



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA Y BIOQUÍMICA**

**TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Especies de *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas  
aisladas en niños con y sin diarrea en el Hospital Isidro Ayora de  
la provincia de Loja, durante el periodo abril-junio de 2016.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**AUTOR: Juan Sebastián Villavicencio Jaramillo**

**DIRECTOR: Toledo Barrigas, Zorayda Patricia, Mgtr.**

**LOJA- ECUADOR**

**2017**



*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, 2017*

## APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magíster.

Zorayda Patricia Toledo Barrigas

**DONCENTE DE LA TITULACIÓN**

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación **“Especies de Campylobacter resistentes a fluoroquinolonas aisladas en niños con y sin diarrea en el Hospital Isidro Ayora de la provincia de Loja, durante el periodo abril-junio de 2016.”**Realizado por Villavicencio Jaramillo Juan Sebastián, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, febrero de 2017

f).....

Mgtr. Zorayda Patricia Toledo Barrigas

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo Juan Sebastián Villavicencio Jaramillo declaro ser autora del presente trabajo de titulación: **Especies de Campylobacter resistentes a fluoroquinolonas aisladas en niños con y sin diarrea en el Hospital Isidro Ayora de la provincia de Loja, durante el periodo abril-junio de 2016**, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo 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.

f. ....  
Autor: Juan Sebastián Villavicencio Jaramillo  
Cédula: 1104700677

## **DEDICATORIA**

A mis padres quienes siempre me han apoyado y me han enseñado a valorar todo lo que Dios nos ha regalado.

A todas las personas que me ayudaron en este proyecto, amigos, docentes, novia y compañeros quienes me han inspirado a seguir adelante.

## **AGRADECIMIENTO**

Principalmente a Dios quien me concedió alcanzar esta meta, por sus bendiciones diarias, la salud y fortaleza que me permitió seguir adelante.

A mi familia principalmente a mis padres por su constante apoyo y preocupación sin ellos no podría haber conseguido este objetivo.

Al Dr. Heriberto Fernández, Mgtr. Zorayda Toledo y Mgtr. Janeth Simaluiza por permitirme ser parte de este proyecto, por su constante apoyo y guía que me ayudó a conseguir esta meta.

A mis compañeros de investigación Eduardo Ordoñez, Alexis Chamba, Erika Obaco, David Crespo y Cristian Cabrera por su apoyo tanto dentro como fuera del laboratorio.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN .....	¡Error! Marcador no definido.
DECLARATORIA DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS .....	¡Error! Marcador no definido.
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTO .....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
MARCO TEORICO .....	3
1.1 Antecedentes .....	4
1.2 Campylobacteraceae .....	4
1.3 Genero <i>Campylobacter</i> .....	5
1.4 Taxonomía .....	5
1.4.1 <i>Campylobacter jejuni</i> .....	6
1.4.2 <i>Campylobacter coli</i> .....	6
1.5 Epidemiología.....	7
1.5.1 Incidencia.....	8
1.6 Patogenia.....	8
1.6.1 Adherencia e invasión.....	9
1.6.2 Toxinas.....	10
1.7 Tratamiento y resistencia antimicrobiana.....	11
1.8 Mecanismos de acción y resistencia a Quinolonas y fluoroquinolonas .....	12
CAPÍTULO 2.....	14
METODOLOGÍA.....	14
2.1 Obtención de la muestra .....	15
2.2 Procesamiento de las muestras.....	15
2.2.1 Siembra e incubación.....	15
2.2.2 Aislamiento y purificación.....	15
2.3 Identificación .....	16

2.3.1 identificación bioquímica .....	16
2.3.1.1 hidrolisis de hipurato .....	16
2.3.2 Identificación molecular.....	17
2.3.2.1 PCR-multiplex .....	17
2.4 Susceptibilidad bacteriana .....	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	20
CONCLUSIONES .....	25
RECOMENDACIONES.....	26
BIBLIOGRAFÍA .....	27
ANEXOS.....	30
ANEXO 2: AISLAMIENTO DE <i>CAMPYLOBACTER</i> SPP.....	32
ANEXO 3: TINCIÓN DE HUCKER PARA IDENTIFICACIÓN <i>CAMPYLOBACTER</i> SPP.....	33
ANEXO 4: METODO DE AISLAMIENTO POR FILTRACIÓN .....	34
ANEXO 5: PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA IDENTIFICACIÓN DE <i>CAMPYLOBACTER</i> SPP.....	35
ANEXO 6: PROTOCOLO PARA EXTRACCIÓN DE ADN.....	36
ANEXO 7: PCR- MULTIPLEX.....	38
ANEXO 8: PREPARACIÓN DE GEL DE AGAROSA (35ML) .....	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: CEPA DE <i>CAMPYLOBACTER</i> SPP.....	16
FIGURA 2: HIPURATO POSITIVO (IZQUIERDA), HIPURATO NEGATIVO (DERECHA).....	16
FIGURA 3: PCR-MULTIPLEX.....	17
FIGURA 4: ANTIBIOGRAMA DE CEPA DE <i>CAMPYLOBACTER</i> SPP.....	18
FIGURA 5: : PORCENTAJES DE RESISTENCIA/SENSIBILIDAD A 6 ANTIBIÓTICOS EN CEPAS <i>CAMPYLOBACTER</i> SPP. AISLADAS EN EL HOSPITAL REGIONAL ISIDRO AYORA DURANTE EL PERIODO ABRIL-JUNIO 2016.....	22
FIGURA 6: CEPA DE <i>CAMPYLOBACTER</i> SPP. EN MEDIO BUTZLER.....	31
FIGURA 7: <i>CAMPYLOBACTER</i> SPP. TEÑIDO CON HUCKER.....	33
FIGURA 8: RESULTADO POSITIVO DE UNA FILTRACIÓN.....	34

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: SECUENCIAS DE PRIMERS USADOS EN PCR-MULTIPLEX.....	18
TABLA 2: PUNTOS DE SENSIBILIDAD Y RESISTENCIA DE <i>CAMPYLOBACTER</i> SPP. ....	19
TABLA 3: PORCENTAJE DE AISLAMIENTO DE <i>CAMPYLOBACTER</i> SPP. Y ESPECIES EN EL HOSPITAL REGIONAL ISIDRO AYORA DURANTE EL PERÍODO ABRIL-JUNIO 2016.....	20
TABLA 4: CANTIDADES DE COMPONENTES PARA PCR-MULTIPLEX. ....	38
TABLA 5: CONDICIONES PARA REALIZAR PCR-MULTIPLEX.....	38

## RESUMEN

*Campylobacter* spp. uno de los principales patógenos causantes de gastroenteritis en países en desarrollo y subdesarrollados está presentando resistencia frente al principal grupo de antibióticos usado para combatirlo, las fluoroquinolonas, lo cual es aún más alarmante. El propósito del estudio fue determinar el porcentaje de resistencia del género *Campylobacter* para así dar información útil sobre el tratamiento y manejo de infección.

Se recolectó muestras fecales de pacientes entre 0-12 años en el Hospital Regional Isidro Ayora de la provincia de Loja, se encontró un 7.60%(7/92) de prevalencia. Al identificar las especies aisladas, *C. jejuni* presentó el 71.43%(5) y *C. coli* el 28.57%(2).

Al analizar la actividad antimicrobiana obtuvimos un 86% de resistencia a ciprofloxacina y una alta susceptibilidad para los demás antibióticos con un total de 100% para amoxicilina/ ácido clavulánico y gentamicina; un 14% de resistencia para ampicilina y eritromicina.

**Palabras claves:** *Campylobacter*, fluoroquinolonas, resistencia, susceptibilidad.

## ABSTRACT

*Campylobacter* spp. One of the main pathogens causing gastroenteritis in developed and developing countries is showing resistance to the main group of antibiotics used to combat it, fluoroquinolones, which is even more alarming. In this study we investigated the percentage of resistance of the genus *Campylobacter* to give useful information on the treatment and management of infection.

Fecal samples were collected from patients aged 0-12 years at the Isidro Ayora Regional Hospital in the province of Loja. A prevalence of 7.60% (7/92) was found. Identifying the isolated species, *C. jejuni* presented 71.43% (5) and *C. coli* 28.57% (2).

Analyzing the antimicrobial activity we obtained a 86% resistance to ciprofloxacin and a high susceptibility for the other antibiotics with a total of 100% for amoxicillin / clavulanic acid and gentamicin; 14% resistance for ampicillin and erythromycin.

**Key words:** *Campylobacter*, fluoroquinolones, resistance, susceptibility

## INTRODUCCIÓN

Campylobacteriosis es una zoonosis, es decir una enfermedad transmitida al ser humano por los animales o por productos de origen animal. La mayor parte de las veces, los animales muertos o la carne quedan contaminados por las heces durante el sacrificio (OMS, 2016). Son muchas especies del genero las causantes de las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) pero se destaca *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, bacteria que se considera el primer factor etiológico culpable de diarreas infecciosas en países en desarrollo. *Campylobacter* es un bacilo Gram negativo, microaerófilo y termoresistente, actúa sobre la mucosa y las células epiteliales tanto del intestino delgado como grueso, este germen no contiene fimbrias pero se ha descubierto que usa su flagelo y lipopolisacáridos (LPS) como adhesinas y se instala en el mucus y células epiteliales para proliferar. Esta bacteria va a provocar ulceraciones en el intestino acompañado de diarreas acuosas sanguinolentas.

