UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO

Prevalencia de *Arcobacter* spp., en caninos y aves de corral en la ciudad de Loja.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Mena Valladarez, Dayanara Margoth

DIRECTORA: Simaluiza Masabanda, Rosa Janneth, Mgtr

LOJA-ECUADOR

2018

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

2018

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magister.

Rosa Janneth Simaluiza Masabanda

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: **"Prevalencia de *Arcobacter* spp., en caninos y aves de corral en la ciudad de Loja"** realizado por **Mena Valladarez Dayanara Margoth**, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo**.**

Loja, mayo del 2018

f)……

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESION DE DERECHOS

"Yo **Dayanara Margoth Mena Valladarez**, declaro ser autor(a) del presente Trabajo de Titulación: "Prevalencia de *Arcobacter* spp., en caninos y aves de corral en la ciudad de Loja", de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo la Mgtr. Rosa Janneth Simaluiza Masabanda director(a) 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)……..

Autora: Dayanara Margoth Mena Valladarez

Cédula: **1104744584**

DEDICATORIA

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y estar ahí en cada momento de mi vida, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente. A mis padres Margot y Lewis, por creer en mí, por ser el pilar fundamental en mi vida, en toda mi educación y por su incondicional apoyo. A mis hermanos Paula y Lewis por estar conmigo y brindarme su cariño. Mis abuelitos, por guiarme y apoyarme siempre, los quiero mucho.

"Lo que hacemos en la vida tiene su eco en la eternidad"

-Gladiador

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien. A toda mi familia, gracias por su apoyo y cariño.

A mi directora de trabajo de titulación Mgtr. Janneth Simaluiza, por su apoyo al brindarme la oportunidad de trabajar en esta investigación y elaboración de esta tesis.

A Lilibeth y Jimmy por brindarme su amistad, y por la enseñanza compartida a lo largo del presente.

A mis amigos, por compartir los buenos y malos momentos.

INDICE DE CONTENIDOS

CARATULA i

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN ii

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESION DE DERECHOS iii

DEDICATORIA iv

AGRADECIMIENTO v

INDICE DE FIGURAS ix

INDICE DE TABLAS ix

INDICE DE GRÁFICAS ix

ABREVIATURAS x

RESUMEN 1

ABSTRACT 2

INTRODUCCIÓN 3

CAPITULO I 5

MARCO TEÓRICO 5

1.1. Antecedentes. 6

1.2. Clasificación taxonómica 7

1.3. Género *Arcobacter* 10

1.3.1. Morfología y características bioquímicas 10

1.4. Principales especies zoonóticas de *Arcobacter*. 11

1.5. Reservorios y rutas de transmisión 12

1.5.1. Transmisión por agua 12

1.5.2. Transmisión por animales 13

1.6. Epidemiología 14

1.7. Patogenia 15

1.8. Sintomatología en caninos y aves de corral 18

1.9. Diagnóstico. 18

1.10. Resistencia Antimicrobiana 21
CAPITULO II 22
METODOLOGÍA 22
2.1. Población de Estudio 23
2.2. Siembra e Incubación 24
2.3. Identificación molecular 24
2.3.1. Extracción de DNA. 24
2.3.2. Multiplex PCR. 25
2.4. Actividad antimicrobiana 25
CAPITULO III 27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 27
3.1. Prevalencia de *Arcobacter* spp., en caninos. 28
3.2. Identificación de especies de *Arcobacter* en caninos. 29
3.3. Prevalencia de *Arcobacter* spp., en aves de corral 30
3.4. Identificación de especies de *Arcobacter* en aves de corral. 32
3.5. Análisis molecular de *Arcobacter* spp., en caninos y aves de corral. 33
3.6. Actividad antimicrobiana de seis antibióticos frente a *Arcobacter* spp., en caninos. 35
3.7. Actividad antimicrobiana de seis antibióticos frente a *Arcobacter* spp., en aves de corral 36
CONCLUSIONES 38
RECOMENDACIONES 39
BIBLIOGRAFÍA 40
ANEXOS 52
ANEXO 1: Caldo de enriquecimiento para *Arcobacter*. 53
ANEXO 2: Medio de agar sangre enriquecido para *Arcobacter* 54
ANEXO 3: Tinción de Hucker 55
ANEXO 4: Pruebas bioquímicas para la identificación de especies de *Arcobacter.* 56
ANEXO 6: Criopreservación 59

