% para *C. jejuni* y 19% *C. coli* en Brasil y 94% en Argentina para *Campylobacter* spp (Fernández, 2000; Fernández, 2011).

El problema de que *Campylobacter* sea un agente causal de gastroenteritis no solo le pertenece a países desarrollados, al contrario, en varios países subdesarrollados la presencia de ésta bacteria es de gran importancia en salud pública como Chile y Perú que han dado importancia al aislamiento de *Campylobacter*, los estudios realizados en éstos países presentaron un 25% de muestras positivas en Chile (Fernández, 2000) y en Perú un 54% que en su mayoría fueron *C. jejuni* (Tresierra, *et al* 1995).

El riesgo de la enfermedad varía de acuerdo con las medidas y prácticas de control implementadas a lo largo de la cadena de elaboración, desde la producción primaria hasta la preparación final del alimento para el consumo humano (FAO and WHO, 2009). Muchas personas con infección por *Campylobacter* buscan atención médica y tratamiento antibiótico, especialmente las personas con infección persistente, los agentes antimicrobianos comunes prescritos para la infección por *Campylobacter* son: eritromicina para los niños y fluoroquinolonas como ciprofloxacino para los adultos (Nelson, *et al* 2007).

En 1985, en los EE.UU. las fluoroquinolonas eran los agentes más activos frente a *C. jejuni* con una sensibilidad cercana al 100%. La proporción de cepas resistentes a las fluoroquinolonas aumentó rápidamente ocasionando un problema mundial en el tratamiento

de la enteritis en general y particularmente por *Campylobacter* y el tratamiento empírico propuesto para la diarrea. Un dato simplificado es el de un estudio en Argentina con un porcentaje de resistencia frente a fluoroquinolonas que supera el 60% (Notario, *et al* 2011). En cambio que en Chile se muestra un porcentaje de resistencia del 32,4% a ciprofloxacino (García, *et al* 2009).

A pesar de la importancia del incremento de *Campylobacter* en países desarrollados y en vías de desarrollo en los últimos años en salud pública, particularmente como agentes de diarrea infecciosa para el ser humano, muchos de éstos no poseen sistemas de diagnóstico ni estudios sobre resistencia bacteriana a fluoroquinolonas. Esto no es ajeno a nuestro país en especial en la ciudad de Loja en el que no existen suficientes información referente y datos estadísticos sobre aislamiento de *Campylobacter* en heces de aves de corral y su resistencia bacteriana, y los problemas que pueden causar al ser humano puesto que el principal factor de transmisión de *Campylobacter* es por consumo de carne de pollo.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes

Se conocen que existen más de 250 tipos de enfermedades transmitidas por los alimentos y el agua. La mayoría son causadas por bacterias, virus, hongos y parásitos, cada año alrededor de 48 millones de personas se enferman debido al consumo de alimentos contaminados de los cuales se estima que 2.4 millones de personas se infectan de *Campylobacter* por lo que el género se identifica como una causa importante de enfermedad diarreica bacteriana en todo el mundo, incluso en los países desarrollados. Los informes elaborados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (AESA) demostraron que las infecciones del género *Campylobacter* encabezan la lista de enfermedades zoonóticas con más de 200 mil casos registrados en 2007 en toda la Unión Europea (Costa, 2011)

Los primeros aislamientos del género *Campylobacter* en el área de la microbiología veterinaria fueron en los años 1909 y 1913 (Farace, *et al* 2007), sin embargo los primeros aislamientos a partir humanos se hicieron en 1886 por el investigador Theodor Escherich en el cual utilizó muestras del colon de niños que tenían diarrea y fallecieron debido a la enfermedad. Gracias a la ayuda microscópica se encontraron la presencia de bacterias de forma espiral (Costa, 2011).

Entre los años de 1909 y 1913 los médicos cirujanos veterinarios Mac Fadyean y Stockmann se encontraron con una bacteria de características microaerófilos parecida a los vibriones que se aislaron de los fetos abortados de ganado bovino y ovino (Farace, *et al* 2007; Costa, 2011; Pérez, 2014; Cervantes, *et al* 2007). La confirmación de aquellos estudios los realizó Smith en 1918 cuando aisló microorganismos muy similares en los fetos abortados en los ganados, gracias a este estudio los denominó *Vibrio fetus* (Costa, 2011).

La aparición de las especies de *Campylobacter* por primera vez fue en 1931 cuando Jones y Little aislaron a partir de bovinos con problemas intestinales una bacteria parecida a la documentada por Smith, en ese momento la llamaron *Vibrio jejuni*, más tarde en 1944 Doyle aisló nuevamente a partir de los intestinos de cerdos con diarrea una bacteria parecida a un vibrión a la cual la denominó *Vibrio coli* (Farace, *et al* 2007).

El primer caso relacionado a humanos se conoció en 1947 cuando una mujer embarazada sufrió un aborto involuntario causado por una infección que se asocia con el microorganismo conocido en la época como *Vibrio* microaerófilo (Costa, 2011). Un estudio realizado por E. King en 1957 analizó las características de los llamados vibrions aislados de diferentes fuentes, concluyó la existencia de dos grupos con

características serológicas y bioquímicas diferentes de los llamados *Vibrio fetus*, mientras algunos eran capaces de crecer a 25 y 37°C, otros lo hacían a 42°C (Farace, *et al* 2007).

Finalmente en 1963 aparece el género *Campylobacter* propuesto por Sebald y Verón que significa bacterias curvas, Éstos investigadores evaluaron y concluyeron que las características eran muy diferentes de *Vibrio spp*, tanto en el metabolismo como en la composición de pares de bases de materiales genéticos (Costa, 2011).

1.2 **Campylobacteriosis**

La campylobacteriosis es una zoonosis de distribución mundial, puede ser transmitida de animales a seres humanos y es una de las principales causas de enfermedades diarreicas en el ser humano. El género *Campylobacter* es considerado uno de los principales agentes etiológicos de gastroenteritis en el mundo entero (Cevallos, 2008). Se adquiere tras la ingestión de comida o agua contaminada y leche sin pasteurizar (Rivera, *et al* 2011)

Uno de los primeros casos de campylobacteriosis diagnosticados fue atribuido al consumo de carne de pollo (Brouwer, *et al* 1979).

Las campylobacterias fueron descubiertas por primera vez en 1970 como un patógeno humano. Escherich en 1886 lo describió como un microorganismo espiral que aisló del colon de niños fallecidos al cual los denominó como "*Cholera infantum*" (Costa, 2011).

1.3 **Campylobacter: Morfología e Identificación**

Campylobacter spp es uno de los patógenos de gastroenteritis más frecuentes a nivel mundial tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo (Rivera, *et al* 2011). *Campylobacter* aparece como causa importante de cuadros diarreicos, predominantemente en niños menores de dos años, disminuyendo su frecuencia a medida que los niños aumentan en edad (Fernández, 2011). Las especies del género *Campylobacter* son bacilos Gram negativos curvos, espirilados o en forma de S que presenta un flagelo único en uno o ambos extremos (Farace, *et al* 2007). Tienen forma de alas de gaviota con dimensiones de 0.2 a 0.9 µm de ancho y hasta 5 µm de largo. Son estrictamente microaerófilos no pueden crecer en aerobiosis, para su crecimiento necesita una atmósfera de 5 o 6% de O² para poder multiplicarse (Fernández, 2008). Es un organismo que requiere condiciones especiales de cultivo, ésta bacteria crece relativamente lento, para su crecimiento requiere de un periodo de incubación de 48

horas y a una temperatura de 42°C para poder asegurar el crecimiento en ciertas especies (*C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*) y un periodo más largo aproximadamente de 5 a 7 días para el crecimiento de otras especies (Vadamme, 2000).

Para su desarrollo son necesarios los aminoácidos y no utilizan los hidratos de carbono como fuente principal de energía, una de la característica bioquímica principal es que éstas son oxidasa positiva (Snelling, *et al* 2005). La energía que producen proviene del metabolismo de aminoácidos (Levin, 2007)

1.3.1 *Campylobacter jejuni*

Campylobacter jejuni es la especie más frecuentemente aislada, tanto en los países en vías de desarrollo como en los países industrializados. Es un agente causal de diarreas, siendo considerado el más virulento por su mayor resistencia a la fagocitosis (Fernández, 2011). Fue identificado como patógeno humano intestinal por primera vez en 1972 (García, *et al* 2009). Este microorganismo ha sido aislado de una gran variedad de animales domésticos y silvestres, especialmente gatos, perros, vacunos, ovinos, porcinos y aves, en los cuales se pueden encontrar en calidad de comensales y comportarse como fuente de contaminación para el ser humano (Ayala, *et al* 2006). *Campylobacter jejuni* se encuentra entre los gérmenes que más frecuentemente se relaciona con la aparición del síndrome de Guillain Barre (Hernández, *et al* 2013). En las aves de corral se describe que el 90% de éstas son portadoras de *Campylobacter* spp, sin afectar su crecimiento (Rivera, *et al* 2011).

C. jejuni es una de las especies más importantes, la cual comprenden dos subespecies: *C. jejuni* subsp. *jejuni* y *C. jejuni* subsp. *doyli*. Desde 1970 se reconoce como la bacteria más aislada a partir de humanos con gastroenteritis. Además está relacionada con diferentes enfermedades como proctitis, septicemia, meningitis, abortos y enfermedades autoinmunes (Hernández, *et al* 2013).

Campylobacter jejuni tiene un genoma relativamente pequeño que quizás sea el requisito para un medio de crecimiento complejo, es la única especie que posee el gen que codifica la enzima hipuricasa, pero se ha identificado que existen *C. jejuni* con hipuricasa negativa por lo que es imposible diferenciarla de otras especies usando pruebas bioquímicas (Snelling, *et al* 2005).

Al igual que otras bacterias posee factores de virulencia como la membrana externa que contiene un lipopolisacárido con la típica actividad endotóxica, la cápsula para la virulencia, la adhesión a las células epiteliales y la invasión. *C. jejuni* se caracteriza por

colonizar en un número elevado de unidades formadoras de colonia (UFC), aproximadamente 1010 UFC son suficientes para colonizar un gramo de intestino, el sitio anatómico principal de colonización es el ciego, donde *C. jejuni* se encuentra en la capa mucosa de las células epiteliales (Hernández, *et al* 2013)

Fue aislada por primera vez en el año de 1931 a partir de bovinos con alteraciones intestinales, el cual era capaz de producir diarreas en éstos animales sanos infectados experimentalmente, ahí fue cuando fue relacionado por primera vez con enfermedades gastrointestinales. Lo denominaron *Vibrio jejuni* (Fernández, *et al* 2003).

1.3.2 *Campylobacter coli*

Es un organismo zoonótico de amplia distribución en la naturaleza y se caracteriza como un importante agente causante de cuadros diarreicos en humanos (Ayala, *et al* 2006). Se considera que la diarrea que produce este patógeno es más benigna, se la puede encontrar en el tracto gastrointestinal de una variedad de aves de corral, a las cuales se ha adaptado perfectamente, es por ello que su temperatura óptima de desarrollo es a 42-43°C (Farace, *et al* 2007).