Se ha expuesto la frecuencia de aislamientos de *C. jejuni* y *C. coli*. en países de Latinoamérica teniendo un mayor porcentaje Argentina, Ecuador y Perú. En este estudio Fernández también determina el comportamiento de *Campylobacter* a diferentes antimicrobianos y ha puesto en evidencia la aparición de cepas de origen humano y animal, resistentes a eritromicina, tetraciclina, ampicilina y a quinolonas, encontrándose que la resistencia a estas últimas ha ido incrementando, alcanzando tasas superiores al 60% (Fernández 2012).

La determinación de la susceptibilidad *in vitro* de *Campylobacter* spp., es de gran importancia para determinar un tratamiento que sirva a pacientes que presenten infección en etapas muy desarrolladas. En la actualidad, macrólidos y fluoroquinolonas son los antimicrobianos de primera y segunda elección para el tratamiento de la campylobacteriosis (Gonzales 2013). En Argentina, Japón y en países de Europa se ha determinado un porcentaje de resistencia a fluoroquinolonas superior al 60% y se

creo que esto se debe al uso de estos fármacos en la producción animal destinada al consumo humano.

La resistencia a estos antibióticos ya es un problema mundial por lo que el fin del estudio es proporcionar datos relevantes de esta resistencia a flouroquinolonas por parte de *Campylobacter* spp. en la ciudad de Loja y demostrar con los datos obtenidos la importancia de controlar el uso indiscriminado de antibióticos para tratar infecciones.

**CAPÍTULO I.**  
**MARCO TEORICO**

## 1.1 Antecedentes

*Campylobacter* en 1913 fue descrito morfológicamente como *Vibrio* por Mc Faydean y Stockman que aislaron la bacteria de abortos en ganado vacuno y ovino. En 1919 Smith y Taylor lo nombraron *Vibrio fetus*. En 1931 Jones y otros aislaron *Vibrio* de ganado vacuno con problemas intestinales y lo denominaron *Vibrio jejuni*. Doyle en 1944 aisló la bacteria en cerdos con disentería y lo llamo *Vibrio coli*.

En 1947 Vinzent informa el primera caso de infección en el hombre donde produjo en una mujer embarazada septicemia y aborto. Elizabeth King por primera vez aisló *Vibrio* en heces de hombres y determinó una similitud con el *Vibrio* reportado por Vinzent pero antigénicamente diferentes.

En 1959 y 1960 Florent clasificó a *Vibrio fetus* dentro de dos subespecies; *Vibrio fetus ssp venerealis*, responsable de abortos y esterilidad en ganado, H<sub>2</sub>S negativo y *Vibrio fetus ssp intestinalis* causante de abortos esporádicos en ganado vacuno y ovino.

En 1963 Sebald y Veron demuestran diferencias importantes en la concentración de guanina y citosina en el DNA entre *V. fetus* y los verdaderos *Vibrios* como *V. cholerae* lo que llevo a la proposición de un nuevo género *Campylobacter* (del griego campy curva, bacter bastón) (Echeverri L. 1982).

En 1973 Butzler y colaboradores cultivaron el microorganismo usando el método de filtración a partir de heces de niños. En 1977 Skirrow incorporó antimicrobianos para generar medios de cultivos selectivos lo que frenó el crecimiento de la flora intestinal y logró porcentajes más altos de aislamientos (Carmona, F. 1985).

## 1.2 Campylobacteraceae

La Familia Campylobacteraceae comprende los géneros *Campylobacter* y *Arcobacter*, los cuales agrupan bacilos Gram negativos curvos, de carácter zoonótico, con amplia distribución en la naturaleza, reconociendo como reservorio natural a una gran variedad de aves y mamíferos (Vadamme 2000).

### **1.3 Genero *Campylobacter***

*Campylobacter* es una bacteria Gram negativo, delgada de 0.2 a 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y 0.5 hasta 0.8  $\mu\text{m}$  de largo, es curvo generalmente con forma de S, su movimiento es tipo dardo por que presenta un flagelo en cada extremo. La mayoría de especies son microaerófilos con un requerimiento de 3 al 5 % de oxígeno, son asacarolíticos y obtienen su energía de aminoácidos o ácidos tricarbónicos aunque la especie *C. lari* es ureasa positiva. Su velocidad de desarrollo es más lenta que la de las bacterias de la flora normal entérica, por lo que para su aislamiento a partir de materias fecales se requieren medios de cultivo selectivos que inhiban esta flora. *C. jejuni* es la especie con más prevalencia en los humanos y puede causar gastroenteritis, proctitis, septicemia, meningitis, abortos y enfermedades autoinmunes como artritis de Reiter y el síndrome de Guillain-Barré. De este grupo, *Campylobacter jejuni* (subespecie *jejuni*) es agente causal de diarreas, considerado el más virulento por su mayor resistencia a la fagocitosis; luego le sigue *Campylobacter coli*, pero se considera que la diarrea que produce es más benigna. Ambos se encuentran como comensales en el tracto gastrointestinal de un amplio grupo de animales como: vacas, ovejas, cerdos, cabras, perros, gatos, roedores silvestres y domésticos y principalmente en todas las variedades de aves de corral, a las cuales se ha adaptado perfectamente, la dosis infectante es baja, bastan 1000 microorganismos para causar la enfermedad, lo cual evidencia su capacidad de producir epidemias (Malbrán C. 2001). *Campylobacter* se manifiesta generalmente con gastroenteritis y tiene mayor incidencia en individuos inmunodeficientes a diferencia de personas sanas en la que su aislamiento es muy raro (Ketley J. et al 2005).

### **1.4 Taxonomía**

Las primeras especies de este género fueron identificadas hace más de 90 años en animales, pero no fue sino hasta 1970 cuando se reconoció como patógeno humano. Inicialmente incluidos dentro del género *Vibrio*, en 1963 se encontró que presentaban

notorias diferencias bioquímicas y serológicas con el agente del cólera y otros *vibrios* halofílicos, constituyéndose entonces el género *Campylobacter*. Entre las especies más importantes están *C. fetus*, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. laridis* y *C. upsaliensis*.

#### **1.4.1 *Campylobacter jejuni***

Especie termófila (termotolerantes) y prefieren crecer a temperaturas de 42 y 43°C. *C. jejuni* es un agente infeccioso más frecuente en humanos, esta bacteria era conocida como *V. fetus* y era relacionada con la familia *Vibrios* hasta que Butzler pudo en 1977 identificarla en gallinas con enteritis, luego se estableció que *C. jejuni* es una causa frecuente de diarrea en humanos particularmente en pacientes pediátricos (Penner 1988).

A pesar de que las pruebas bioquímicas no tienen mucho impacto en la taxonomía la hidrólisis de hipurato tuvo mucha acogida ya que diferencia a *C. jejuni* de *C. coli* siendo el primero positivo, las enzimas hipuricasa hidrolizan el hipurato para producir ácido benzoico y glicerina, esta glicerina es detectada mediante la prueba de la ninhidrina.

#### **1.4.2 *Campylobacter coli***

*C. coli* es la segunda especie más frecuente en humanos, presenta características similares a *C. jejuni* al momento de ser cultivadas, es microaerófilo y termotolerante. Reconocido por ser agente causante de diarreas en un 5-10% de los casos de Campylobacteriosis.

En Sudamérica *C. coli* ha sido aislado con más frecuencia representando un 25% en las diarreas causadas por el género, en esta región ha sido aislado a partir de agua de río, hígado de pollos para el consumo humano y está presente en animales tanto domésticos como silvestres. Se cree que este alto porcentaje de *C. coli* es mayor en América Latina debido a la vinculación entre el medio ambiente y el consumo de alimentos (Fernández H. 2011).

## 1.5 Epidemiología

La infección por *Campylobacter* es una zoonosis de distribución mundial, esta tiene un amplio reservorio y se encuentra como comensal en el tracto gastrointestinal de animales tanto salvajes como domésticos. Sus principales reservorios son el ganado bovino, ovino y suino, roedores, todas las aves de corral, perros y gatos. En estos animales *C. jejuni* está ampliamente distribuido en comparación a *C. coli* que es más frecuentemente aislado en suinos.

La adquisición de *Campylobacter* en animales se da a temprana edad y es causante de morbilidad y puede llevar al animal a ser un portador de por vida, el que los animales sean el mayor reservorio los convierte en una causa importante de infecciones en humanos. La vía más frecuente por la que se adquiere esta bacteria es el consumo de carnes de animales infectados y también la leche no pasteurizada es un vehículo de *Campylobacter*. La patología también se puede conseguir al contacto con animales infectados y en sus productos derivados. En países desarrollados el consumo de carne de aves de corral mal cocida es responsable del 50-70% de infecciones esporádicas.