ANEXO 7: Protocolo de Extracción de ADN Genómico de Bacterias gram negativas 60

ANEXO 8: Multiplex-PCR para identificación de especies de *Arcobacter*. 62

ANEXO 9: Electroforesis en Gel de Agarosa..... 64

ANEXO 10: Determinación de actividad antimicrobiana. 66

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de virulencia descrita para *Arcobacter.* 16
Figura 2. Mecanismo de patogenia 17
Figura 3. Muestreo de caninos de las diferentes zonas de Loja..... 23
Figura 4. Muestreo de aves de corral en las diferentes zonas de la ciudad de Loja..... 23
Figura 5. Cepas de *Arcobacter* spp., aisladas en aves de corral**.** 24
Figura 6. Electroforesis de especies de *Arcobacter* de muestras de heces de caninos..... 33
Figura 7. Especies de *Arcobacter* aisladas de muestras de heces de aves de corral. 34
Figura 8. Método de aislamiento de especies de *Arcobacter* mediante técnica de filtrado... 54
Figura 9. Microscopía óptica (100X). Tinción de Hucker. 55
Figura 10. Pruebas Catalasa (izquierda) y Oxidasa (derecha). 56
Figura 11. Crecimiento en Agar MacConkey. 57
Figura 12. Caldo tioglicolato inoculado con una cepa de *Arcobacter* spp..... 58
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa**.** 65
Figura 14. Determinación de la actividad antimicrobiana 66

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de *Arcobacter*..... 7
Tabla 2. Especies del género *Arcobacter***.** 9
Tabla 3. Secuencias de primers utilizados para la Multiplex-PCR para identificación de especies de *Arcobacter* spp. 25
Tabla 4. Puntos de corte utilizados para determinar la susceptibilidad antimicrobiana. 26
Tabla 5. Prevalencia de *Arcobacter* en heces de caninos. 28
Tabla 6. Identificación de especies de *Arcobacter* en caninos..... 29
Tabla 7. Prevalencia de *Arcobacter* en aves de corral. 30
Tabla 8. Identificación de especies de *Arcobacter* en muestras de aves de corral. 32

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Actividad antimicrobiana de especies de *Arcobacter* en caninos. 35
Gráfica 2. Actividad Antimicrobiana de especies de *Arcobacter* en aves de corral..... 36

ABREVIATURAS

EUCAST	Comité Europeo de pruebas de Susceptibilidad.
CA-SFM	Comité de Antibiograma de la Sociedad Francesa de Infectología
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Rrna	Ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
HeLa	Línea celular
CHO	Línea celular, células derivadas de ovario de hámster chino
Hep-2	Human Epidermoid carcinoma strain #2

RESUMEN

Arcobacter es un bacilo gram negativo curvo perteneciente a la familia *Campylobacteraceae*, considerado como un patógeno emergente de carácter zoonótico. Los caninos y aves de corral se estiman que son una importante fuente de transmisión de *Arcobacter* para el hombre. En el presente estudio se determinó la prevalencia de *Arcobacter* spp., aisladas de heces de caninos y aves de corral en la ciudad de Loja. Se recolectaron 50 muestras de heces de caninos. La prevalencia para *Arcobacter* spp*.,* fue de 12% (6/50), de las cuales 83.3 % (5/6) fueron *A. butzleri* y el 16.7 % (1/6) *A. cryaerophilus*. En aves de corral se recolectaron 50 muestras cloacales con una prevalencia del género *Arcobacter* de 14% (7/50), el 85.7% (6/7) de *A. butzleri* y 14.3% (1/7) *A. skirrowii*. La actividad antimicrobiana en las cepas de caninos se determinó una resistencia del 100% para ácido nalidíxico y 83.3% para tetraciclina; y un 83.3 % de sensibilidad para ciprofloxacina y gentamicina. Por otro lado en las cepas de gallinas presentaron resistencia del 100% para ácido nalidíxico y fueron susceptibles con un 100% para gentamicina. La detección de *Arcobacter* en caninos y aves de corral es importante ya que es un patógeno emergente que representa un riesgo en la población y constituye un problema de Salud Pública.