En los países industrializados *C. coli* es reconocido como agente de diarrea entre el 5 y el 10% de todos los casos de diarrea. Sin embargo, en Sudamérica, *Campylobacter coli* ha sido aislado con mayor frecuencia, representando cerca del 25% de los casos de diarrea producidos por especies del género (Fernández, 2011).

Ha sido aislado a partir de agua de río, de hígados de pollo para consumo humano y de diversos reservorios animales tanto domésticos como silvestres, incluyendo especies de la fauna amazónica, materia fecal de pollos, carne de aves y aguas servidas (Fernández, 2011).

1.4 Reservorio

Campylobacter se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, teniendo como reservorio natural una amplia variedad de animales tanto domésticos como salvajes en los que se encuentran: cerdos, aves de corral, perros, gatos, vacas, cabras y roedores. Uno de los principales reservorios y fuente de infección humana lo constituyen las aves de corral y sus subproductos (Cervantes, 2007).

Aunque colonizan diferentes animales mamíferos y comparten con diferentes bacterias, *Campylobacter* spp suele encontrarse en las aves de corral o silvestres.

Inclusive se ha visto que también las moscas, cucarachas y escarabajos son vectores de transmisión habituales. Algunas especies de *Campylobacter* se adaptan especialmente en las aves puesto que estos animales se encuentran a una temperatura corporal normal de 42°C. Las aves albergan éstas bacterias en el ciego pero también se las puede aislar del hígado gracias a su capacidad de invasión (Terzolo, 2010).

El agua contaminada es otro tipo de reservorio natural de *Campylobacter*, así como también lo es la contaminación fecal del suelo por lo que los vegetales cosechados en suelo contaminado o lavados en agua contaminada se pueden infectar por dicha bacteria (Elika, 2013).

Tabla 1: Principales especies de *Campylobacter* y su reservorio.

Especies	Reservorio
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	Aves y mamíferos
<i>C. coli</i>	Aves y mamíferos
<i>C. fetus</i>	Bovinos y ovinos

Fuente: Fernández, 2011

La amplia distribución de *Campylobacter* también dificulta la elaboración de estrategias de control a lo largo de la cadena alimentaria. Sin embargo, en los países que han adoptado estrategias específicas para reducir la prevalencia de *Campylobacter* en las aves de corral vivas, se ha observado una reducción similar en los casos humanos (OMS, 2011).

1.5 Mecanismos de Transmisión

Muchos de los casos de enteritis humana han sido asociados al contacto con animales, agua contaminada o alimentos de origen animal (Farace, *et al* 2007; Skirrow, 1994). Se considera que un alto porcentaje de infecciones es provocado por consumo de carne de aves de corral mal cocida (Farace, *et al* 2007). A medida que se aumenta el consumo de carne de aves también aumentará las intoxicaciones causadas por esta bacteria (Terzolo, 2010).

La bacteria *Campylobacter* puede transmitirse al hombre por diferentes factores, a través del contacto directo con animales o canales infectados con *Campylobacter*, por falta de higiene e inadecuada manipulación de los alimentos. Los alimentos asociados

con *Campylobacter* son muy variados, además del consumo de carne de aves de corral mal cocidas, también se encuentra la leche sin pasteurizar o sin hervir que es otra fuente importante de transmisión. En cuanto a las frutas y verduras hay que considerar como fuente de transmisión aquellas que en la producción agrícola son regadas y lavadas con agua contaminada, así mismo el pescado y los moluscos pueden estar contaminados si el agua donde se encuentran está contaminada con *Campylobacter*. También se pueden encontrar en alimentos que son preparados bajo atmósfera modificada como comidas preparadas listas para el consumo (Elika, 2013).

En las aves la principal vía de transmisión de *Campylobacter* es gracias a la vía horizontal ya que ésta bacteria se puede encontrar en el medio ambiente próximo a la granja tales como: aves silvestres, animales propios de la granja o animales salvajes y una variedad de insectos entre ellos las moscas (Newel, *et al* 2003).

Campylobacter jejuni y *Campylobacter coli* son causas importantes de diarreas agudas en viajeros que visitan zonas en vías de desarrollo. (Farace, *et al* 2007).

1.6 Patogenia en aves de corral

Ambas especies de *Campylobacter* colonizan la mucosa intestinal de la mayoría de animales de sangre caliente, incluyendo aquellos que son productores de alimentos, el ambiente de colonización de *Campylobacter* son los intestinos de todas las aves de corral, silvestres, pavos, codornices, patos y hasta avestruces. Aunque también pueden llegar a colonizar el bazo y el hígado (Newel, *et al* 2003). Generalmente se considera que *Campylobacter* coloniza el intestino aviar como un comensal y que no está asociado con patología alguna en las pollos, tan solo 35 UFC pueden ser suficientes para la colonización exitosa en los pollos (Hermans, *et al* 2011; Meade, *et al* 2009).

Después de la ingesta, la bacteria alcanza el ciego y procede a multiplicarse lo que resulta en una establecida población colonizadora de *Campylobacter* dentro de las 24 horas después de la entrada. La mayoría de las aves de corral son colonizadas después de dos o cuatro semanas de edad, estos debido a que adquieren inmunidad innata gracias a la presencia de anticuerpos maternos que les sirven de protección (Hermans, *et al* 2011; Newel, *et al* 2003).

La respuesta inmune innata es un factor clave para la activación inmune adaptativa, la inmunidad innata es iniciada por receptores de reconocimiento de patógenos que pueden responder directamente al patógeno o a componentes del patógeno mediante

el inicio de una cascada de señalización celular (Meade, *et al* 2009). La eficacia de tales anticuerpos en la prevención o limitación de la infección sigue siendo desconocida (Newel, *et al* 2003).

Al igual que el medio ambiente, el intestino de las aves de corral se puede encontrar factores de estrés ambiental que comprometen el crecimiento óptimo de *Campylobacter*, la colonización persistente indica que la bacteria alberga características que le confieren protección hacia un ambiente hostil no solo al interior del tracto digestivo sino también fuera del huésped. La quimiotaxis parece ser un factor importante para promover su migración hacia las condiciones favorables ayudando su supervivencia y colonización de la mucosa intestinal así como también es indispensable la presencia de flagelos intactos y móviles (Hermans, *et al* 2011).

Una vez que se detecta la colonización en una de las aves de corral, más del 95% de las aves son colonizadas varios días después y permanecen así hasta su muerte (Hermans, *et al* 2011; Newel, *et al* 2003).

1.7 Patogenia en Humanos

Campylobacter spp es una bacteria patógena que afecta al hombre, causando diarrea y otras enfermedades como septicemia, meningitis o complicaciones, como artritis reactivas (Lapierre, 2013).

Cuando la bacteria entra al organismo humano provoca una enfermedad llamada campylobacteriosis que se presenta como una forma grave de diarrea, sin embargo, la mayoría de las personas que poseen la enfermedad tienen un periodo de recuperación de dos a cinco días, es raro observar que la infección por *Campylobacter* dure por un tiempo prolongado (Costa, 2011).

Generalmente los individuos afectados por ésta bacteria se recuperan sin necesidad de un tratamiento, pero a diferencia de ancianos débiles o enfermos pueden llegar hasta morir a causa de infección por *Campylobacter* spp (Terzolo, 2010).

La infección por *Campylobacter* comienza como una enteritis la cual evoluciona a otras enfermedades e incluso puede ocasionar infecciones sistémicas (O`Ryan, *et al* 2005). El periodo de incubación varía de dos a cinco días pero puede extenderse hasta diez días (Costa, 2011). Se caracteriza por lo general con diarrea acuosa, dolor abdominal y fiebre leve (Cervantes, 2007). Por lo general estas infecciones conducen a la diarrea tipo inflamatoria que se manifiesta como calambres severos en personas procedentes

de países desarrollados, suele ser diarrea estacional y afecta directamente a adultos, jóvenes y niños pequeños, a diferencia de los países en desarrollo que afecta principalmente a niños (Vliet, *et al* 2001)

La dosis infectante es de 10^4 microorganismos ya que es muy sensible al Ph gástrico (ISP, 2014), los cuales se multiplican en el intestino delgado, destruyen la mucosa intestinal, invaden el epitelio y producen inflamación con infiltración de leucocitos en la lámina propia, pudiendo observarse la presencia de leucocitos en las heces en 25 a 80% de los casos (Rivera, *et al* 2011). Se cree que la capacidad de este patógeno para alcanzar el tracto intestinal, es debido en parte a su resistencia al ácido gástrico y también a su resistencia a las sales biliares (Lapierre, 2013).

Para establecer una infección suficiente para causar la enfermedad, el microorganismo debe sobrevivir al estrés fisiológico asociado con ambientes internos y externos como la fluctuación de temperatura, variaciones del Ph, diferentes sitios de alojamiento, la inmunidad del huésped, el estrés oxidativo y la disponibilidad limitada de nutrientes (Costa, 2011)

1.8 Factores de Patogenicidad

1.8.1 Motilidad

La movilidad de la bacteria es gracias a la presencia de flagelos el cual le permite colonizar diferentes tipos de células (Mills, *et al* 1998). Los flagelos son necesarios para la colonización del intestino delgado, desde allí el patógeno se traslada hasta el colon, el flagelo está constituido por una flagelina mayor FlaA y una menor FlaB. La función de motilidad se realiza mediante las condiciones ambientales del tracto gastrointestinal (Jagannthan, *et al* 2005; Lapierre, 2013). La motilidad de estas bacterias producidas por flagelos es muy rápida, ayuda a superar la peristálsis intestinal y se relaciona directamente con la activación de procesos infecciosos gracias a su alta patogenicidad. Además de la importancia de motilidad por parte del flagelo, éste también tiene la función de producir proteínas de virulencia (Guerry, 2007; Lodge, 2007). En si el flagelo es importante para la colonización intestinal sin embargo este factor no es solo requerido para la locomoción y quimiotaxis sino además tiene un rol importante en la participación de otros procesos complejos (Lapierre, 2013).

1.8.2 Adherencia

El responsable de la capacidad de adherencia celular de *Campylobacter* es el gen *flaA* (Teixeira, *et al* 2011). Poseen varias proteínas en la membrana externa, de diferentes pesos moleculares que median la adherencia o unión de *Campylobacter* a las células del huésped (De Melo, *et al* 1990).

Otro gen involucrado en la adherencia es CadF que se expresa en todas las cepas de *Campylobacter jejuni* y *coli*, participan en la adhesión celular uniéndose a la fibronectina (Lapierre, 2013).

1.8.3 Invasión

La invasión puede ser uno de los mecanismos para que se produzca diarrea, al parecer la invasión de tejidos provoca inflamación celular junto a la actividad de toxicidad produce una disminución importante en la capacidad de absorción del intestino, factor causante de la enteritis y por consiguiente la producción de diarrea (Brooks, 2011; Lapierre, 2013). Todas las cepas de *Campylobacter* tiene propiedades invasivas muy diferentes lo cual presenta variabilidad en las diferentes cepas de una misma especie (Terzolo, 2010).