Otro reservorio es el agua contaminada que puede ser una fuente de brotes de *Campylobacter* principalmente por el consumo de esta y en condiciones favorables se podría generar la replicación de la bacteria. La contaminación fecal del suelo puede también ocasionar infección, especialmente por el consumo de vegetales contaminados. La campylobacteriosis en países en desarrollo se produce más por estos reservorios ambientales mientras que en países desarrollados se da por el consumo de carnes contaminadas (OMS).

García P. *et al* (2009) nos dice que en Chile no se realiza vigilancia epidemiológica de resistencia antimicrobiana y subvaloran la importancia epidemiológica de *Campylobacter* por lo que no efectúan su búsqueda. Como la resistencia a quinolonas es evidente la Organización Mundial de la Salud no recomienda tratar de forma empírica la campilobacteriosis sin previas pruebas de susceptibilidad *in vitro*.

Prieto J. 2012 también nos menciona la importancia de monitorear y vigilar la resistencia antimicrobiana en patógenos entéricos ya que por medio de esto se puede proporcionar información sobre tendencias, posibles estrategias de intervención y sobre la eficacia de las medidas tomadas, y a los clínicos datos que permitan seleccionar pautas de tratamiento adecuadas.

### **1.5.1 Incidencia.**

*C. jejuni* y en una menor extensión *C. coli* son las mayores causas de enfermedades diarreicas. La incidencia de *Campylobacter* varía dependiendo de muchos factores como la estacionalidad, la edad, el método de muestreo, el régimen de alimentación de los animales y la geografía. En países en vías de desarrollo la enfermedad parece ser más frecuente en niños de corta edad. *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* son causas importantes de diarreas agudas en viajeros que visitan zonas en vías de desarrollo. No soportan durante mucho tiempo situaciones de desecación o congelamiento, característica que limita su transmisión. Sobreviven en la leche, otros alimentos o el agua a 4°C durante una semana. La desinfección con cloro y la pasteurización destruye al microorganismo (Malbrán C. 2001).

### **1.6 Patogenia.**

La infección se adquiere por vía oral proveniente de alimentos, bebidas o del contacto con animales infectados o productos animales (Brooks et al. 2014). El principal mecanismo de patogenidad es la invasión de la mucosa intestinal, en forma similar a como lo hace *Shigella*. La invasión de la lámina propia se observa tanto a nivel del intestino delgado como del colon, y el resultado es generalmente una enterocolitis inespecífica, que puede incluir los siguientes hallazgos: degeneración y atrofia glandular, pérdida de la producción de mucus, abscesos de las criptas, y ulceración de la mucosa epitelial. Se necesita ingerir un inóculo de  $10^4$  para que se dé la infección, el periodo de incubación es de 1 a 7 días dependiendo del estado inmunológico del paciente. *Campylobacter* puede atravesar la mucosa intestinal y proliferar en la lámina

propia como en los ganglios aunque la acción del suero impide las bacteriemias en la mayoría de los casos, las toxinas termolábiles que producen son similares a la de *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* enterotoxigénica que son las culpables de la diarrea secretora (Malbrán C. 2001).

La motilidad de *Campylobacter* es proporcionada por un flagelo polar compuesto de flagelina glicosilada, que es pieza clave en la aproximación y adherencia a las células del epitelio intestinal. Se ha encontrado en la bacteria un sistema de traducción de señales por el cual la bacteria tiene la capacidad de detectar estímulos ambientales y responder a ellos. Las especies móviles de *Campylobacter* lo hacen por medio de la rotación flagelar (Klotz B. *et al* 2012).

La habilidad de las bacterias patógenas para adquirir el hierro dentro del huésped es una condición importante para el establecimiento de la infección. En el metabolismo bacteriano participan varias proteínas, que para su correcto funcionamiento deben incorporar sulfuro de hierro. Dichas proteínas están involucradas en procesos como transporte de electrones, respiración anaerobia, metabolismo de aminoácidos, entre otras.

Algunos compuestos que contienen hierro y que soportan el crecimiento de *C. jejuni* son la hemoglobina, el hierro en los estados férrico y ferroso. Este último es un transportador importante para la virulencia bacteriana y puede estar relacionado con la resistencia de la bacteria a bajas tensiones de oxígeno y la variabilidad del pH que se da cuando la bacteria pasa del estómago al intestino (Klotz B. *et al* 2012).

### **1.6.1 Adherencia e invasión.**

*Campylobacter* spp. es un patógeno que afecta al hombre produciendo diarreas y enfermedades como artritis reactivas, septicemias, meningitis y Síndrome de Guillain-Barré. El flagelo tiene un papel fundamental que es alcanzar el tracto intestinal para luego trasladarse al colon y la supervivencia en diferentes nichos ecológicos en el tracto

gastrointestinal. Se cree que el patógeno logra llegar al trato gastrointestinal por su capacidad de resistir al ácido gástrico y a las sales biliares (Lapierre, L. 2013).

Uno de los aspectos más importantes de la virulencia de *Campylobacter* es su capacidad para adherirse a las células del epitelio intestinal. Se ha demostrado que existe interacción entre la severidad de los síntomas de individuos infectados, y el grado de adherencia de diferentes aislados de *C. jejuni* en cultivos celulares. Entre los factores de adhesión tenemos las proteínas CadF (proteína de membrana externa con capacidad de unión a fibronectina) esta es expresada por todas las especies de *C. jejuni* y *C. coli* y está involucrada en la adhesión celular uniéndose a la fibronectina, CapA (proteína autotransportadora de *Campylobacter*), PEB1 (proteína periplásmica de unión) y JlpA (lipoproteína de superficie) (Klotz B. *et al* 2012).

En *C. jejuni* las CadF tiene una secuencia de inserción de 39 pb lo que la diferencia de *C. coli* y la hace más eficiente al momento de invadir células epiteliales. Esta proteína presenta un doble rol, primero, la adhesión tipo “tiggers” a la célula hospedadora uniéndose a la fibronectina y segundo la producción de señales para la adhesión tipo tiggers que conducen a la activación de pequeñas GTPasas Rac1 y Cdc42 y que indican a la propia internalización de la bacteria en la célula hospedadora (Lapierre, L. 2013).

### **1.6.2 Toxinas.**

La toxina Distensión-Ciclo-Letal (CDT) fue la primera toxina que se describió altera el ciclo celular a nivel de la transición G2/M. Ésta es producida por un número amplio de patógenos que incluye: *Shigella dysenteriae*, *E. coli*, *Campylobacter* spp., *S. entérica*, *S. typhi*, *Haemophilus ducreyi*, *Helicobacter hepaticus* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

Las CDTs son toxinas tripartitas la subunidad catalítica activa es CdtB, en tanto que CdtA y CdtC constituyen un heterodímero, que funciona como aparato necesario para la incorporación de la toxina a la célula huésped.

### **1.7 Tratamiento y resistencia antimicrobiana.**

Al ser *Campylobacter* el responsable de gastroenteritis y diarreas se recomienda como tratamiento la reposición de líquidos y electrolitos y suministrar antibióticos solo en casos graves y/o prolongados. Los fármacos de elección son los macrólidos, azólidos y fluoroquinolonas como la ciprofloxacina. Se ha reportado un bajo nivel de resistencia para eritromicina que es un fármaco de elección pero para azitromicina en países asiáticos ya se ha reportado un 31% de resistencia. En los últimos años, se produjo un incremento en la resistencia del *C. jejuni* a fluoroquinolonas en aislados en humanos alcanzando frecuencias de 32,4 y 46,6% en Chile, situación que también se ha dado en otros países (González G. 2003).

En Argentina, Japón y países Europeos, el porcentaje de resistencia a quinolonas en humanos bordea o supera el 60%. Variadas publicaciones han asociado el aumento de la resistencia de *Campylobacter* spp. a fluoroquinolonas con la introducción de estos fármacos en la industria avícola, principalmente de enrofloxacin, cuyo metabolito activo es ciprofloxacina. A pesar de recomendaciones en Chile no se realiza la vigilancia epidemiológica de resistencia antimicrobiana ya que los laboratorios de rutina no buscan a este agente, subvalorando su importancia epidemiológica (García P. *et al* 2009). En Santiago de Chile se determinó que en 73 muestras de *C. jejuni* en niños un 32.4% de resistencia a ciprofloxacina y 5.4% una resistencia parcial a ampicilina.