PALABRAS CLAVE: *Arcobacter*, prevalencia, caninos, gallina.

ABSTRACT

Arcobacter is a curved negative Gram bacillus belonging to the family *Campylobacteraceae,* considered an emerging zoonotic pathogen. Canines and poultry are estimated to be an important source of transmission of *Arcobacter* to man. In the present study, the prevalence of *Arcobacter* spp., was determined, isolated from feces of canines and poultry in the city of Loja. 50 stool samples of canines were collected. The prevalence for *Arcobacter* spp., was 12% (6/50), of wich 83.3% (5/6) were *A. butzleri* and 16.7% (1/6) *A. cryaerophilus.* In poultry, 50 cloacal samples were collected with a prevalence of the genus *Arcobacter* of 14% (7/50), 85.7% (6/7) of *A. butzleri* and 14.3% (1/7) A. skirrowii. The antimicrobial activity in the canine strains was determined to be 100% resistant to nalidixic acid and 83.3% to tetracycline; and 83.3% sensitivity for ciprofloxacin and gentamicin. On the other hand, chicken strains showed 100% resistance to nalidixic acid and were 100% susceptible to gentamicin. The detection of *Arcobacter* in canines and poultry is important since it is an emerging pathogen that represents a risk in the population and constitutes a public health.

KEY WORDS: *Arcobacter,* prevalence, canines, chicken

INTRODUCCIÓN

Arcobacter fue aislado por primera vez de fetos abortados de bovinos y porcinos en 1977. Se lo designó sobre la base de su morfología, aerotolerancia y crecimiento como un organismo del género *Campylobacte*r. Más tarde en 1991, Vandamme propuso el género *Arcobacter***,** perteneciente a la familia *Campylobacteraceae* (Wang, Seo, Lee y Choi, 2014)**.** Es un bacilo gram negativo, curvado o en forma espiral. Presenta un flagelo polar que le dota movimiento típico de sacacorchos. Mide entre 0.2 y 0.9 µm de ancho y 0.5 -3 µm de longitud. Las colonias de *Arcobacter* comúnmente carecen de pigmentación. En cultivos jóvenes se encuentran en forma de S y en cultivos viejos en forma cocoide o esférica. En la actualidad comprende 25 especies, aisladas de una gran diversidad de hospedadores y nichos ecológicos. Diversas investigaciones han reportado que la especie más frecuentemente aislada es *A. butzleri,* seguida de *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* (Calvo, Arias y Fernández, 2013). Dichas especies han sido identificadas en países desarrollados como patógenos emergentes causantes de trastornos en el ser humano incluyendo vómitos, dolor abdominal, enterocolitis aguda, diarrea, fiebre y ocasionalmente septicemia; también es causante de abortos, mastitis y diarrea en animales. Existen casos en donde han sido aisladas de muestras fecales en animales sanos. Se conoce que el agua y alimentos contaminados juegan un papel muy importante, ya que se han identificado cepas de *Arcobacter* spp, siendo un medio de transmisión tanto para el ser humano como para los animales (Bayas, 2016; Ramees et al. 2017; Ruiz, 2005).