1.8.4 Producción de citotoxinas

Campylobacter tiene la capacidad de producir citotoxinas de distensión o CDT, ésta citotoxina tiene la capacidad de producir muerte celular, está conformada por 3 subunidades codificadas por los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*. *CdtB* es la que ejerce el efecto, ingresa a la célula y se une en la superficie celular con las proteínas *CdtA*, *CdtC*, rompiendo el ADN celular y activando el mecanismo de reparación celular que concluye con la muerte celular (Lapierre, 2013).

1.9 Tratamiento

La mayoría de casos de gastroenteritis causada por *Campylobacter* no necesariamente necesitan de la aplicación de una terapia antimicrobiana, ya que estos eventos suelen ser síntomas pasajeros y auto limitados. Pero cuando los síntomas se presentan de manera prolongada o a su vez se presentan gravemente es necesaria la aplicación de terapia antimicrobiana. Algunas especies de *Campylobacter* son resistentes a diferentes antibióticos como: penicilina, ampicilina y cefalosporinas (Hernández, *et al* 2013).

Cabe destacar que *Campylobacter* spp. es sensible a diversos tipos de antibióticos, incluido macrólidos, especialmente eritromicina y quinolonas como ciprofloxacino, siendo estos fármacos considerados de primera línea a la hora de aplicar el tratamiento clínico (Rivera, *et al* 2011).

Al aplicar macrólidos para el tratamiento como la azitromicina y eritromicina se recomienda usarla en los primeros episodios de diarrea aguda, que principalmente es causada por *C. jejuni* y *C. coli* (O`Ryan, *et al* 2005).

En general el uso de agentes antimicrobianos en la terapia de las enfermedades infecciosas, ha constituido un acontecimiento sin precedentes, porque el control de las infecciones permitió modificar favorablemente el panorama de la morbilidad y mortalidad del paciente (Machado, *et al* 1998).

1.10 Resistencia Bacteriana

La resistencia bacteriana es un problema que se ha ido incrementando en las últimas décadas, a medida que se han sintetizado nuevos fármacos aumenta la resistencia a los mismo por ciertas cepas (Machado, *et al* 1998)

Las bacterias tienen la capacidad de desarrollar mecanismos de resistencia, las cuales consisten en la producción de enzimas que inactivan los antibióticos e impiden la llegada del fármaco al punto diana. Una bacteria o una cepa bacteriana es sensible a un antibiótico, cuando el antibiótico es eficaz frente a ella (Pérez, 1998).

El estudio de comportamiento de *Campylobacter* a diferentes antimicrobianos ha sido motivo de interés de investigadores de diferentes países de América del Sur, quienes han puesto en evidencia la aparición de cepas de origen animal resistentes a quinolonas, encontrándose que la resistencia a éstas últimas ha alcanzado tasas superiores al 60% (Fernández, 2011).

Especies de *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas se conoció por primera vez a finales del año 1980 y se han documentado en diferentes países. Varias investigaciones concluyeron que un aumento de la prevalencia de resistencia a fluoroquinolonas está relacionada temporalmente con la introducción de éstas en medicina veterinaria y que las infecciones por *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas se asocian con síntomas más largos y hospitalizaciones más frecuentes que las infecciones por *Campylobacter* susceptibles a dicho medicamento (Nelson, *et al* 2007).

1.10.1 Resistencia a Fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas son compuestos derivados del ácido nalidíxico, pero con la presencia de un átomo de flúor en el anillo 6 de la molécula, lo cual le da características determinantes, amplía su espectro bacteriano y limita sus aspectos bacterianos (Cordiés, *et al* 1998).

En 1985, en los EE.UU. las fluoroquinolonas eran los agentes más activos frente a *C. jejuni* con una sensibilidad cercana al 100%. La proporción de cepas resistentes a las fluoroquinolonas aumentó rápidamente ocasionando un problema mundial en el tratamiento de la enteritis en general y particularmente por *Campylobacter* y el tratamiento empírico propuesto para la diarrea (Notario, *et al* 2011).

El incremento de la resistencia a las fluoroquinolonas coincide gracias a la administración de éstas en aves de corral y en medicina veterinaria en general (Hernández, *et al* 2013).

Luego del uso del ácido nalidíxico en la década de los 60, apareció rápidamente la resistencia a éste, se demostró que el mecanismo de tal resistencia era la alteración a nivel de la girasa del DNA. Otro factor importante de resistencia es la disminución de la permeabilidad de la membrana celular lo que trae por consecuencia una baja penetración intracelular del antibiótico (Cordiés, *et al* 1998).

En principio los sustituyentes de flúor en los carbonos C6, C7 ayudan considerablemente a la penetración celular, inhibición a la ADN girasa, la potencia, la solubilidad y otras propiedades fisicoquímicas (Leyva, *et al* 2007).

1.10.2 Resistencia a Beta-lactámicos

Tras décadas de uso clínico de los betalactámicos a pacientes con diferentes infecciones éstos siguen siendo los antimicrobianos más prescritos, los betalactámicos poseen una actividad bactericida lenta independientemente de la concentración plasmática alcanzada (Marín, *et al* 2003). Los betalactámicos inducen una mayor liberación de endotoxinas debido a su rápida capacidad bactericida y, como consecuencia producen una mayor respuesta inflamatoria. Su función es la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, interfiriendo en la síntesis del peptidoglicano mediante un bloquea en la última etapa de su producción (Gómez, *et al* 2015).

La resistencia de las bacterias a este tipo de antibióticos representa un grave problema ya que es el grupo de antibióticos más utilizado. Para la resistencia, las bacterias desarrollan mecanismos que le permiten resistirse a la administración de éstos antibióticos: alteraciones de las enzimas diana, alteración de la membrana externa y producción de enzimas inactivantes (Pérez, 1998). La producción de enzimas betalactamasas representa el principal mecanismo de resistencia frente a los betalactámicos, especialmente para bacterias gramnegativas y anaerobios como lo es *Campylobacter* (Suárez, *et al* 2009).

1.10.3 Resistencia a Macrólidos

Los macrólidos son antibióticos que pueden ser de origen natural, semisintético o sintético (Cosme, 2000), se encuentran constituidos por un anillo macro cíclico unido a dos azúcares, su función es unirse a la subunidad 50S de los ribosomas bacterianos inhibiendo la síntesis proteica (Portillo, *et al* 2000), (González, *et al* 1998).

Para el tratamiento de campylobacteriosis los macrólidos son los antimicrobianos de primera elección al igual que otros grupos de antibióticos, pero recientemente se ha complicado la terapia debido a que presentan resistencia a estos grupos antimicrobianos (González, *et al* 2013).

La resistencia bacteriana en bacterias gramnegativas se produce gracias a la incapacidad del fármaco para penetrar en los sitios receptores (González, *et al* 1998), gracias a su característica hidrofóbica los fármacos atraviesan mal la membrana externa de organismos gramnegativos, lo cual les confiere resistencia natural, al igual que otros grupos de antibióticos existen resistencias gracias a las metilaciones que pueden impedir la unión del antibiótico a la subunidad 50S ribosomal, ésta característica es propia de organismos anaerobios (Pérez, 1998)

La alteración de un solo aminoácido de la proteína diana del ribosoma determina una disminución de la afinidad para los macrólidos, esto ha sido demostrado en *Campylobacter spp* (Cosme, 2000).

1.10.4 Resistencia a Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son medicamentos que han sido utilizados por más de 40 años. Su actividad antimicrobiana es específica para bacilos gramnegativos con espectro terapéutico amplio. Son bactericidas rápidos, inhiben la síntesis proteica bacteriana

debido a su acción directa sobre las subunidades 30S y 50S de los ribosomas (Rodríguez, 2002).

Las bacterias anaerobias son resistentes de modo natural por carecer de sistemas de transporte para captar a los aminoglucósidos (Pérez, 1998). Con la aparición de la gentamicina contribuyó mucho en el tratamiento de las infecciones causadas por bacilos gramnegativos, pero el uso continuo de ésta familia de antibióticos también causaba un alto grado de toxicidad, resistencia bacteriana y sobreinfección (Palomino, *et al* 2003).

1.11 Diagnóstico

Por lo general no existe un método estándar para el diagnóstico de *Campylobacter* spp. Varios investigadores han descrito diferentes métodos sencillos y asequibles que han sido utilizados y han dado resultado eficaz para el diagnóstico. Estos métodos se han descrito con respecto a las especificaciones de crecimiento que necesita *Campylobacter*, por ejemplo un método que facilite la producción de la atmosfera como se lo hizo en Brasil, en otros países se vieron obligados a combinar sangre de cerdo y bovino para el crecimiento de *Campylobacter* (Fernández, 2011).

Existen múltiples técnicas para el aislamiento de *Campylobacter* spp, que van desde la utilización de medios no selectivos, la utilización de medios de recuperación, medios enriquecidos, caldos enriquecidos y filtración (Prieto, 2010). Para la detección directa se la puede realizar por medio de una tinción de Gram (Forbes, *et al* 2007) o tinción de Hooker directo de la muestra fecal, la identificación se basa en el conocimiento morfológico de ésta bacteria (Fernández, 2011; Brooks, 2011).

Para el aislamiento se recomienda usar medios enriquecido para aumentar la sensibilidad del cultivo de microorganismos que pueden estar estresados por condiciones ambientales o en el caso que tengan bajos niveles de microorganismos en la muestra y la adecuación de una atmósfera microaerófila que consta de 5-10% de oxígeno y 5-10% de dióxido de carbono. Para determinar la selectividad del medio se usan diferentes antibióticos, generalmente cefalosporinas en combinación a veces con otros antibióticos como vancomicina (OIE, 2008).

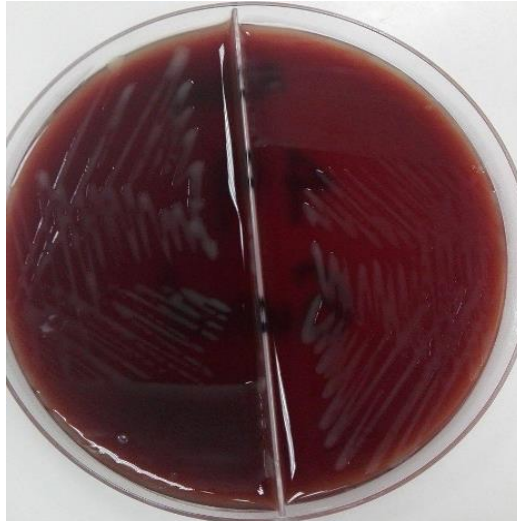


Figura 1: Colonias de *Campylobacter* en medio de cultivo Butzler.
Fuente: El Autor.

En cuanto a la identificación de la especie se utilizan pruebas bioquímicas para determinar características metabólicas bacterianas, una de ellas es la hidrólisis del hipurato que busca la presencia de la enzima hipuricasa (Fernández, *et al* 2010). La necesidad de confirmar la presencia de la especie de *Campylobacter*, han llevado a cabo varios estudios en la utilización de pruebas moleculares como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite el diagnóstico definitivo de especie de *Campylobacter* en comparación a las pruebas bioquímicas como la hidrólisis del hipurato la cual puede presentar discrepancias (Martínez, 2008).