Es importante destacar que, al igual que lo reportado por otras series, la resistencia a ciprofloxacina está presente en cepas aisladas principalmente de pacientes pediátricos en los cuales no se utilizan quinolonas como tratamiento empírico para la diarrea. Dada esta situación, es válido suponer que la probabilidad de que este tipo de resistencia haya sido adquirida "intra-tratamiento" es baja, pudiendo asumir que la infección ha sido provocada por bacterias previamente resistentes. *Campylobacter* es intrínsecamente resistente a penicilina G y cefalosporinas de primera generación debido a la débil unión de estos antimicrobianos con las proteínas de unión a penicilina. Además, se ha descrito

la adquisición de  $\beta$ -lactamasas como una causa importante de resistencia  $\beta$ -lactámicos en esta bacteria (García P. *et al* 2009).

### **1.8 Mecanismos de acción y resistencia a Quinolonas y fluoroquinolonas**

Las quinolonas inhiben la actividad de las topoisomerasas del DNA de tipo IIA procariotes, enzimas clave para la integridad topológica y funcional de este ácido nucleico. Esta acción inhibitoria depende de su concentración efectiva en el citosol bacteriano. En bacterias Gram negativas, las más hidrofílicas atraviesan la membrana externa por las porinas y las más hidrófobas lo hacen por difusión a través de las membranas. Aunque existen en eucariotas transportes activos que concentran quinolonas en los tejidos, no se han descrito mecanismos de transporte en las bacterias. Todas las quinolonas actúan sobre la DNA girasa, pero las fluoroquinolonas actúan además sobre la topoisomerasa IV; como regla general, la actividad sobre los gérmenes Gram negativos dependería de la inhibición de la girasa, mientras que la acción sobre los Gram positivos se relacionaría con la inhibición de la topoisomerasa IV.

Una vez en el interior bacteriano, las quinolonas interactúan con los dominios de mellado-empalme cuando las topoisomerasas se hallan en su confórmero activo, es decir, cuando luego de formar los complejos de clivaje, están listas para pasar el DNA-T a través de la puerta transitoria. Este conjunto complejo de clivaje-quinolona se conoce como aducto. Los aductos conteniendo DNA girasa condicionan agregados proteicos por delante de la horquilla replicativa o transcriptiva que colisionan con éstas e impiden su avance, anulando transitoriamente la síntesis de DNA y mRNA. El DNA queda abierto en múltiples puntos, cuanto mayor es la concentración de quinolona a la que es sometida la bacteria aunque no todas exhiben la misma eficacia. La explicación a estas observaciones es incompleta, se supone que si los aductos permanecen como tales provocan pocas mellas, dando tiempo para reparar el DNA y restaurar la actividad sintética detenida. Mientras que si se disocian, es como si la topoisomerasa se

convirtiera en nucleasa y el DNA es ampliamente dañado, pues se forman sucesivamente nuevos sitios de corte.

Las fluoroquinolonas también podrían accionar un mecanismo vía topoisomerasa IV; al impedir la separación de las hebras hijas, producen réplicas incompletas y fragmentadas del cromosoma sin aumento del total de DNA (Serra H. 2008).

La resistencia a fluoroquinolonas se da principalmente por la sustitución de aminoácidos en la QRDR (*quinolone resistance-determining región*) que se encuentra de las enzimas ADN girasa (subunidades GyrA y GyrB) y topoisomerasa IV (subunidades ParC y ParE), en la subunidad GyrA se han reportado varias modificaciones en su estructura que se asocian con la resistencia a fluoroquinolonas tales como: Thr86Ile, Asp90Asn, Thr86Lys, Thr86Ala, Thr86Val, y Asp90Tyr. Sin embargo el cambio en C257T el gen *gyrA* que conducen a la sustitución en Thr86Ile en la girasa es la mutación más frecuente y la que confiere una resistencia de alto nivel frente a las quinolonas (Wieczorek, K., & Osek, J. 2013).

Otra mutación significativa es la de *gyrA* (Thr86Ala) en *C. jejuni* que confiere a la bacteria un alto nivel de resistencia a ácido nalidíxico y una resistencia baja a ciprofloxacina, la ausencia de un objetivo secundario para las fluoroquinolonas (una provocada por una modificación en la subunidad GyrA) es suficiente para generar organismos resistentes.

La bomba de eflujo multifármaco CmeABC ha sido descrita como el mecanismo de eflujo causando resistencia a los antimicrobianos a varios agentes antimicrobianos incluyendo las fluoroquinolonas, La bomba (CmeABC) de flujo de varios fármacos es el mecanismo más común de expulsión de *Campylobacter* esta trabaja en sinergia con mutaciones de GyrA y es causa de la resistencia a fluoroquinolonas y macrólidos (Wieczorek, K., & Osek, J. 2013).

**CAPÍTULO 2**  
**METODOLOGÍA**

## **2.1 Obtención de la muestra**

Se recolectó 92 muestras de materia fecal de niños entre 0-12 años del Hospital Regional Isidro Ayora durante el periodo abril-junio 2016.

Las muestras fueron llevadas para ser procesadas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica Particular de Loja.

## **2.2 Procesamiento de las muestras**

### **2.2.1 Siembra e incubación.**

La siembra de la muestra se realizó en medio de cultivo cuya base fue agar sangre al 5% y se adicionó un suplementado selectivo (Butzler). La incubación se desarrolló en jarras de anaerobiosis con ayuda de sobres *CampyGen* 2.5L (ThermoSCIENTIFIC) a una temperatura de 42 °C durante 48 horas.

### **2.2.2 Aislamiento y purificación.**

Luego de la incubación se procedió a analizar macroscópicamente las muestras conociendo las características típicas de *Campylobacter* (colonias planas, brillantes, grises, no hemolíticas y colonias con predisposición a crecer siguiendo la línea del estriado) (Figura 1), luego se realizó tinción (Hucker) para confirmar la presencia de la bacteria, mediante microscopia se observó bacilos Gram negativos teñidas de violeta con forma de espiral o alas de gaviota.

Para purificar las cepas de *Campylobacter* se utilizó el método de filtración, finalmente se almacenó las muestras a -70°C para posteriores análisis.

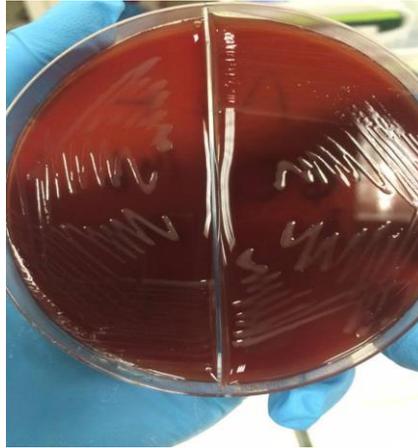


Figura 1: Cepa de *Campylobacter* spp.  
Fuente: El autor

## 2.3 Identificación

### 2.3.1 Identificación bioquímica

#### 2.3.1.1 Hidrolisis de hipurato

La principal prueba es la hidrolisis de hipurato que consiste en determinar la presencia de las enzimas hipuricasas las cuales hidrolizan el hipurato para producir ácido benzoico y glicerina, esta glicerina es detectada mediante la prueba de la ninhidrina (Penner 1988). La prueba se toma como positiva cuando el medio se torna azul que señala la presencia de glicerina (Figura 2).

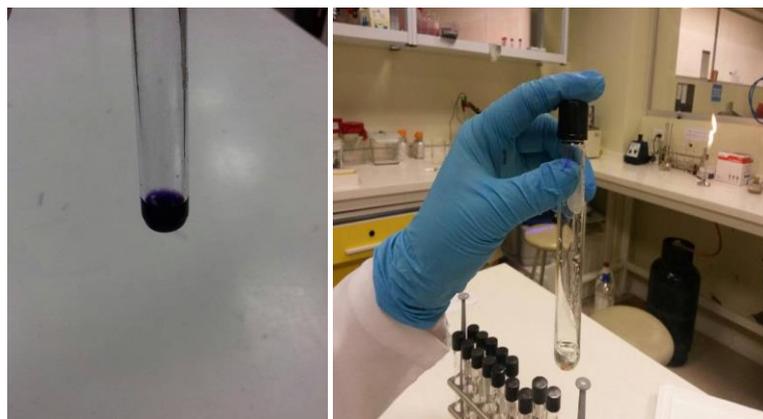


Figura 2: Hipurato positivo (izquierda), hipurato negativo (derecha).  
Fuente: El autor

## 2.3.2 Identificación molecular

### 2.3.2.1 PCR-multiplex

Antes de la PCR-multiplex se realizó la extracción de ADN usando el kit Wizard® Genomic DNA Purification.

Al obtener el ADN de las muestras deseadas se inició el PCR usando diferentes primers específicos para cada especie de *Campylobacter* (Tabla 1) y por último se llevó las muestras al termociclador (SimpliAmp Thermal Cycler) con condiciones preestablecidas.

Finalmente el producto de la PCR se cargó en un gel de agarosa al 1.5% colocando 1µl de marcador de 100 bp (Trackit™ 100bp DNA Ladder), en los demás pocillos correspondientes a las muestras, controles y blanco se colocó 2 µl. Los resultados fueron observados e interpretados (Figura 3).