En países desarrollados y en vías de desarrollo, las infecciones por *Arcobacter* spp*.,* son descritas como zoonosis, sin embargo en América Latina existen escasos reportes sobre la frecuencia de este agente etiológico en caninos y aves de corral (Larrauri et al., 2014). En el Ecuador aún no se ha descrito información sobre su prevalencia.

Una nueva ruta de transmisión de esta bacteria es el contacto cercano con mascotas, en este caso los caninos, sin embargo existen escasos datos sobre su prevalencia. En un estudio realizado en el sur de Chile, establece que de 60 muestras solo 3.3% (2) fueron positivas para *Arcobacter* presentando una baja frecuencia (Calvo et al., 2013).

Las aves son reconocidas como un reservorio importante para el género *Arcobacter*, en la carne de pollo se aísla con mucha frecuencia, sin embargo en el tracto intestinal no se aísla con la misma frecuencia (Fernández et al.,2007), posiblemente la temperatura corporal de los pollos (41°) no contribuye a crear un ambiente favorable para las especies de *Arcobacter.* También aduce una mayor prevalencia en pollos de 56 semanas de edad con respecto a pollos de 8 y 16 semanas. Menciona Larrauri et al., 2014 que en 61 muestras cloacales de pollos 8 fueron positivas para el género *Arcobacter*. Por otro lado en un estudio

realizado en Chile señala que de 60 muestras de pollos 12 fueron positivas para el microorganismo con una prevalencia del 20% (Fernández et al., 2007).

En la actualidad los métodos moleculares han proporcionado avances en la detección y diferenciación eficiente a nivel de género y especie, una técnica convencional basada en la amplificación de ácidos nucleicos es la multiplex-PCR. Se dirige a genes ribosómicos 16S rRNA y el gen 23S rRNA, que son ampliamente utilizados para la detección de especies de *Arcobacter* (Abdelbaqi et al., 2007).

En cuanto a la actividad antimicrobiana actualmente no existen estudios que refieran datos precisos sobre la susceptibilidad antimicrobiana de *Arcobacter* en caninos y aves de corral. Sin embargo existen investigaciones en donde han elaborado ensayos E-test, difusión en agar disco y métodos de microdilución en caldo; que han informado que algunas cepas de *Arcobacter* son resistentes a clindamicina, ciprofloxacina, azitromicina y ampicilina (Calvo, Arias y Fernández, 2013).

Las fuentes y vías de transmisión de *Arcobacte*r en Ecuador aún son desconocidas, por ello es de gran interés realizar un estudio sobre la prevalencia de *Arcobacter* en caninos y aves de corral. Para conocer su distribución ecológica, viabilidad en el ambiente y comportamiento de las cepas frente a los antimicrobianos. Siendo los animales en algunos casos reservorios de *Arcobacter*, que conlleva a un alto riesgo de contaminación hacia el hombre que puede ocasionar enfermedades gastrointestinales debido a la tasa elevada de mascotas, como son los caninos, y el consumo de carne en la población.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes.

Arcobacter forma parte de la familia *Campylobacteraceae*. Conocidos en la actualidad como campilobacterias, observados por primera vez en 1881 por el alemán Escherich a partir de heces de niños con diarrea, incluyéndolo en un primer momento dentro del género *Vibrio* debido a su morfología en espiral (Bayas,2016). McFayean y Stockman, en 1913, describieron como organismos *Vibrio/Spirillum* por su morfología curvada, implicada en abortos e infertilidad en ganado bovino (Vandamme et al., 2008). En 1963, Sebald y Verón, debido a sus bajas composiciones de base de DNA, su crecimiento y su metabolismo no fermentativo, propusieron el género *Campylobacter* (Vandamme y De Ley, 1991).

La disponibilidad de procedimientos para el aislamiento de *Campylobacter*, llevó a renovar la investigación en los años 80, como resultado se aislaron de una diversidad de fuentes humanas, animales y nichos ecológicos; especies similares a *Campylobacter*. Las pruebas bioquímicas clásicas utilizados habitualmente en la identificación de bacterias producían resultados negativos o variables para las especies de *Campylobacte*r. Esta falta de caracteres diferenciales llevó a definir como organismos similares a *Campylobacter (*Bayas, 2016).