CAPITULO II
METODOLOGIA

2 Metodología

2.1 Recolección de muestras

Se recolectaron un total de 60 muestras de material fecal de aves de corral (gallinas) que fueron facilitadas por diferentes sectores de crianza de la ciudad de Loja en el periodo Abril – Junio 2016. La obtención de las muestras se las realizó por el método de hisopado cloacal en diferentes sectores de la ciudad, Amable María, La Paz y Época; se las trasladó inmediatamente al laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica Particular de Loja en donde fueron procesadas.

2.2 Aislamiento e Identificación de *Campylobacter*

2.2.1 Siembra e incubación

Las muestras fueron sembradas en un medio de cultivo agar sangre 5%, suplementado con antibiótico Butzler. Se incubó en atmósfera microaerofilia (Sobre *CampyGen* de Thermo Scientific) a 42°C por un periodo de 48 horas.

2.2.2 Identificación Macroscópica y Microscópica

Del cultivo primario se escogieron aquellas colonias presuntivas con crecimiento típico de *Campylobacter*, éstas colonias se caracterizan por tener una forma redonda, bordes regulares o irregulares de color grisáceas que siguen su crecimiento en las líneas del estriado. Para la confirmación se realizó tinción de Hucker (**Anexo 4**), las características observadas fueron: bacilos curvos gramnegativos con forma de alas de gaviota (**Figura 2**).

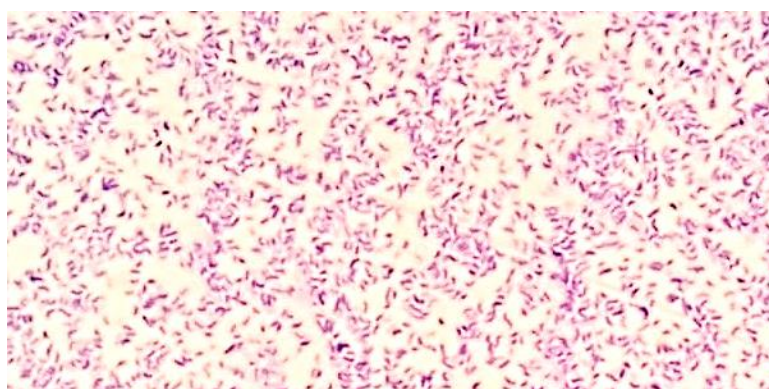


Figura 2: *Campylobacter* spp. Observado con tinción de Hucker
Fuente: El Autor

2.2.3 Purificación

La purificación del cultivo se realizó mediante filtración para lo cual se utilizó papel filtro Millipore de 0.42 μm de diámetro **(Figura 3) (Anexo 5)**.



Figura 3: Crecimiento de colonias *Campylobacter* por filtración
Fuente: El Autor

2.3 Identificación Bioquímica: Hidrólisis del Hipurato

Este método consiste en la capacidad de *Campylobacter* para hidrolizar el hipurato de sodio a ácido benzoico y glicina por acción de la enzima hipuricasa, como indicador de ésta reacción se utilizó ninhidrina. El resultado positivo se interpretó en el cambio del color cuando existe hidrólisis, presentando un color azul intenso o azul púrpura, característica que presentan *C. jejuni*, y cuando no existe hidrólisis no hay coloración alguna siendo un resultado negativo **(Anexo 6)**.

2.4 Identificación Molecular: PCR – MULTIPLEX

Para éste ensayo previamente se procedió a la extracción de ADN bacteriano de cada una de las muestras, para este proceso se usó el protocolo del Kit de extracción Wizard Genomic DNA Purification (PROMEGA) **(Anexo 7)**.

Se realizó PCR – MULTIPLEX con un volumen total de reacción de 25 μl para cada muestra, la amplificación del ADN se la realizó en el termociclador SimpliAmp Thermal Cyclers, para observar los resultados de la PCR se corrió en gel de agarosa al 1.5% en el cual se utilizó un marcador molecular de 100 bp TrackIt™ DNA Ladder INVITROGEN y se reveló el gel bajo luz ultravioleta en el equipo ENDURO™ GDS TOUCH Labnet **(Anexo 7 y 8)**.

Tabla 2: Secuencia de Primers usados en la PCR – MULTIPLEX

ESPECIE	TAMAÑO (bp)	GenBank	Primer	Secuencia (5' a 3')
Género <i>Campylobacter</i>	816	16S rRNA	C412F	5'-GGATGACACTTTTCGGAGC-3'
			C1228R*	5'-CATTGTAGCACGTGTGTGC-3'
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	611	23S rRNA	HYO1F	5'-ATAATCTAGGTGAGAATCCTAG-3'
			HYOFET23SR	5'-GCTTCGCATAGCTAACAT-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'-TAGAGAGATAGCAAAAAGAGA-3'
			CLR	5'-TACACATAATAATCCCACCC-3'
<i>C. jejuni</i>	161	<i>cj0414</i> §	C-1	5'- CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT-3'
			C-3	5'-CCATAAGCACTAGCTAGCTGAT-3'
<i>C. upsaliensis</i>	86	<i>lpxA</i>	CU61F	5'-CGATGATGTGCAAATTGAAGC-3'
			CU146R	5'-TTCTAGCCCCTTGCTTGATG-3'

Fuente: Yamasaki, *et al* 2007

2.5 Susceptibilidad Antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de las cepas aisladas de *Campylobacter* se las determinó mediante el método de difusión en agar Muller Hinton con 5% de sangre según lo establece EUCAST 2016 (Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana) (**Anexo 9**).

Los antibióticos utilizados para medir la resistencia y sensibilidad bacteriana fueron: ácido nalidíxico (NA-30ug), ciprofloxacino (CIP-5ug), eritromicina (E-15ug), gentamicina (GM-10ug), amoxicilina/ácido clavulánico (AMC-20/10ug) y ampicilina (AM-10ug). Para la incubación se la realizó a una temperatura de 42°C junto a sobres generadores de microaerofilia por un periodo de 48 horas.

Tabla 3: Puntos de sensibilidad y resistencia de *Campylobacter*

Grupos	Antibióticos	S \geq	R<
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino	26	26
Beta-lactámicos	Ampicilina	19	14
	Amoxicilina/Acido Clavulánico	19	14
Macrólidos	Eritromicina	20	20
Aminoglicosidos	Gentamicina	17	17

Fuente: EUCAST, SFM, CASFM (2016)

2.6 Crioconservación

Luego de obtener cultivos purificados fueron conservadas en criotubos CRYOBANK a una temperatura de -80°C (**Anexo 10**).

CAPITULO III
RESULTADOS Y DISCUSIONES

En la presente investigación se analizaron un total de 60 muestras de materia fecal, de las cuales se obtuvo un aislamiento del 68% para *Campylobacter* spp (**Tabla 4**).

Tabla 4: Frecuencia de aislamiento de *Campylobacter* spp y especies en materia fecal de aves de corral.

Nº de Muestras	Cepas Positivas	%	Especies			
			<i>C. jejuni</i>	%	<i>C. coli</i>	%
60	41	68,33	37	90,24	4	9,75

Fuente: El Autor

Los datos obtenidos en la presente investigación se correlacionan con los obtenidos en Argentina con un 65% para *Campylobacter* spp procedentes de pollos de granjas familiares y de establecimientos industriales avícolas (Notario, *et al* 2011). En Chile se encontraron resultados similares con un 66,7% (Fernández, 2007).

Resultados menores a los nuestros se encontraron en varias localidades tanto nacionales como internacionales, en la ciudad de Loja se encontró un porcentaje del 42% para *Campylobacter* spp (Núñez 2015). En Chile dos estudios de 30,87% (Escobar 2009) y 38,1% (Jara, 2006). En Perú mediante una investigación en la flora amazónica obtuvieron un resultado del 25% de aislamiento de *Campylobacter* spp (Tresierra, *et al* 2006), en granjas escogidas al azar en la ciudad de Iquitos – Perú se obtuvo un resultado de 44% de efectividad (Tresierra, *et al* 1995).

En los últimos años las especies *Campylobacter* han aumentado como una causa común de gastroenteritis en seres humanos, considerada como el primer agente de cuadros de diarrea en países desarrollados y la segunda causa principal de muerte entre niños menores de 5 años de edad en países en desarrollo (Fernández, *et al* 2005; Vasco, *et al* 2014; Fernández, *et al* 2007). En un gran número de países industrializados se especifica que las infecciones por *Campylobacter* spp son mucho más frecuentes que por *Salmonella*, *Shigella* o *E. coli* (AESAN, 2012). En USA e Inglaterra se registran que *Campylobacter* se aísla con mayor frecuencia que *Salmonella* y *Shigella*. En Dinamarca *Campylobacter* constituye la causa más común de enfermedad diarreaica transmitida por alimentos. En América latina la realidad es diferente, ya que el diagnóstico de *Campylobacter* depende de la región y del origen de la población estudiada, predomina bacterias como *E. coli* y *Shigella* cuando se estudian pacientes con enfermedades diarreaicas (ISPC, 2014).

Los subproductos de aves son reconocidos como uno de los principales vehículos de transmisión alimentaria, la manipulación de éstos es un factor importante de riesgo para la contaminación de seres humanos ya que se ha demostrado que lotes de esta carne poseen colonias de *Campylobacter* principalmente la especie *C. jejuni* (Fernández, *et al* 2005; Shreeve, *et al* 2000). No existe diferencia alguna en el consumo de carne aviar respecto a su forma de cocción (López, *et al* 2003).

Muchas aguas superficiales están contaminadas con material fecal animal que contienen *Campylobacter spp.* Ésta bacteria puede mantenerse viva por un periodo de hasta 3 meses en el lodo y en aguas estancadas (AESAN, 2012). Para minimizar el grado de contaminación, tener presente prácticas de higiene como método de protección para evitar la contaminación, ya que aquellos grupos de aves en condiciones de mayor saneamiento básico y de medidas higiénicas intensivas presentaban una reducción de 50% de infección por *Campylobacter* (Evans, *et al* 2000; Fernández, 2011).

El alto porcentaje de contaminación por *Campylobacter* en nuestros resultados se atribuye al hábito de coprofagia y el nivel de sanidad de crianza, las muestras se las adquirió en grupos de gallinas encerradas en un solo patio ayudando a la proliferación de *Campylobacter* de casi todas las gallinas.

En nuestro estudio luego del aislamiento de *Campylobacter* se procedió a la determinación de la especie. La especie predominante en la presente investigación fue *C. jejuni* con una tasa de 90.24% (37/41) dato que se correlaciona con el obtenido en Argentina con un 92.8% (López, *et al* 2003).

En Loja se reportó que *C. jejuni* se aisló con un porcentaje de 78% (Núñez, 2015). En otro estudio en ésta ciudad se mostraron resultados igualmente inferiores con 68.8% (Simaluiza, *et al* 2015), en Argentina, se determinó una tasa de 65.38 % en relación con otras especies (Notario, *et al* 2011). Chile ha sido pionero en la investigación sobre aislamiento de estas especies, tanto así que en diferentes estudios se reportó un porcentaje de 63.04% (Escobar, 2009), así mismo se encontró en el sur de Chile que *C. jejuni* predomina con 26.7% (Fernández, *et al* 2007). En la ciudad de Iquitos – Perú con 61% (Tresierra, 1995), todos estos datos de diferentes países indican un porcentaje menor de aislamiento de la especie *C. jejuni* en relación con los encontrados en nuestro estudio.