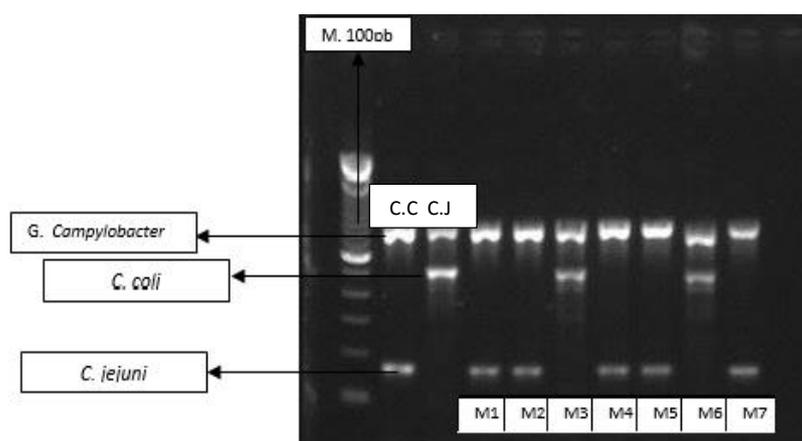


Figura 3: PCR-Multiplex  
Fuente: El autor

Tabla 1: Secuencias de primers usando en PCR-Multiplex

Especies	Tamaño	Gen Diana	Primer	Secuencia (5' a 3')
<i>Campylobacter</i>	816	16S rRNA	C412F C1228R*	5'-GGATGACACTTTTTCGGAGC-3' 5'-CATTGTAGCACGTGTGTC-3'
<i>C.hyointestinalis subsp.hyointestinalis</i>	611	23S rRNA	HYO1F HYOFET23 SR	5'- ATAATCTAGGTGAGAATCCTAG- 3' 5'-GCTTCGCATAGCTAACAT-3'

<b><i>C. coli</i></b>	502	ask†	CC18F CC519R	5'- GGTATGATTTCTACAAAGCGAG- 3' 5'-ATAAAAGACTATCGTCGCGTG- 3'
<b><i>C. fetus</i></b>	359	cstA	MG3F CF359R	5'- GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT-3' 5'- AGCCAGTAACGCATATTATAGTA G-3'
<b><i>C. lari</i></b>	251	glyA	CLF CLR	5'-TAGAGAGATAGCAAAAAGAGA- 3' 5'-TACACATAATAATCCCACCC-3'
<b><i>C. jejuni</i></b>	161	cj041 4§	C-1 C-3	5'- CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATG T-3' 5'- CCATAAGCACTAGCTAGCTGAT- 3'
<b><i>C. upsaliensis</i></b>	86	lpxA	CU61F CU146R	5'- CGATGATGTGCAAATTGAAGC-3' 5'-TTCTAGCCCCTTGCTTGATG-3'

Fuente: Yamazaki et al., 2007

## 2.4 Susceptibilidad bacteriana

Se evaluó la actividad antimicrobiana en las cepas aisladas mediante el método difusión en agar y siguiendo las recomendaciones del Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad (EUCAST 2015).

Los antibióticos usados fueron: Ácido nalidíxico (30µg), cripofloxacina (5µg), ampicilina (10µg), amoxicilina + ácido clavulánico (20/10µg), gentamicina (10µg) y eritromicina (15µg) (Figura 4) (Tabla 2).



Figura 4: Antibiograma de cepa de *Campylobacter* spp.  
Fuente: El autor.

Tabla 2: Puntos de corte de *Campylobacter* spp.

<b>Antibiótico</b>	<b>Sensible S ≥</b>	<b>Resistente R ≤</b>
Cripofloxacina	<b>26</b>	<b>26</b>
Ampicilina	<b>19</b>	<b>14</b>
Amoxicilina/ A. clavulánico	<b>19</b>	<b>14</b>
Gentamicina	<b>17</b>	<b>17</b>
Eritromicina	<b>20</b>	<b>20</b>

Fuente: EUCAST, CA-SFM, SFM 2016.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el estudio se analizaron 92 muestras diarreicas y no diarreicas de niños entre 0 y 12 años provenientes del Hospital Regional Isidro Ayora de la provincia de Loja. Se identificaron 7 muestras positivas para *Campylobacter* spp. que corresponde al 7.60% (Tabla 3). Resultados muy parecidos a los de investigaciones anteriores realizadas en la provincia de Loja con un 6.8% de prevalencia (Narváez I. 2015).

Entidad de salud	Número de muestras	Cepas positivas	%	Especie	
Hospital Regional Isidro Ayora	92	7	7.60%	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
				5(71.43%)	2(28.57%)

Fuente: El autor

El porcentaje de prevalencia obtenida es bajo en comparación a dos investigaciones realizadas en las zonas peri-urbanas de Quito-Ecuador donde sus porcentajes de prevalencia fueron 17.2% y 30.7% (Vasco K. 2015.; Vasco K. *et al* 2016), pero es importante tomar en cuenta que estos altos porcentajes se deben a una cohabitación del ser humano con animales domésticos y aves de corral, Vasco K. *et al* (2016) especifica que cepas de *C. jejuni* son más propensas a ser transmitidas a los seres humanos que las que se encuentran en animales domésticos.

Según Gutiérrez, V. *et al* (2015) Ecuador es uno de los países con mayor índice de *Campylobacter* en niños con diarrea con un 23%, luego esta Argentina (30.1%), Perú 18.2%, Paraguay 18.4%, Colombia 14.4%, Chile 14.1% y Venezuela 13.0%.

En estudios realizados en niños con y sin diarrea a nivel de Latinoamérica se encontró, en Perú 11.25% y 13.3%, Colombia 2.3%, Paraguay 16%, Bolivia 4.19% y Argentina 22.7% de prevalencia de *Campylobacter* spp. (Herrera D. *et al* 2016; Perales M. *et al* 2015; Manrique F. *et al* 2006; Mereles G. *et al* 2014; Da Silva M. 2011; Delgado C. *et al* 2014).

Es importante mencionar que en estos estudios la mayoría son de niños con diarrea, pero en el nuestro el 57.14%(4) de muestras fueron no diarreicas y 42.86%(3) de muestras diarreicas lo que sugiere que las investigaciones también se realicen en niños asintomáticos, Fernández H. (2011) encontró *Campylobacter spp.* en niños control de diferentes países como Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Venezuela y Perú, sugiere que esto se puede deber a bajas condiciones de saneamiento básico.

Al determinar las especies de *Campylobacter* se observó una mayor prevalencia en la especie *C. jejuni* con un 71.43% (Tabla 3), estos datos son similares a los obtenidos en Quito de un 63.63% y 30.7% (Vasco K. 2015; Vasco K. et al 2016). En Bolivia, se determinó un 4.19% para *Campylobacter spp* donde el 100% de las cepas aisladas fueron *C. jejuni* (Da Silva M. 2011), en Argentina *C. jejuni* fue el segundo patógeno con mayor prevalencia en pacientes con gastroenteritis aguda con un 12.9% de 927 muestras diarreicas (Delgado C. et al 2014) también se obtuvo un 96% de *C. jejuni* (Tamborini et al 2012), en Perú fue la especie más aislada con un 51.14% frente a las otras especies de *Campylobacter* (Lee G. et al 2013).

Vasco K. (2015) en su investigación señala a los pollos como el mayor reservorio de *Campylobacter jejuni* con un 59.5%, esta clase de cepas se encontraron igualmente en humanos y animales domésticos que fueron estudiados por lo que sugiere que los pollos llegarían ser la principal fuente de infección de *C. jejuni* para los humanos. También señala que los cuyes a pesar de tener un alto nivel de prevalencia de la especie no son propensos a causar infecciones en humanos. Notario R. et al (2011) en su investigación determinó un 100% de prevalencia de *C. jejuni* en pollos destinados al consumo humano y gallinas ponedoras donde se encontraron las mismas cepas en pacientes con diarrea, lo que sugiere que la contaminación debe ser de origen animal.

La segunda especie aislada fue *C. coli* con un 28.57%(2) resultado similar al obtenido en la ciudad de Loja con una prevalencia de 29%(2) ,8.3%(1) (Cuenca V. 2015; Narváez I. 2015). También se reportaron valores similares en Quito con un 27.27% (Vasco K.

2015), en Chile se encontró una prevalencia del 10% (Cáceres P. 2013) y en Argentina un 4%(2) de *C. coli*. A pesar de que *C. coli* es una especie con menor aislamiento en comparación a *C. jejuni*, esta tiene los mismos reservorios como perros, pollos, vacas, conejos, cuyes etc. Por lo que su transmisión es igual de importante que las demás especies ya que esta se puede transmitir de manera directa.