Arcobacter se descubrió por primera vez de fetos abortados de bovinos en el Reino Unido en 1977. Los miembros de este género al principio fueron nombrados como *Campylobacter* c*ryaerophilus* debido a las similitudes en su morfología, aerotolerancia y crecimiento. Estas especies fueron posteriormente reclasificadas en el género *Arcobacter* (Collado y Figueras, 2011; Goni et al., 2017), con ayuda de métodos de inmunotipificación e hibridación de DNA-rRNA se dio la formación de este género *Arcobacter*. En donde *Campylobacter cryaerophilus* se convirtió en *A. cryaerophilus* y *Campylobacter nitrofigilis* en *A. nitrofigilis*. En 1991, aislaron un grupo de campilobacterias aerotolerantes de humanos y animales con enfermedades diarreicas, presentaban una homología DNA-DNA diferente a *C. cryaerophilus*, por lo que propusieron una nueva especie *C. butzleri* (Bayas, 2016).

En el mismo año se dio la inclusión de una nueva familia *Campylobacteraceae*, así como la agrupación en la misma de los géneros *Campylobacter* y *Arcobacter*, esto se basó en los caracteres fenotípicos y genotípicos que tenían en común. Más tarde se descubrió otra nueva especie, *Arcobacter skirrowii*, rescatado de animales enfermos así como de abortos (Bayas, 2016; Vandamme et al., 2008).

Se ha logrado avances importantes en los últimos años en la comprensión de su taxonomía y patogenicidad, incluyendo publicaciones sobre el genoma de *Arcobacter butzleri* proveniente de una cepa clínica humana, que explica información detallada sobre la fisiología y la genética de este organismo (Collado y Figueras, 2011).

1.2. Clasificación taxonómica

Arcobacter está identificado como parte de la superfamilia VI rRNA, dentro de la clase beta Proteobacterias. En ella incluye los géneros *Campylobacter*, *Helicobater*, *Wolinella* y *Sulfurospirillum*. Pero *Campylobacter* y *Arcobacter* están separados en la familia *Campylobacteraceae*, basándose en los caracteres fenotípicos y genotípicos que tienen en común y que a su vez los separa de otros géneros (Son, 2005).

Según la última clasificación en el Bergeys Manual of Systematic Bacteriology (2012), *Arcobacter* forma parte de la familia *Campylobacteraceae* que se puede observar en la **Tabla 1.**

Tabla 1. Taxonomía de *Arcobacter.*

Dominio	Bacteria
Phylum BXII	Proteobacteria
Clase V	*Epsilonproteobacteria*
Orden I	Campylobacterales
Familia I	*Campylobacteraceae*
Género I	*Arcobacter*
Género II	*Campylobacter*
Género III	*Sulfurospillum*

Fuente.(Collado, 2010)

Elaboración: Autora

El género *Arcobacter* fue propuesto en 1991 por Vandamme para acomodar dos especies aerotolerantes de *Campylobacter* que son *C. cryaerophilus* y *C. nitrofigilis*. La primera aislada de diferentes fuentes (heces, tractos reproductivos y fetos abortados de varios animales de granja), la segunda especie fue encontrada de la raíz de *Spartina alterniflora* y es una bacteria fijadora de nitrógeno. En 1992, Vandamme modificó y amplio el género, con la reclasificación de *Campylobacter butzleri* como *A. butzleri* aislado originalmente de humanos y animales con diarrea, mientras que *A. skirrowii* se obtuvo principalmente de fetos abortados de porcinos, ovinos, bovinos y prepucio de toros. Un porcentaje mínimo también se obtuvo de heces de estos animales (Collado y Figueras, 2011).