La otra especie identificada en nuestra investigación fue *C. coli* con un porcentaje del 9.75% que es menor a los porcentajes encontrados en Loja con 22% (Núñez, 2015), y 31.2%, en muestras de hígados de pollo para consumo humano (Simaluiza, *et al* 2015).

Se ha reportado en diferentes estudios una incidencia mayor de la presencia de *C. coli* en comparación a nuestro estudio. Chile reportó un porcentaje para *C. coli* de 34.78% (Escobar, 2009). En cambio que en el sur de Chile se encontró 18.3% (Fernández, *et al* 2007). En la ciudad de Iquitos – Perú con un 38% (Tresierra, *et al* 1995).

En varios estudios se han descrito que la especie colonizadora en las gallinas en mayor porcentaje es *C. jejuni* entre 65-95% de los casos seguido con menor frecuencia por *C. coli* y rara vez por otras especies (Fernández, *et al* 2007; AESAN, 2012; Terzolo, 2010; ISPC, 2014). En relación a este dato significativo queda claro que el resultado de nuestro estudio se encuentra dentro de los porcentajes de referencia que se describen por varios investigadores. Solo queda afirmar que *C. jejuni* es la especie que se aísla con mayor frecuencia de las dos especies comúnmente conocidas.

En cuanto al origen de la enfermedad en el hombre se describe que *C. jejuni* y *C. coli* son los primeros agentes de enfermedades diarreicas, *C. jejuni* se le atribuye el 85% de los casos y 15% para *C. coli* (Fernández, *et al* 2007; Moore, *et al* 2005; Fernández, 2011; Cervantes, *et al* 2007).

Trabajos de investigación y de prevención de *Campylobacter* en México resaltan a *C. jejuni* como problema de gran impacto social gracias a su estrecha relación con la provocación del síndrome Guillain-Barré, varios estudios demostraron que los pacientes que padecían este síndrome era por que anteriormente habían estado infectados por *C. jejuni* (Hernández, *et al* 2013). Se cree que *C. jejuni* provoca dos tipos de diarreas: la inflamatoria que se asocia con fiebre, moco y sangre en la materia fecal y la diarrea sin inflamación con excremento acuoso (Cervantes, *et al* 2007).

El conocimiento de las especies prevalentes y la identificación de las cepas aisladas nos ayudan a informarnos sobre la epidemiología y permitirnos relacionarlo con las fuentes de contagio y el modo de transmisión. Existen pruebas genotípicas que permiten realizar una mejor caracterización de las cepas, dejando de lado aquellos métodos convencionales de tipificación basados en pruebas bioquímicas (Rivera, *et al* 2011).

Para poder corroborar los datos obtenidos en cuanto a la diferenciación de la especie por medio de la hidrólisis del hipurato éstos se confirmaron mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR-MULTIPLEX). En el análisis molecular se puede observar las

bandas de pesos moleculares que identifican al género y a ambas especies de *Campylobacter*. El peso molecular para *Campylobacter* es aproximadamente de 816 pb, *C. jejuni* 162 pb y para *C. coli* 502 pb (Yamasaki, *et al* 2007) (**Figura 4**).

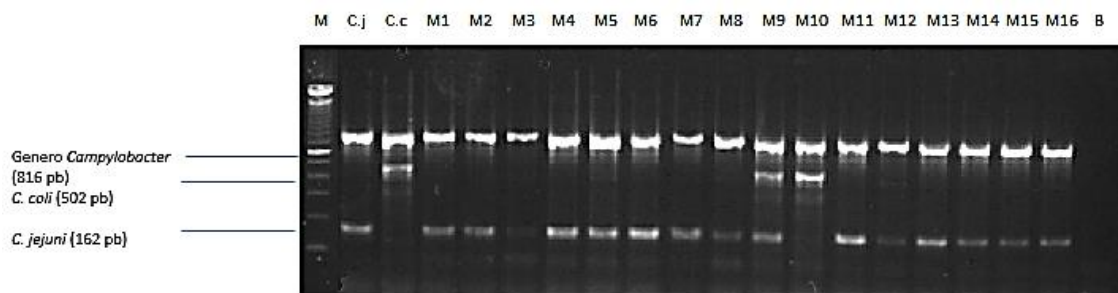


Figura 4: Electroforesis de productos de PCR de *Campylobacter*; M= marcador de peso molecular 100 pares de base; Cj= control *C. jejuni*; Cc= control *C. coli*; M1-M16= muestras estudiadas; B= blanco. Observado en gel de agarosa al 1.5%

Fuente: El Autor

El ensayo de PCR-MULTIPLEX como técnica molecular para la identificación de especies de *Campylobacter* proporcionó resultados verdaderos y confiables que confirman los resultados de las pruebas bioquímicas. El ensayo de PCR-MULTIPLEX se describe como un estudio adicional que confirma el pobre poder diferencial de las pruebas bioquímicas que se basan en las características metabólicas (Yamasaki, *et al* 2007) requiere primeramente la extracción de ADN de las muestras y posteriormente se complementa con una electroforesis en gel de agarosa (Denis, *et al* 1999; OIE, 2008). Varios autores concuerdan en que el método convencional de cultivo para aislamiento de *Campylobacter* lleva mucho tiempo y es muy laborioso, a diferencia de PCR que es un método rápido, sensible y adecuado para la detección de *Campylobacter* en muestras masivas de aves de corral (Bang, *et al* 2001; Yamasaki, *et al* 2007; Linton, *et al* 1996).

Diferentes investigadores de varios países de Sudamérica motivados por el comportamiento de *Campylobacter* frente a diferentes antimicrobianos encontraron cepas tanto de origen humano como animal que son resistentes a eritromicina, ampicilina y a quinolonas, siendo ésta última con una mayor resistencia de 60% (Fernández, 2011).

Se determinó la resistencia/sensibilidad del género *Campylobacter* frente a 6 diferentes antimicrobianos que a continuación se detallan los resultados (**Grafico 1**).

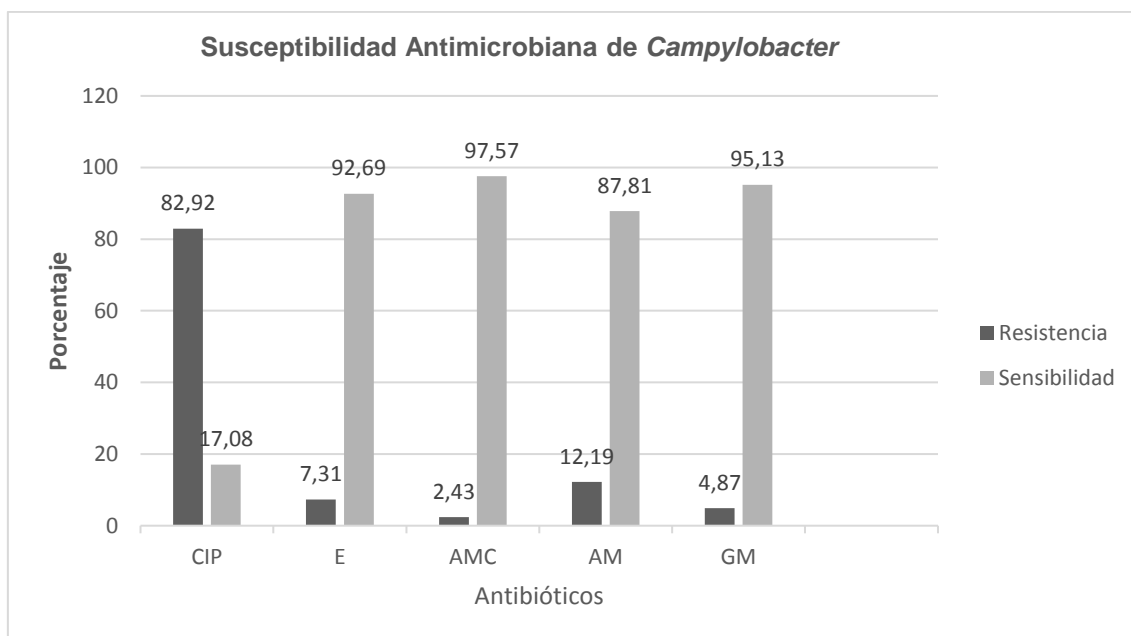


Gráfico 1: Susceptibilidad Antimicrobiana de *Campylobacter* frente a Ciprofloxacino, Eritromicina, Amoxicilina/Ácido Clavulánico, Ampicilina y Gentamicina
Fuente: El Autor.

Se observaron resistencia para ciprofloxacino de 82.92%, ampicilina y eritromicina 12.19% y 7.31%, gentamicina 4.87% y amoxicilina/ácido clavulánico 2.43%. Nuestro porcentaje de resistencia se relaciona con datos publicados en la ciudad de Loja en donde se registró 100% de resistencia para ciprofloxacino, en cuanto a los demás antibióticos no se reportó resistencia excepto ampicilina la cual se encontró 22% de resistencia, casi el doble a lo obtenido en nuestro estudio (Núñez, 2015). Estudios que se han realizado en muestras de hígados de pollo para el consumo humano mostró resistencia de 93.8% para ciprofloxacino, ampicilina 25%, eritromicina 12.5% superando la resistencia encontrada en nuestro estudio (Simaluiza, *et al* 2015).

A nivel Latinoamericano, en Argentina se presentan dos resultados que dependen del lugar de muestreo, las muestras de materia fecal de gallinas pertenecientes a establecimientos industriales mostraron resistencia del 100% para ciprofloxacino, mientras que en las que se recolectaron en gallinas de granjas avícolas familiares presentaron apenas un 38.9% de resistencia (Notario, *et al* 2011). Chile pionero en este tipo de investigaciones presenta una resistencia a ciprofloxacino de 58.2% y para eritromicina 1.8% (Gonzales, *et al* 2013).

Estudios realizados en Irlanda sobre susceptibilidad de *Campylobacter* se utilizó ciprofloxacino para comprobar la actividad antimicrobiana, el resultado fue una menor resistencia para ciprofloxacino con porcentaje de 17.9%, para ampicilina fue de 44.9%, muy por encima en comparación con nuestro dato, la resistencia de la eritromicina aproximadamente es similar con 10.25% (Fallon, *et al* 2003).