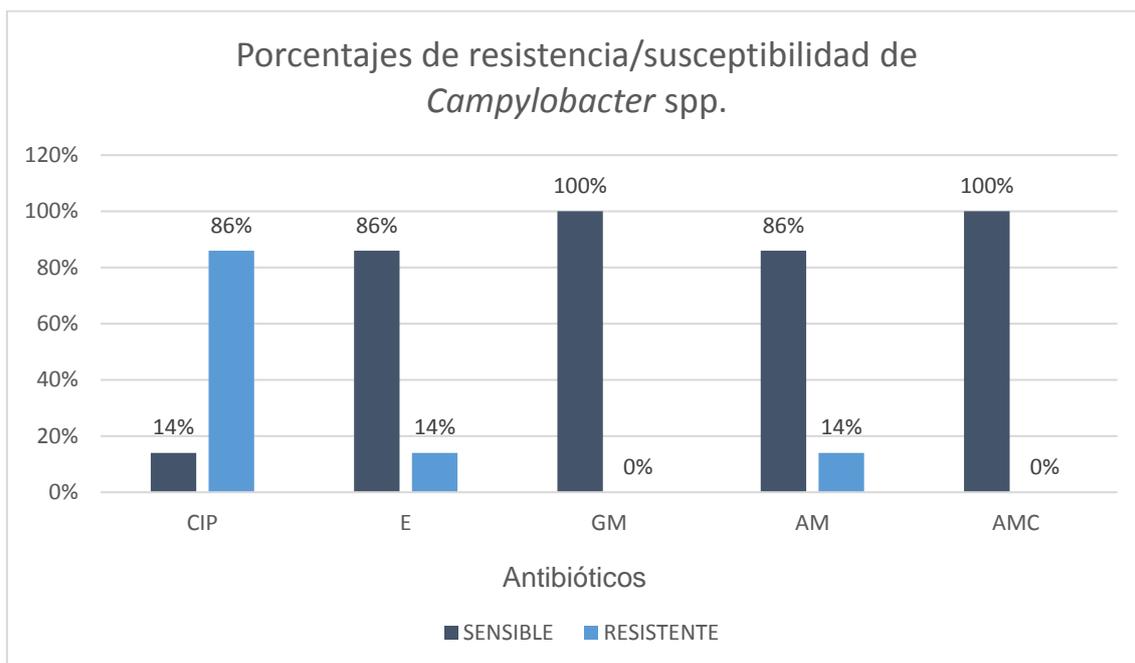


Figura 3: Porcentajes de resistencia/sensibilidad a 6 antibióticos en cepas de *Campylobacter* spp. aisladas en el Hospital Regional Isidro Ayora durante el periodo abril-junio 2016. CIP: Ciprofloxacina; E: Eritromicina; GM: Gentamicina; AM: Ampicilina; AMC: Amoxicilina/A. clavulánico.

Fuente: el autor

En este estudio se evidenció una resistencia antimicrobiana del 86%(6) (Figura 3) para ciprofloxacina, una cifra similar a las obtenidas en anteriores proyectos en la ciudad de Loja con valores de 91.7%(11), 71%(5) y 100%(5) (Narváz I. 2015; Cuenca V. 2015; Cuenca J. 2015). También se determinó similitud con datos encontrados en Argentina con un 66.7% (12) y 65%(35) (Notario R. et al 2011; Tamborini A. et al 2012), en Chile con un 60% (33) y 33.3%(2) (González-Hein G. et al 2013; Rivera N. et al 2011), en Paraguay un 49%(86) de resistencia a ciprofloxacina (Mereles G. et al 2014), en Perú y Brasil 63-78%, 14-72.2% respectivamente (Fernández H. 2011).

Desde la década de los 90 la resistencia de *Campylobacter* spp. a fluoroquinolonas ya fue un problema de salud pública en diversos países donde está permitido el uso de quinolonas fluoradas en veterinaria, profilaxis y tratamiento de enfermedades respiratorias en aves de corral. Este uso puede facilitar el desarrollo de resistencia antimicrobiana entre aislados en el reservorio animal y la acumulación de antimicrobianos a través de la cadena alimentaria con serias implicaciones en el tratamiento de la campilobacteriosis en humanos (González-Abad, M. 2013). Esta alta resistencia se debe a mutaciones en dos enzimas encargadas de la replicación del ADN, transcripción, recombinación y reparación de ADN; la ADN girasa y la topoisomerasa IV, también otro mecanismo de resistencia descrito es la disminución de la permeabilidad de la membrana y del sistema de eflujo (Iovine, N. M. 2013).

En Argentina se informa de un alto crecimiento en el número de cepas resistentes a fluoroquinolonas siendo ya un problema a nivel mundial en el tratamiento de la enteritis en general. Y recalca que en países donde el uso de fluoroquinolonas está limitado en veterinaria y en producción de pollos las cepas son todas sensibles a este grupo de medicamentos y las cepas resistentes en humanos son encontradas en viajeros (Notario R. et al 2011).

González-Abad, M. (2013) refiere que *Campylobacter* spp. raramente se asocia con enfermedad invasora y sucede en pacientes con enfermedades subyacentes o inmunodeficiencia. También nos menciona que la FDA tiene permitido el uso de fluoroquinolonas en niños pero indica que guías terapéuticas recomiendan evitar su administración en personas menores a 18 años.

A pesar de los datos obtenidos sobre la resistencia de *Campylobacter* spp. frente a fluoroquinolonas y la amplia bibliografía que la respalda, esta es minimizada ya que este grupo de medicamentos tiene un alto espectro frente a microorganismos y su alta afinidad en su uso para mejorar el crecimiento de animales con fines alimentarios (pollos

principalmente) y *Campylobacter* al no ser un patógeno “agresivo” como *Salmonella* o *Escherichia coli* es menos valorado.

Con respecto a la eritromicina, ampicilina, amoxicilina/clavulánico y gentamicina se obtuvieron valores cercanos al 100%(Figura 3) de susceptibilidad y concuerdan con los obtenidos tanto en los estudios mencionados anteriormente realizados en Loja y en países como España, Argentina, Chile, Bolivia y Paraguay (Bascuñana, P. *et al* 2011; Tamborini, A. L., *et al* 2012; Rivera, N. *et al* 2011; Da Silva M. 2011; Mereles G. *et al* 2014).

La resistencia a estos antibióticos se da principalmente por alteración o producción de nuevos sitios blanco, presencia de bombas de eflujo que expulsan el antibiótico, modificación enzimática o destrucción del antibiótico e impermeabilidad al antibiótico (Cabrera, C.2013).

## CONCLUSIONES

- ❖ La prevalencia de *Campylobacter* spp. fue del 7.6% (7/92) en niños con y sin diarrea en el Hospital Regional Isidro Ayora en provincia de Loja.
- ❖ *Campylobacter jejuni* fue la especie más frecuente con un 71.43% (5/7) mientras que la especie menos aislada fue *Campylobacter coli* con un 28.57% (2/7).
- ❖ El género *Campylobacter* presentó una resistencia a las fluoroquinolonas con un 86% para ciprofloxacina y un 14% para eritromicina y ampicilina.
- ❖ *Campylobacter* spp. mostró un 100% de sensibilidad para gentamicina y amoxicilina/A. clavulánico.

## RECOMENDACIONES

- ❖ La resistencia a fluoroquinolonas por parte del genero *Campylobacter* ya es una realidad en nuestro país por lo que se recomienda controlar el uso de antibióticos principalmente en la producción animal.
- ❖ Evitar el uso de fluoroquinolonas para favorecer el crecimiento de aves de corral o como profiláctico en animales domésticos y de granja.
- ❖ No aplicar el conocimiento empírico para tratar enfermedades gastrointestinales, acudir a un profesional de la salud para encontrar el mejor tratamiento.
- ❖ Informar sobre las posibles fuentes de contaminación y los reservorios de *Campylobacter* spp. para así evitar más casos de infección.