Dentro de la especie *Arcobacter cryaerophilus*, se definieron dos grupos llamados 1A y 1B, mediante técnicas de RFLP (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción). El grupo 1B es el más frecuente que 1A, aislándose hasta el momento simultáneamente de productos alimenticios y de muestras clínicas de animales y humanos (Collado y Figueras, 2011).

En el 2005, se describieron otras dos especies, una de ellas *Arcobacter cibarius* aislada de los canales donde faenan pollos en Bélgica, y el otro *Arcobacter halophilus*, encontrada de una laguna hipersalina en Hawai; representando así la primera especie de *Arcobacter* con característica halófila obligatoria (Ramees, Dhama, Karthik, Rathore, Kumar, Saminathan, Tiwari, Malik, y Singh, 2017). Recientemente se han añadido nuevas especies, *Arcobacter mytili*, aislado de mejillones en España, es la primera especie del género incapaz de hidrolizar indoxil-acetato. *Arcobacter thereius* aislada de hígado y riñón de fetos abortados de porcinos y de muestras cloacales de pato (Houf *et al.*, 2009; On, 2001). *Arcobacter marinus* aislada de una muestra de agua de mar, estrellas de mar y algas en Corea (Kim,Hwang y Cho, 2010).

La taxonomía del género *Arcobacter* se ha basado en el análisis del gen 16S rRNA. Algunos genes de *Arcobacter*, como gyrA y rpoB –rpoC, los han indagado con el fin de diferenciar las especies y sus relaciones filogenéticas (Collado, Cleenwerck,Trappen, De Vos y Figueras, 2009;Collado, Guarro y Figueras, 2009).

Han propuesto una nueva especie *Arcobacter sulfidicus* siendo microaerofilico obligado capaz de oxidar sulfuros, también a varias nuevas especies como *Arcobacter valdiviensis*, recuperado de muestras de pollo (Collado, 2010). Algunas especies como *A. cloacae* y *A. defluvii* se han aislado de aguas residuales, y recientemente recuperaron *A. faecalis* y *A. lanthieri* de un tanque séptico de desechos humanos y de estiércol del ganado porcino (Banting y Figueras, 2017).

La base de las secuencias del gen 16S rRNA que se encuentran en base de datos publicados, infiere de la existencia de varias especies de *Arcobacter* potencialmente novedosas, de diferentes hábitats como los campos de petróleo, la avicultura de bacalao y aguas residuales (Collado y Figueras, 2011).

Las diversas especies del género *Arcobacter* han sido aisladas de diferentes nichos ecológicos y hospedadores, de las 25 especies, 4 se consideran patógenas para animales y humanos: *A. butzleri, A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* y *A. thereius*. En la **tabla 2** se resume las especies de *Arcobacter* que están actualmente aceptadas.

Tabla 2. Especies del género *Arcobacter***.**

Nombre	Origen	
A. anaerophilus	Sedimentos estuarios	Sasi Jyothsna et al.,2013
A. aquimarinus	Agua de río	Levican et al., 2015
A. bivalviorum	Mejillones	Levican et al., 2012
A. butzleri	Heces de humanos	Kiehlbauch et al., 1991
A. cibarius	Carne de pollo	Houf et al., 2003
A. cloacae	Residuos urbanos	Levican et al. 2013a
A. cryaerophilus	Fetos ovinos, porcinos	Neill et al 1985 Vandamme et al., 1991
A. defluvii	Aguas residuales	Collado et al.,2011
A. ebronensis	Mejillones	Levican et al 2015
A. ellisii	Mejillones	Figueras et al.,2011a
A. faecis	Aguas residuales	Whiteduck-Leveille et al., 2015b
A. halophilus	Laguna hipersalina	Donachie et al 2005
A. lanthieri	Cerdo y estiércol de ganado	Whiteduck-Léveillée et al 2015
A. marinus	Aguas de mar, algas y estrella de mar	Kim et al.,2010
A. molluscorum	Mejillones	Figueras et al.,2011ª,2011b
A. mytili	Mejillones	Collado et al.,2009b
A. nitrofigilis	Raíces de *Spartina alterniflora*	McClung et al., 1983
A. pacificus	Aguas de mar	Zhang et al., 2016
A. skirrowii	Heces de ovinos	Vandamme et al., 1992b
A. suis	Heces de porcinos	Levican et al.,2013a
A. thereius	Abortos de porcinos y cloacas de pato	Houf et al.,2009
A. thophiarum	Heces de cerdo y abortados	De Smet et al.,2011
A. venerupis	Almejas	Levican et al.,2012
A. bivalviorum	Mejillones	Levican et al.,2002
A. acticola	Agua de mar	Park et al.,2016
A. lekithochrous	Larvas de vieira y tanques de agua	Diéguez et al., 2017
A. sulfidicus (candidato)	Aguas costeras	Wirsen et al.,2002