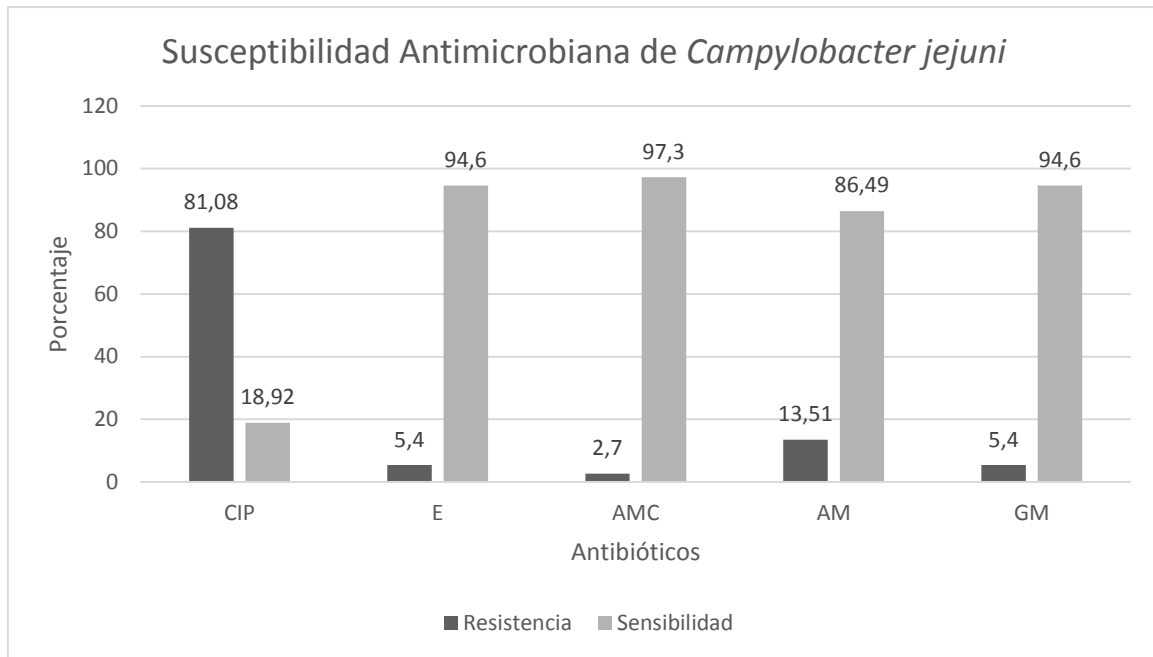


Gráfico 2: Susceptibilidad Antimicrobiana de *Campylobacter jejuni* frente a Ciprofloxacino, Eritromicina, Amoxicilina/Ácido Clavulánico, Ampicilina y Gentamicina
Fuente: El Autor.

En cuanto a la especie se obtuvo para *C. jejuni* resistencia de 81.08% para ciprofloxacino, eritromicina 5.40%, amoxicilina/ácido clavulánico 2.70%, para ampicilina 13.51% y 5.40% de resistencia para gentamicina (**Gráfico 2**). Nuestros resultados para *C. jejuni* se relacionan con los obtenidos en la ciudad de Loja con 90.9% de resistencia para ciprofloxacino, eritromicina 9.1%, ampicilina 27.3% (Simaluiza, *et al* 2015). Chile con 67.2% de resistencia para ciprofloxacino (Mata, 2013), 42.3% para ciprofloxacino y eritromicina 7.6% (Gatica, 2013), en Costa de Marfil 38.5% para ciprofloxacino, eritromicina 17.9% y gentamicina 7.7% de resistencia (Goualié, *et al* 2012). En Australia como en Grecia no se encontró resistencia para ciprofloxacino ni para eritromicina pero si para ampicilina con 17.6% (Miflin, *et al* 2007), y 50% (Marinou, *et al* 2012).

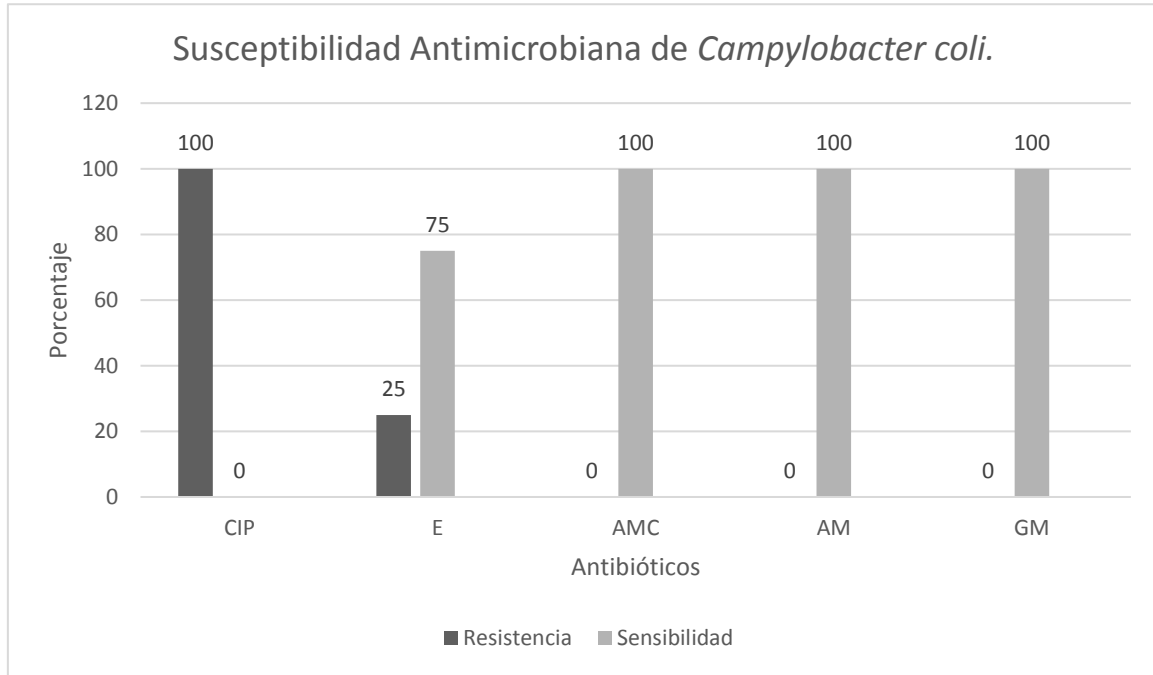


Gráfico 3: Susceptibilidad Antimicrobiana de *Campylobacter coli* frente a Ciprofloxacino, Eritromicina, Amoxicilina/Ácido Clavulánico, Ampicilina y Gentamicina
Fuente: El Autor.

En nuestro estudio *C. coli* presentó resistencia de 100% para ciprofloxacino y 25% para eritromicina (**Gráfico 3**), los cuales son similares a los encontrados en Loja con 100% de resistencia para ciprofloxacino y eritromicina 20% (Simaluiza, *et al* 2015). En Chile 100% de resistencia para ciprofloxacino (Mata, 2013), resultados menores de resistencia se encontraron en Costa de Marfil con 43.2% para ciprofloxacino y eritromicina 8.1% (Goualié, *et al* 2012). Chile con 42.8% para ciprofloxacino y eritromicina 7.1% (Gatica, 2013). Y el único resultado menor en comparación a los demás fue de 11.8% de resistencia para ciprofloxacino (Rivera, *et al* 2011).

En el año 2002 en Dinamarca decreció significativamente el uso de fluoroquinolonas en la producción de pollos, como resultado ese año no se aisló cepas de *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas (Gonzales, *et al* 2013). Para reducir la resistencia de *Campylobacter* se ha recomendado no utilizar éstos antimicrobianos en animales con fines profilácticos (Rivera, *et al* 2011).

Desde la década de los años 50 se observó que los antibióticos no solo tenían efectos terapéuticos sino que también actuaban como promotores de crecimiento en animales sanos (Rubio, *et al* 2014). Como resultado varias publicaciones han asociado el aumento de la resistencia de *Campylobacter* a fluoroquinolonas con la introducción de estos fármacos en la industria avícola (Gonzales, *et al* 2013). Otras formas de resistencia se generan por mutaciones puntuales en genes que determinan cambios en la ADN girasa, las bombas de

eflujo y por último la disminución de la permeabilidad de la membrana celular (Cordiés, *et al* 1998; Gonzales, *et al* 2013; Notario, *et al* 2011).

CONCLUSIONES

- De las 60 muestras analizadas el 68,33% (41/60) resultaron positivas para el género *Campylobacter*, 90,24% (37/41) corresponden a *C. jejuni* y el 9,75% (4/41) restante a *C. coli*.
- *Campylobacter* spp. es resistente a ciprofloxacino 82.92%, eritromicina 7.31%, amoxicilina/ácido clavulánico 2.43%, ampicilina 12.19% y para gentamicina 4.87%.
- *Campylobacter jejuni* es resistente para ciprofloxacino 81.08%, eritromicina 5.40%, amoxicilina/ácido clavulánico 2.70%, ampicilina 13.51% y gentamicina 5.40%.
- *Campylobacter coli* es resistente para ciprofloxacino 100% y eritromicina 25% y sensible 100% para amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina y gentamicina.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda ampliar con los estudios de susceptibilidad antimicrobiana para *Campylobacter* aisladas en aves de corral en diferentes puntos del país con la finalidad de obtener datos que ayuden a entender próximas investigaciones sobre el tema y poder facilitar el tratamiento adecuado a pacientes infectados.
- Establecer la prevalencia de *Campylobacter* en aves de corral y sus subproductos destinados al consumo humano para identificar los posibles reservorios y focos de infección.
- Incorporar el diagnóstico rutinario de *Campylobacter* en muestras fecales de humanos, animales mamíferos y aves de corral en diferentes establecimientos microbiológicos, como agente causal de enfermedades diarreicas.
- Comunicar a los establecimientos de crianza familiares como industriales sobre el abuso de antibióticos utilizados en el sector avícola, reducir al máximo el uso de antibióticos por su estrecha relación a la resistencia bacteriana.
- Facilitar información sobre medidas de sanidad durante la crianza de pollos y durante el proceso de evisceración ya que el nivel de contaminación de *Campylobacter* está relacionado con el nivel de saneamiento del lugar de crianza.

BIBLIOGRAFIA

AESAN: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. (2012). Informe del Comité Científico de la AESAN con relación a las medidas de control para reducir la presencia *Campylobacter* en carne fresca de aves. Revista del Comité Científico 16.

Ayala, A., Espinoza, F., Bendayán, M., Donayre, M., Fernández, H. (2006). La Fauna Silvestre de la Amazonía Peruana, un Potencial Reservorio de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* y *Campylobacter coli*. *Folia Amazónica*. 15: 117-122.

Ban, A. (2001). *Campylobacter jejuni* Infections: Update on Emerging Issues and Trends. Departments of Preventive Medicine and Medicine, Division of Infectious Diseases, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee. *FOOD SAFETY*. 32: 1201-1206

Bang, D., Pedersen, K., Madsen, M. (2001). Development of a PCR Assay Suitable for *Campylobacter* spp. Mass Screening Programs in Broiler Production. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. 9: 97-113.

Brooks, G., Carrol, K., Butel, J., Morse, S., Mietzner, T. (2011). Microbiología Médica. 25ª edición. Editorial McGrawHill. México.

Brouwer, R., Mertens, M., Siem, T., Katchaki, J. (1979). An explosive outbreak of *Campylobacter enteritis* in soldiers. 45: 517-519.

Cervantes, E., Cravioto, A. (2007). *Campylobacter* y enfermedades asociadas. *Rev Fac Med UNAM*. 50: 31-35.

Cevallos Almeida. (2008). *Campylobacter jejuni* problemática actual y situación en Ecuador. Recuperado el 1 de septiembre de 2014 del sitio web de *Sociedad Ecuatoriana de Microbiología*.