## Bibliografía

- Ambiente, Y. (2006). "Estudio cualitativo y cuantitativo de las quinolonas y fluoroquinolonas importadas y autorizadas para uso y disposición en medicina y en veterinaria en Chile, en el período 2002-2005. Consideraciones sobre su impacto para la salud pública. Chile.
- Bascuñana, P. P. (2011). Sencibilidad antimicrobiana de cepas hipurato-negativas de *Campylobacter* spp. y *Helicobacter pullorum* aisladas de enfermos con diarrea. *Rev Esp Quimioter*, 213-216.
- B Klotz, F. G. (15 de Junio de 2012). *Perfil de Riesgo de campylobacter spp en pollos de engorde, unidad de evaluacion de riesgos para la inocuidad de los alimentos*. Obtenido de Researchgate: [https://www.researchgate.net/publication/237076065\\_perfil\\_de\\_riesgo\\_de\\_Campylobacter\\_spp\\_en\\_pollos\\_de\\_engorde](https://www.researchgate.net/publication/237076065_perfil_de_riesgo_de_Campylobacter_spp_en_pollos_de_engorde)
- Cáceres Refusta, P. A. (2013). Determinación de genes asociados a virulencia en cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas desde pollos broilers, alimentos derivados de aves y de pacientes humanos.
- Campylobacter* spp. en productos aviares y su impacto en salud pública. (2015). *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* , 10(2), 203-213.
- Capa, V. A. (2015). *Prevalencia de las especies termotolerantes de Campylobacter (C. jejuni subsp. jejuni, C. lari y C. upsaliensis) en niños con y sin diarrea del Hospital del Día, durante el período de septiembre-diciembre 2014*. Loja: UTPL.
- Carmona, F. (1985). Presencia de *campylobacter jejuni* en aves de corral y sus manipuladores. . *Biomédica*, 5(3-4), 78-85.
- Cuenca, J. P. (2015). *prevalencia de especies termotolerantes de Campylobacter (C. jejuni subsp. jejuni, C. coli, C. lari y C.upsaliensis) en niños con y sin diarrea del Hospital Regional Isidro Ayora, durante el periodo Septiembre-Diciembre 2014*. Loja: UTPL.
- Da Silva Mello de Martinez, M. (2011). Enfermedad diarreica aguda en niños. Agentes causales más comunes en una comunidad del Chaco Central. *Pediatría . Órgano Oficial de la Sociedad Paraguaya de Pediatría*, 38(3), 191-198.
- Delgado, C. B. (s.f.). Prevalencia de enteropatógenos en gastroenteritis aguda de pacientes del hospital de niños de la santísima trinidad córdoba argentina.
- Echeverri, L. (1982). *Campylobacter fetus* ssp *jejuni* en patología humana. *Biomédica*, 2(2), 87-95.
- Fernández H, V. F. (2008). Occurrence of *Campylobacter* species in healthy well-nourished and malnourished children. *Brazilian. Journal of Microbiology*, 56-58.
- Fernández, H. (2006). *Especies del género Campylobacter y del género arcobacter en muestras de deposiciones humanas y animales*. Obtenido de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2006/fcj.37e/doc/fcj.37e.pdf>.
- Fernández, H. (2011). *Campylobacter* and campylobacteriosis: a view from South America. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(1) 121-127.

- Fernandez, H. (2011). *Campylobacter y campylobacteriosis: Una mirada desde America del Sur*. Universidad Austral de Chile.
- G Brooks, K. C. (2014). *Microbiología Médica McGraw*. Mexico: Hill interamericana editores México.
- González-Hein, G. C. (2013). Análisis molecular de la resistencia a fluoroquinolonas y macrolidos en aislados de *Campylobacter jejuni* de humanos, bovinos y carne de ave. *Revista chilena de infectología* , 135-139.
- Gutiérrez, V. R. (2015). *Campylobacter spp. en productos aviares y su impacto en salud pública*. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* , 203-213.
- H Fernández, F. V. (2007). *Especies de Arcobacter y Campylobacter en aves y mamíferos del sur de Chile*. Obtenido de <http://mingaonline.uach.cl/pdf/amv/v39n2/art11.pdf>
- Hernández, F. (s.f.). *Caracterización de Campylobacter, Helicobacter y bacterias curvadas asociadas con gastritis y úlceras pépticas*. San José Costa Rica: Facultad de Microbiología Universidad de Costa Rica. Obtenido de <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v11n3-4/art7.pdf>
- Herrera, D. G. (2016). DIARREA AGUDA MÁS DESHIDRATACIÓN . *Manual médico Saludesa*, 1(1).
- Instituto de Salud Publica de Chile. (1 de Enero de 2014). *Vigilancia de laboratorio de Campylobacter spp.* Obtenido de <http://www.ispch.cl/sites/default/files/Bolet%C3%ADn%20Campylobacter.pdf>(consulta 30/06/15).
- J Ketley, M. K. (2005). *Campylobacter molecular and celular biology*, . United Kingdom: Horizon Bioscience .
- J, W. K. (2013). *Antimicrobial resistance mechanisms among Campylobacter*. BioMed Research international.
- Lafuente van der Sluis, S. (2011). *Campylobacter spp., Salmonella spp. y Listeria monocytogenes: aspectos epidemiológicos y microbiológicos*. *InWorkshop*.
- Lapierre, L. (2013). Factores de Virulencia asociados a especies zoonóticas de *Campylobacter spp.* *Avances en Ciencias Veterinarias*, 28(1).
- Lee, G. P. (2013). Symptomatic and asymptomatic *Campylobacter* infections associated with reduced growth in Peruvian children. *PLoS Negl Trop Dis*.
- M Uwestarazu, T. D. (1998). *Frecuencia de campylobacter jejuni y otros agentes patógenos en un grupo de lactantes venezolanos con diarrea aguda*. Obtenido de <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/15780/v104n3p225.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Manrique-Abril, F. G. (2006). Agentes causantes de diarrea en niños menores de 5 años en Tunja. *Rev Salud Pública*, 8(1), 88-97.
- Manual de la OIE sobre animales terrestres. (2008). *Campylobacter coli*. Obtenido de [http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es\\_2008/2.09.03.%20Campilobacter%20jejuni.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.09.03.%20Campilobacter%20jejuni.pdf)

- Martinez, J. (12 de Febrero de 1999). *Generalidades de la gastroenteritis aguda y crónica, Universidad Veracruzana Facultad de Medicina*. Obtenido de <http://148.226.12.104/bitstream/123456789/31874/1/martinezherrerajose2.pdf>
- Mereles, G. R. (2014). Síndrome diarreico agudo causado por *Campylobacter* spp. en pacientes menores de 11 años y su resistencia antimicrobiana a las drogas de elección para tratamiento 2010-2012. *Paraguay Pediatría*, 41(2).
- Narvaez, L. M. (2015). *prevalencia de especies termotolerantes de Campylobacter (C. jejuni subsp. jejuni, C. coli, C. lari y C. upsaliensis) en niños con y sin diarrea del Hospital Manuel Ygnacio Monteros, durante el periodo Septiembre-Diciembre 2014*. Loja: UTPL.
- Notario, R. B. (2011). Cepas de *Campylobacter jejuni* resistentes a quinolonas aisladas de humanos, gallinas y pollos. *Medicina (Buenos Aires)*, 71(4) 331-335.
- P Garcia, N. V. (14 de Julio de 2009). *Susceptibilidad antimicrobiana de Campylobacter jejuni aislado de coprocultivos en Santiago de Chile*. Obtenido de Scielo: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182009000700004](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182009000700004).
- Penner, J. (1998). *The Genus Campylobacter a Decade of Progress, American Society for Microbiology*. Ontario: Clinical microbiology.
- Perales, M. C. (2015). Acute watery diarrhea caused by *Campylobacter* and *Shigella* infection in children younger than two years old in La Victoria district Lima Perú]. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 19(4), 186-192.
- Rivera, N. B. (2011). Genotipificación y resistencia antibacteriana de cepas de *Campylobacter* spp aisladas en niños y en aves de corral. *Revista chilena de infectología*, 555-562.
- Salud pública de Chile. (Octubre de 2014). *Vigilancia de laboratorio de Campylobacter spp.* Obtenido de <http://www.ispch.cl/sites/default/files/Bolet%C3%ADn%20Campylobacter.pdf>
- Serra, H. (2008). *Quinolonas*. Facultad de Medicina U.A.I.
- Tamborini, A. L. (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 departamento de bioquímica y microbiología*. Washington, DC, USA: ASM Press.
- Vasco Aguas, K. A. (2015). *Zoonotic transmission of Campylobacter jejuni and Atypical Enteropathogenic Escherichia coli (aEPEC) in peri-urban Quito, Ecuador*. Quito.
- Vasco, K. G. (2016). Detection of zoonotic enteropathogens in children and domestic animals in a semi-rural community in Ecuador. *Applied and environmental microbiology*, AEM-00795.
- Wu, D. E. (1 de Enero de 2002). *Generalidades de diarrea agua infecciosa*. Obtenido de MedWare: <http://www.medwave.cl/medios/congresos/archivospdf/WuAbril2002.pdf>

## **ANEXOS**

## ANEXO 1: PREPARACIÓN DE MEDIO SELECTIVO BUTZLER (1000ml)

- Pesar 25 gr de Caldo Nutriente N°2
- Pesar 10 gr de extracto de levadura
- Pesar 16 gr de agar-agar
- Colocar todo lo anteriormente pesado en un frasco esteril.
- Adicionar 470ml de agua destilada
- Homogenizar y ajustar el pH de 6.9-7.2
- Esterilizar en autoclave ( 121°C y 1 atm de presión por 20 minutos)
- Preparar el *Campylobacter Selective Supplement Butzler* adicionando 5ml de agua esteril para inyección y homogenizar
- Cuando el medio de cultivo tenga una temperatura de aproximadamente 50°C adicionar el suplemento Butzler y luego 50 ml de sangre
- Homogenizar la mezcla y dispensar 25 ml en cada caja Petri
- Almacenar el medio dispensado a 4°C con su respectiva etiqueta.