Fuente.(Bayas, 2016; Ramees et al., 2017).

Elaboración: Autora

1.3. Género *Arcobacter*

Descritos como patógenos emergentes en 1992 por Vandamme, pertenecen a la familia *Campylobacteraceae*. El término *Arcobacter* en latín significa ¨en forma de arco¨. Este microorganismo comprende 25 especies de las cuales cinco son de gran importancia *A. cryaerophilus*, *A. butzelri*, *A. thereius*, *A. skirrowii* y *A. cybarius* (Inzunza, 2005; Ramees et al., 2017; Vandamme et al.,1992)

1.3.1. Morfología y características bioquímicas

El género *Arcobacter* son bacilos gram negativos, curvados, ligeramente en forma de S o espiral cuando están en cultivos jóvenes y en cultivos viejos presentan una forma cocoidal o esférica. Miden entre 0.2 y 0.9 µm de ancho y 0.5 – 3 µm de diámetro. Es móvil debido a que disponen de un flagelo polar y tienen un movimiento similar de sacacorchos. Las colonias de *Arcobacter* normalmente carecen de pigmentación (Bayas, 2016). Tienen actividad oxidasa y catalasa positiva, en algunas ocasiones es variable. Reacción negativa con el rojo de metilo y con el Voges-Proskauer, no producen indol excepto *A. mytili* y *A. molluscorum*. Reducen nitratos y no hidrolizan el hipurato. Poseen un metabolismo quimioorganotrófico, utilizando gran variedad de fuentes de carbono como ácidos orgánicos y aminoácidos (Bayas, 2016; Calvo, Arias y Fernández, 2013; Inzunza, 2005)

La identificación de especies de *Arcobacter* utilizando pruebas bioquímicas estándar no es confiable debido a los requisitos de crecimiento exigentes y a su baja actividad metabólica observada dentro de las Proteobacterias (Ellis et al.,1977; Hausdorf et al., 2013).

Fenotípicamente *Arcobacter* es similar a *Campylobacter*, pero se distinguen por su capacidad para crecer a temperaturas más bajas entre 15-25°C, y bajo condiciones atmosféricas normales. No requieren de hidrógeno para crecer. La temperatura a la cual el 50% del DNA-rRNA híbrido es desnaturalizado es de 66°C (Calvo, Arias y Fernández, 2013). El contenido de G+C del DNA de *Arcobacter* oscila entre 27 y 31% en moles (Son, 2005).

En general las especies de *Arcobacter* presentan una tolerancia de al menos 5% de oxígeno (Bayas, 2016). *Arcobacter* se caracteriza por ser microaerofilico y aerotolerante. Dependiendo de la cepa o especie, los requisitos de crecimiento muestran un amplio rango de tolerancia entre 15°C a 37°C con un crecimiento óptimo de 30°C. Dependen del ion sodio, por lo que requieren concentraciones de sodio que van desde 0.5% al 4%. La especie *A. anaerophilus*, recientemente descrita demostró ser un anaerobio obligado, y la especie *A. halophilus* es un halófilo obligado que requiere de al menos 2% de NaCl en los medios para crecer (Banting y Figueras , 2017; Sasi Jyothsna, Rahul, Ramaprasad, Sasikala y Ramana, 2013).