Cordiés, L., Machado, L., Hamilton, M. (1998). Quinolonas y terapia antimicrobiana. *Acta Médica*. 58-65.

Cosme Verónica. (2000). Antibióticos por familias. *Infecto*. Recuperado: <http://www.infecto.edu.uy/terapeutica/atbfa/macro/macrolidos.htm>

Costa Janaina. (2011). Mecanismos de Patogenicidad de *Campylobacter* spp. Isolados en Alimentos. Universidad de Goiás.

Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G., Colin, P. (1999). Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Letters in Applied Microbiology*. 29: 406–410

De Melo, M., Pechere, J. (1990). Identification of *Campylobacter jejuni* Surface Proteins that Bind to Eukaryotic Cells *in Vitro*. *Infection and immunity*. 58: 1749-1756.

Elika: Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. (2013). *Campylobacter*. Recuperado de: http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento83/2.Campylobacter.pdf

Escobar, Ingrid. (2009). Pesquisa de campylobacter spp. En muestras cloacales de gallinas de la comuna de Curepto. Universidad de Talca. Chile.

Evans, S., Sayers, A. (2000). A longitudinal study of campylobacter infection of broiler flocks in Great Britain. *Prevent. Vet. Med.* 46: 209–223.

Fallon, R., Osullivan, N., Maher, M., Carrol, C. (2003). Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*, isolates from broiler chicken isolated at an Irish poultry processing plant. *Letters in Applied Microbiology*. 36: 227-281.

Farace, 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*.

FAO and WHO: Food and Agriculture Organization of the United Nations or of the World Health Organization. (2009). *Salmonella and Campylobacter* in Chicken Meat.

Fernández, F., Esteve, M. (2012). Diarrea Crónica. Gastroenterología y Hepatología: Problemas comunes en la parte clínica. Recuperado de: https://www.aegastro.es/sites/default/files/archivos/ayudas-practicas/07_Diarrea_cronica.pdf

Fernández, H. (2011). *Campylobacter*: un género de bacterias zoonóticas de interés en salud pública. *Red Med Maule*. 28: 52-59.

Fernández, H. (2011). *Campylobacter* y Campylobacteriosis: Una mirada desde América del Sur. *Rev. Perú med exp. Salud pública*. 28: 121-127.

Fernández, A., García, C., Sáez, J., Valdezate, S. (2010). Métodos de Identificación Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.

Fernández, H. (2008). Género *Campylobacter*. Un Grupo de Bacterias de Importancia en Salud Pública. *Tema de zoonosis*. 4: 205-214.

Fernández, H., Vera, F., Villanueva, M. (2007). Especies de *Arcobacter* y *Campylobacter* en aves y mamíferos del sur de Chile. *Arch. Med. Vet.* 39.

Fernández, H., García, A., Villanueva, M. (2005). Serotipos de *Campylobacter jejuni* ssp. *Jejuni* aislado en carne de ave para consumo humano y en muestras de heces de niños con diarrea. *Arch. Med. Vet.* 39.

Fernández, H., Farace M. (2003). Manual de Procedimientos: Diagnóstico de *Campylobacter* en muestras clínicas y de alimentos. Instituto de microbiología clínica. Universidad Austral de Chile. *Global Salm-Surv*.

Fernández, H. (2000). *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en tres grupos de gallinas de diferente origen geográfico del sur de Chile. Instituto de Microbiología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile. *Revista Scielo*. 32.

Forbes, B., Sahm, D., Weissfeld, A., Trevino, E. (2007). Diagnóstico Microbiológico. 12ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid – España.

Galeano, N. (2007). Validación de la retención microbiana en los filtros de acetato y nitrato de celulosa empleados en la técnica de filtración por membrana para la prueba de esterilidad. *Universidad Javeriana. Bogotá – Colombia*.

García, P., Valenzuela, S., Rodríguez, M., León, E., Fernández H. (2009). Susceptibilidad antimicrobiana de *Campylobacter jejuni* aislado de coprocultivo en Santiago de Chile. *Revista Chilena de 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. *Universidad de Chile*.

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

González, J., Barreto, J., Rodríguez, M., Pino, P., Lima, N. (1998). Macrólidos. Acta Médica, Biblioteca Virtual de Salud de Cuba. 8: 71-74.

Gómez, J., García, E., Hernández, A. (2015). Los betalactámicos en la práctica clínica. Rev Esp Quimioter. 28: 1-9.

Goualié, B., Akpa, E., Kakou, E., Guessenn, N., Bakayoko, S., Niamké, L., Dosso, M. (2012). Prevalence and Antimicrobial Resistance of Thermophilic *Campylobacter* Isolated From Chicken in Cote d'Ivoire. *International Journal of Microbiology*.

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

Hernández, C., Aguilera, M., Castro, G. (2013). *Campylobacter jejuni*: ¿una bacteria olvidada? Situación en México. Enf Inf Microbiología. 77-84.

Hernández, F., Rodríguez, Z., Ferrer, I., Trufero, N. (2000). Enfermedades Diarreicas Agudas en el Niño: Comportamiento de Algunos Factores de Riesgo. Rev Cubana Med Gen Integr. 16: 129-33.

Instituto de Salud Pública de Chile. (2014). Vigilancia de laboratorio de *Campylobacter* spp. Chile. 1-17.

Jagannathan, A., Penn, C. (2005). Motility in *Campylobacter*. *Molecular and Cellular Biology. Horizon Bioscience*. 331-347

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

Lapierre, L. (2013). Factores de virulencia asociados a especies zoonóticas de *Campylobacter* spp. Avances en Ciencias Veterinarias. 28.

Levin, R. (2007). *Campylobacter jejuni*: A review of its Characteristics, Pathogenicity, Ecology, Distribution, Subspecies Characterization and Molecular Methods of Detection. *Food Biotechnology*. 21: 271-347.

Leyva, S., Leyva, E. (2008). Fluoroquinolonas. Mecanismo de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Sociedad Química de México*. 2: 1-13.

Linton, D., Owen, R., Stanley, J. (1996). Rapid Identification by PCR of the Genus *Campylobacter* and of Five *Campylobacter* Species Enteropathogenic for man and animals. Institut Pasteur/Elsevier. *Res. Microbiol.* 147: 707-718.

López, C., Agostini, A., Giacoboni, G., Cornero, F., Tellechea, D., Trinidad, J. (2003). Campylobacteriosis en una comunidad de bajos recursos de Buenos Aires, Argentina. *Rev. sci. Tech.* 22: 1013-1020

Machado, L., Cordiés, L., Hamilton, M. (1998). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Médica.* 13-27.

Marín, M., Gudiol, F. (2003). Antibióticos Betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 21: 42-55.

Marinou, I., Bersimis, S., Loannidis, A., Nicolaou, C., Mitroussia-Ziouva, A., Legakis, N., Chatzipanagiotou, S. (2012) Identification and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* Species Isolated From Animal Sources. *Frontiers in Microbiology.*

Martínez, K. (2008). Prevalencia de especies de *Campylobacter spp* en niños menores de 10 años con diarrea aguda en la ciudad de Talca. Universidad de Talca.

Miflin, J., Templeton, J., Blackall, P. (2007). Antibiotic Resistance in *Campylobacter coli* Isolated from Poultry in the South-East Queensland Region. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 59: 775-778.

Mills, S., Kurjanczyk, L., Pender, J. (1998). Identification of an antigen common to different species of the genus *Campylobacter*. *Journal Clinical Microbiology.* 26: 1411-1413.

Moore, J., Corcoran, D., Dooley, J., Fanning, S., Lucey, B., Matsuda, M., Mcdowell, D., Megraud, F., Millar, C., O'Mahony, R., O'Riordan, L., O'Rourke, M., Rao, J., Rooney, P., Sails, A., Whyte, P. (2005). *Campylobacter*. *Vet. Res.* 36: 352-382.

Nelson, J., Chiller, T., Powers, J., Angulo, F. (2007). Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter* Species and the Withdrawal of Fluoroquinolones from Use in Poultry: A Public Health Success Story. *Food Safety.* 44: 977-980.

Newell, D., Fearnley, C. (2003). Sources of *Campylobacter* Colonization in Broiler Chickens. *Applied and Environmental Microbiology.* 69: 4343-4351.

Notario R., Borda N., Gambandé T., Bermejo J., Ponessa A., Toledo V. (2011). Cepas de *Campylobacter jejuni* resistentes a quinolonas aisladas de humanos, gallinas y pollos. *Revista Scielo*. 71.

Núñez Andrea. (2015). Estudio de prevalencia de especies de *Campylobacter* (*C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. coli*) en animales de corral y perros en el sur de Ecuador. Universidad Técnica Particular de Loja.

OIE: Organización Mundial de Salud Animal. (2008). *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*. Manual de la OIE sobre animales terrestres.

OMS: Organización Mundial de la Salud. (2013). Enfermedades Diarreicas. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>

OMS: Organización Mundial de la Salud. (2011). *Campylobacter*. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/es/>

O' Ryan, M., Prado, V., Pickering, L. (2005). A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*. 16: 125-136

Palomino, J., Pachón, J. (2003). AminoglucoSIDOS. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 21:: 105-115.

Pérez Daza. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*. 22.

Portillo, A., Lantero, M., Zarazaga, M., Gastañares, M., Olarte, I., Undabeitia, E., Ruiz, F., Torres C. (2000). Resistencia a antibióticos macrólidos – lincosamidas – estreptograminas y mecanismos implicados en cepas clínicas de *Streptococcus spp*. En la Rioja. Zúbia monográfica. 12: 11-26.

Prats Guíllerm. (2012). Microbiología y Parasitología Médicas. Editorial Médica Panamericana. Madrid – España.

Rivera, N., Bustos, R., Montenegro, S., Sandoval, M., Castillo, J., Fernández, H., Maturana, M., Delgado, L., Contreras, A., Chávez, D., Quevedo, I. (2011). Genotipificación y resistencia antibacteriana de cepas de *Campylobacter spp* aisladas en niños y en aves de corral. *Rev Chil Infect*. 28: 555-562.

Rodríguez Mauricio. (2002). Aminoglucosidos. *Enf Infec y Micro*. 22: 20-30.

Román, E., Barrio, J., Lopez, M. (2010). Diarrea Aguda. Protocolos Diagnóstico – Terapéutico de Gastroenterología Hepatología y Nutrición Pediátrica. Asociación Española de Pediatría.

Rubio, E., Hurtado, L., Pérez, E., Alcántara, L. (2014). Resistencia a antibióticos de cepas bacterianas aisladas de animales destinados al consumo humano. *Revista Iberoamericana de Ciencias*.

Shreeve, J., Toszeghy, M., Pattison, M., Newell, D. (2000). Sequential Spread of *Campylobacter* Infection in a Multipen Broiler House. *Avian Diseases*. 44: 983-988.

Simaluiza, R., Toledo, Z., Ochoa, S., Fernández, H. (2015). The Prevalence and Antimicrobial Resistance oh *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Chiken Livers Used for Human Consumption in Ecuador. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 14: 6-9.