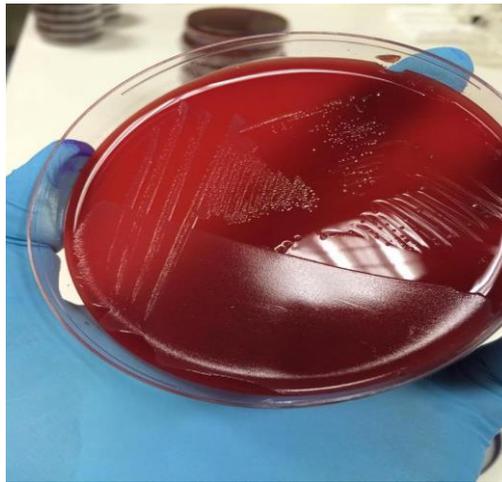


Figura 4: Cepa de *Campylobacter* spp. en medio Butzler.  
Fuente: El autor.

## **ANEXO 2: AISLAMIENTO DE *CAMPYLOBACTER* SPP.**

- Inocular la muestra fresca a un extremo de la caja Petri con ayuda de un hisopo estéril.
- Diseminar la muestra mediante estriado de agotamiento
- Incubar las placas inoculadas en jarras de anaerobiosis bajo condiciones microaerofilas a 42°C durante 48 horas.

### ANEXO 3: TINCIÓN DE HUCKER PARA IDENTIFICACIÓN *CAMPYLOBACTER* SPP.

- Colocar una pequeña cantidad de colonia sobre una placa porta objetos y fijar con calor
- Teñir con una gota de violeta cristal conjuntamente con una gota de bicarbonato de sodio al 1% por 2 minutos
- Lavar la placa y dejar secar
- Observar a 100x en el microscopio.

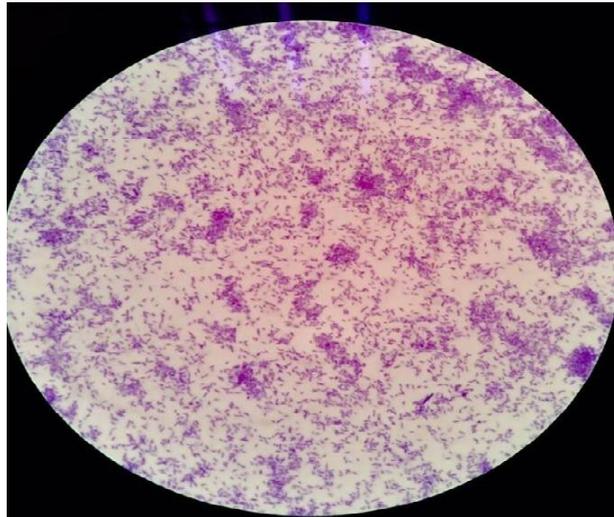


Figura 5: *Campylobacter* spp. teñido con Hucker.  
Fuente: El autor.

#### ANEXO 4: METODO DE AISLAMIENTO POR FILTRACIÓN

- Tomar una cantidad considerable de las colonias sospechosas
- Introducir el inóculo en un tubo estéril con 1 ml de agua destilada y dar vórtex
- Colocar el papel filtro (con poros de 45  $\mu\text{m}$ ) en agar sin antibiótico.
- Con una micro pipeta tomar 200  $\mu\text{l}$  del inóculo diluido y verterlo lentamente sobre el papel filtro
- Esperar de media a una hora para retirar el papel filtro
- Incubar a condiciones anteriormente mencionadas

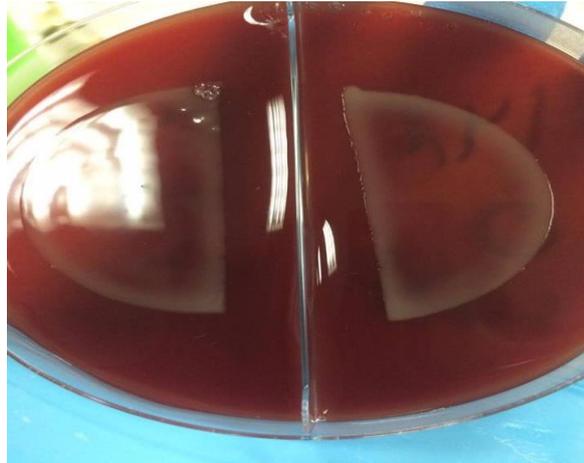


Figura 6: Resultado positivo de una filtración.  
Fuente: El autor.

## **ANEXO 5: PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA IDENTIFICACIÓN DE *CAMPYLOBACTER* SPP.**

### **Hidrolisis de hipurato**

- Adicionar un inóculo del cultivo en 400µl de solución de hipurato de sodio al 1%
- Colocar en baño María a 37°C por 2 horas
- Añadir 200µl de ninhidrina y reposar durante 10 minutos
- Si el líquido se torna azul es positivo, si no toma coloración es negativo (Figura 2).

## ANEXO 6: PROTOCOLO PARA EXTRACCIÓN DE ADN

- Añadir 1 ml de un cultivo de una noche a un tubo de 1,5ml de microcentrífuga
- Centrifugar a 13000-16000 x g durante 2 minutos para sedimentar las células  
Eliminar el sobrenadante
- Añadir 600µl de Nuclei Lysis Solution. Pipetear suavemente hasta que se vuelvan a suspender las células
- Incubar a 80°C durante 5 minutos para lisar las células; a continuación enfriar a temperatura ambiente
- Añadir 3µl de RNasa Solution al lisado celular, invertir el tubo de 2 a 5 veces para mezclar
- Incubar a 37°C durante 15-60 minutos. Enfriar la muestra a temperatura ambiente
- Agregar 200µl de Protein Precipitation Solution al lisado celular tratado con RNasa
- dar vortex vigorosamente a alta velocidad durante 20 segundos para mezclar la Protein Precipitation Solution con el lisado celular
- Incubar la muestra en hielo por 5 minutos
- Centrifugar a 13000-16000 x g durante 3 minutos
- 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 sobrenadantes pueden 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
- Mezclar suavemente por inversión hasta que las hebras de hilo de ADN formen una masa visible
- Centrifugar a 13000-16000 x g durante 2 minutos
- Vierta cuidadosamente el sobrenadante y drene el tubo sobre el 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
- Centrifugar a 13000-16000 x g durante 2 minutos
- Aspirar cuidadosamente el etanol

- Drene el tubo sobre papel absorbente limpio y deje que el precipitado se seque al aire por 15 minutos
- Añadir 100µl 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 incubación de la solución durante la noche a temperatura ambiente o a 4°C
- Almacenar el ADN a 2-8°C.

## ANEXO 7: PCR- MULTIPLEX

- En un tubo de microcentrífuga colocar cada uno de los componentes para realizar el mix.

Tabla 4: Cantidades de componentes para PCR-multiplex.		
Especies	Componentes	1X (µl)
	buffer	5,00
	dNTPs	0,50
	Cl2Mg	1,50
	<b>Primers</b>	
<b><i>Campylobacter</i></b>	C412F	0,05
	C1228R*	0,05
<b><i>C.hyointestinalis</i> subsp.hyointestinalis</b>	HYO1F	0,05
	HYOFET23SR	0,05
<b><i>C. coli</i></b>	CC18F	0,05
	CC519R	0,05
<b><i>C. fetus</i></b>	MG3F	0,05
	CF359R	0,05
<b><i>C. lari</i></b>	CLF	0,05
	CLR	0,05
<b><i>C. jejuni</i></b>	C-1	0,05
	C-3	0,05
<b><i>C. upsaliensis</i></b>	CU61F	0,05
	CU146R	0,05
	Taq	0.125
	H2O	16,17
	ADN	1,00
	<b>TOTAL</b>	<b>25,00</b>

- Luego llevamos el mix al termociclador el cual lleva las siguientes condiciones:

Tabla 5: condiciones para realizar PCR-multiplex			
	Temperatura(°C)	Tiempo (minutos)	N° ciclos
<b>Desnaturalización inicial</b>	94	2	1
<b>Desnaturalización</b>	94	0,4	30
<b>Anillamiento</b>	54	1,4	
<b>Extensión</b>	72	1	
<b>Extensión final</b>	72	5	1

## ANEXO 8: PREPARACIÓN DE GEL DE AGAROSA (35ML)

- Medir con una probeta 11,6 ml de gel red, 3,5ml de TBE 10x y aforar a 35ml.
- Pesar 0,525 g de agarosa UltraPure de invitrogen y mezclarlo con lo anteriormente medido en la probeta
- Disolver con ayuda de calor.
- Verter la solución en la bandeja de electroforesis y colocar la peineta
- Deja que se solidifique y sacar la peineta
- Colocar el gel dentro de la cubeta para electroforesis y adicionar el buffer TBE 1x hasta cubrir completamente el gel
- adicionar 1µl del marcador de peso molecular, 2 µl de controles para la las especies *C. jejuni* y *C. coli* y la misma cantidad para las muestras obtenidas en PCR-multiplex.
- Tapar la cubeta y programar para que corra por 35 minutos a 120 volts y 300 mA
- Revelar el gel mediante luz UV a 300nm.