Skirrow, M. (1994). Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria. *Journal of Comparative Pathology*. 111: 113-149.

Snelling, W., Matsuda, M., Moore, J., Dooley, J. (2005). Under the microscope *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology*, 41: 297- 302.

Steinhauserova I., Ceskova J., Fojtikova K., Obrovskaa I. (2001). Identification of thermophilic *Campylobacter spp* by phenotypic and molecular methods. *Journal of Applied Microbiology*. 90: 470- 475.

Suárez, C., Gudiol, F. (2009). Antibióticos Betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 27: 116-129.

Surawicz, C., Ochoa, B. (2007). Enfermedades Diarreicas. *American College of Gastroenterology*. Recuperado de: <http://patients.gi.org/recursos-en-espanol/enfermedades-diarreicas/>

Teixeira, P., Silva, J., Leite, D., Fernández, M., Mena, C., Gibbs, P. (2011). *Campylobacter spp*: as a foodborne pathogen: a review. *Frontiers in Microbiology*. 2: 1-12.

Terzolo Horacio. (2010). *Campylobacterias* termofílicas, generalidades y su importancia en pollos parrilleros. 1-12.

Tresierra, A., Espinoza, F., Bendayán, M., Donayre, M., Fernandez, H. (2006). La fauna silvestre de la amazonía Peruana, un potencial reservorio de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* y *Campylobacter coli*. *Folia amazónica*. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana. 15: 1-2.

Tresierra A., Bendayan M., Bernuy A., Pereyra G., Espinoza F. (1995). *Campylobacter* Termotolerantes en Aves de Corral de la Ciudad de Iquitos. *Folia Amazónica*. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana. 7: 187-194.

Vandamme, P. (2000). Taxonomy of the Family Campylobacteraceae. *Campylobacter* (2da edición). Washington, DC, USA. ASM Pres spp. 3-26.

Vasco, G., Trueba, G., Atherton, R., Calvopiña, M., Cevallos, W., Andrade, T., Eguiguren, M., Eisenberg, J. (2014). Identifying Etiological Agents Causing Diarrhea in Low Income Ecuadorian Communities. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 91: 563-569.

Vliet, V., Ketley, J. (2001). Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *Journal of Applied Microbiology*. 90: 45S–56S.

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

ANEXOS

PROTOCOLOS

Anexo 1: Preparación del medio de cultivo Butzler (volumen total 500 ml)

1. Pesar 12.5 gr de caldo Nutriente N° 2, 5 gr de extracto de levadura y 8 gr de agar agar y colocar todo dentro de un frasco estéril
2. Adicionar 470 ml de agua destilada
3. Ajustar a PH 6.9
4. Esterilizar en autoclave por calor húmedo a 121 C y una atmosfera de presión
5. Preparar el antibiótico *Campylobacter* Selective Supplement Butzler adicionando 5ml de agua estéril para inyección y homogenizar
6. Adicionar el contenido del vial al medio de cultivo cuando éste se encuentre a 50 C y agitar
7. Agregar 25 ml de sangre al medio de cultivo a homogenizar
8. Dispensar en cajas Petri pequeñas y esperar que el medio se solidifique, guardar a -4°C

Anexo 2: Preparación de Medio TEC (volumen final 250ml)

1. Pesar 6.2 g de caldo Nutriente N° 2, 2.5 g de extracto de levadura y 0.3 gr de agar agar y colocar todo dentro de un frasco estéril
2. Adicionar 240 ml de agua destilada
3. Ajustar a PH 6.9
4. Esterilizar en autoclave por calor húmedo a 121 C° y una atmosfera de presión por 20 minutos
5. Preparar el antibiótico *Campylobacter* Selective Supplement Butzler adicionando 5ml de agua estéril para inyección y homogenizar
6. Adicionar 2.5 ml del contenido del vial al medio de cultivo cuando éste se encuentre a 50° C y agitar
7. Agregar 7.5 ml de sangre al medio y homogenizar
8. Dispensar en tubos estériles y guardar a -4°C

Anexo 3: Aislamiento de *Campylobacter spp*

1. Inocular la muestra en un extremo de la caja Petri con el medio de cultivo Butzler.
2. Estriar la muestra por el método de agotamiento.
3. Incubar las cajas invirtiéndolas en jarras que contiene sobres de anaerobiosis por un periodo de 48 horas a 42° C.
4. Transcurrido las 48 horas realizar tinción de Hucker a las colonias sospechosas.

Anexo 4: 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 de violeta cristal 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 con el lente de 100X.

Anexo 5: Método de Filtración en Membrana de Nitrocelulosa de 0.45 µm

1. Tomar de dos a tres asadas de las colonias de *Campylobacter* spp, colocarlas en 250 µl de solución salina y dar vortex.
2. Colocar el filtro de membrana de nitrocelulosa sobre las placas de medio selectivo Butzler.
3. Colocar los 200 µl de la disolución sobre el 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° C durante 48 horas.
6. Verificar la pureza de las cepas mediante una tinción de Hucker.

Anexo 6: Identificación Bioquímica, 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 del hipurato y dar vortex.
3. Incubar en baño María a 37°C por un periodo de dos horas.
4. Agregar 200 µl de solución ninhidrina y reposar 10 minutos más en el baño María.
5. Lectura de resultados: **Positivos:** Coloración azul – violeta intenso, **Negativo:** Coloración azul tenue o ausencia de color.

Anexo 7: Extracción de DNA de Células Cultivadas

Materiales y equipos:

- Microcentrifuga de 13000 x g
- Tubos de 1,5 mL para microcentrifuga.
- Baño María, bloque de calor o incubadora a 80 °C y 37°C.
- Isopropanol
- Etanol al 70%.
- Baño María, bloque de calor o incubadora a 65°C (opcional).

PROCEDIMIENTO:

1. Añadir 1 ml de un cultivo de una noche a un tubo de 1,5 ml de microcentrífuga.
2. Centrifugar a 13,000-16,000 × g durante 2 minutos para sedimentar las células. Eliminar el sobrenadante.
3. Añadir 600µl de Nuclei Lysis Solution. pipetear suavemente hasta que se vuelven a suspender las células.
4. Incubar a 80 ° C durante 5 minutos para lisar las células; a continuación, enfriar a temperatura ambiente.
5. Añadir 3µl de RNase Solution al lisado celular. Invierta el tubo 2-5 veces para mezclar.
6. Incubar a 37 ° C durante 15-60 minutos. Enfriar la muestra a temperatura ambiente.
7. Agregar 200µl de Protein Precipitation Solution al lisado celular tratado con RNasa.
8. Dar Vortex vigorosamente a alta velocidad durante 20 segundos para mezclar la Protein Precipitation Solution con el lisado celular.
9. Incubar la muestra en hielo durante 5 minutos.
10. Centrifugar a 13,000-16,000 × g durante 3 minutos.
11. Transferir el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo de 1,5 ml de microcentrífuga limpio que contenga 600µl de isopropanol a temperatura ambiente.
Nota: Algunos sobrenadante puede permanecer en el tubo original que contiene los pellets de proteína. Dejar este líquido residual en el tubo para evitar la contaminación de la solución de ADN con la proteína precipitada.
12. Mezclar suavemente por inversión hasta que las hebras de hilo de ADN formen una masa visible.
13. Centrifugar a 13,000-16,000 × g durante 2 minutos.

14. Vierta cuidadosamente el sobrenadante y drene el tubo sobre papel absorbente limpio. Añadir 600µl de etanol al 70% a temperatura ambiente y suavemente invierta el tubo varias veces para lavar el sedimento de ADN.
15. Centrifugar a 13,000-16,000 × g durante 2 minutos. Y aspirar cuidadosamente el etanol.
16. Drene el tubo sobre papel absorbente limpio y deje que el precipitado se seque al aire durante 10-15 minutos.
17. Añadir 100 µl de solución de rehidratación de ADN en el tubo y rehidratar el ADN mediante incubación a 65 ° C durante 1 hora. Periódicamente mezclar la solución golpeando suavemente el tubo. Alternativamente, rehidratar el ADN mediante la incubación de la solución durante la noche a temperatura ambiente o a 4 ° C.
18. Almacenar el ADN a 2-8 ° C.

PCR – MULTIPLEX

COMPONENTES	10X(ul)	
	1X (ul)	10
BUFFER	5,00	50,00
dNTPs	0,50	5,00
Cl2Mg	1,50	15,00
Primers:		
C412F	0,05	0,50
C1228R	0,05	0,50
C-1	0,05	0,50
C-3	0,05	0,50
CC18F	0,05	0,50
CC519R	0,05	0,50
CU61F	0,05	0,50
CU146R	0,05	0,50
MG3F	0,05	0,50
CF359R	0,05	0,50
CLF	0,05	0,50
CLR	0,05	0,50
HYO1F	0,05	0,50
HYOFET235R	0,05	0,50
TAQ	0,125	1,25
H2O	16,17	161,7
DNA	1,00	
	25,00	240,0
VOLUMEN FINAL		250,0

Condiciones del termociclador

Condiciones:	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	N° ciclos
Desnaturalización inicial	94	2	1
Desnaturalización	94	0,4	
Anillamiento	54	1,4	30
Extensión	72	1	
Extensión final	72	5	1

ANEXO 8: Electroforesis en Gel de Agarosa al 1.5%

Para preparación de un gel de 35 ml

- 1.** Pesar 0.525 g de Agarosa UltraPure™ de Invitrogen y colocar en un vaso de precipitación de 50 ml.
- 2.** Adicionar en una probeta 3,5 ml de buffer TBE 10X y 11.6 ml de gel red y aforar a 35 ml.
- 3.** Adicionar la solución anterior al vaso que contiene la Agarosa.
- 4.** Disolver por calentamiento la solución evitando llegar a la temperatura de ebullición para no perder producto con la evaporación.
- 5.** Verter la solución en la bandeja para electroforesis.
- 6.** Colocar la peineta para la formación de los 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.
- 9.** Llenar la cubeta con el buffer TBE 1X hasta cubrir completamente el gel.
- 10.** Adicionar 1 µl del marcador de peso molecular y 2 µl de los productos de PCR Multiplex (controles y muestras).
- 11.** Tapar la cubeta conectando a la fuente de poder Enduro™ marca Labnet.
- 12.** Programar la corrida por 45 minutos a 120 volt y 300 mA.
- 13.** Revelar el gel mediante luz UV a 300 nm en el Transluminador UV Labnet.

Anexo 9: Determinación de la Actividad Antimicrobiana

1. Colocar una asada del cultivo puro en 1 ml de solución fisiológica hasta tener una turbidez de 0.5 en la escala de McFarlan y dar vortex.
2. Sembrar mediante la técnica de hisopado continuo en medio de cultivo Mueller Hinton enriquecido con 5% de sangre a un ph de 7.
3. Colocar los discos de antibióticos con una distancia de 2 cm de distancia de cada uno e incubar de forma invertida a 42° C por 48 horas en atmósfera de microaerofilia.

Anexo 10: Crioconservación de Muestras

1. Tomar con un hisopo estéril las colonias puras de un cultivo fresco.
2. Inocular asépticamente el hisopo dentro del criotubo CRIOBANK™
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