Resisten la congelación hasta 6 meses a 20°C y hasta 24 meses a 70°C, por lo que temperatura de 55°C o más, inactivará al microorganismo rápidamente. Las cepas de *Arcobacter* toleran un rango de pH de 5.5 a 9.5, pese a que, el crecimiento óptimo sucede entre 6.8-8.0 (Banting y Figueras, 2017).

1.4. Principales especies zoonóticas de *Arcobacter*.

Las principales especies de *Arcobacter* spp., son *A. butzleri, A. cryaerophilus, A. skirrowii, A. thereius, A. cibarius*; las cuales se han descrito como patógenos en el hombre y en los animales.

- *Arcobacter butzleri*

Es un bacilo gramnegativo, no esporulado. Es ligeramente curvado, mientras que las demás especies tienden a ser más helicoidal (Son, 2005). Mide entre 0.2 y 0.4 µm de ancho por 1 a 3 µm de largo. Su identificación fenotípica en ocasiones se dificulta debido a su limitada actividad metabólica y la escases de pruebas, que pueden llevar a resultados erróneos (Fernández y Jaramillo, 2016). Posee un crecimiento más rápido en comparación con las demás especies (Banting y Figueras, 2017).

Parece ser que la especie *A. butzleri* es la menos exigente ya que muestra crecimiento en lactosa, glucosa y citrato con algunas cepas que muestran tolerancia a 42°C, además de que crece al 1.5% de NaCl y tiene capacidad de reducir el nitrato (Levican, Collado y Figueras, 2013; Vandamme et al.,1992)

Es considerado como un enteropatógeno emergente y potencial agente zoonótico. *A. butzleri* es la especie más frecuentemente aislada, tanto de procesos infecciosos, como de reservorios, de muestras ambientales y de alimentos de origen animal (Fernández et al.,2014). En sus inicios fue aislada de muestras humanas y animales con diarrea, se caracteriza por una diarrea acuosa con dolor abdominal, náuseas y vómito, asociada con enteritis, calambres abdominales, bacteriemia y apendicitis en humanos. En animales enteritis y abortos. Se describe su capacidad de adherencia al epitelio, que causa disfunción de la barrera epitelial provocando cambios en las proteínas de unión estrecha, además de inducir apoptosis epitelial, con lo que se produce una diarrea tipo fuga de flujo. Tiene el potencial de invadir otras partes del cuerpo y producir complicaciones, encontrándose en cuadros clínicos como cirrosis hepática y apendicitis gangrenosa aguda (Calvo *et al*., 2013).

-*Arcobacter cryaerophilus*

Especie predominante asociada en casos de bacteriemia y diarrea en humanos, de abortos en animales como bovinos, ovinos y porcinos; muestras fecales de ganado

vacuno, cerdos, caballos y en casos de mastitis en el ganado. Se establecen dos grupos (1A y 1B), difieren en sus proteínas y patrones ácidos, como también en la longitud de los fragmentos polimórficos de los genes rRNA, los cuales fueron separados mediante diferentes técnicas como RFLP (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción) en genes 16s y 23s. Sugiere que se les podría asignar un rango taxonómico distinto, sin embargo no han propuesto modificaciones (Calvo, Arias y Fernández, 2013; Collado, 2010; Vandamme et al., 2008)

-*Arcobacter skirrowii*

Aislada de muestras de heces de ovejas con diarrea, de abortos en cerdos, fetos bovinos y ovinos, y del prepucio de toros. Asociada en pacientes con diarrea crónica y en ocasiones en pacientes con gastroenteritis, tanto en niños como en adultos. Su patogenia sigue siendo desconocida (Calvo et al., 2013; Vandamme et al., 2008)**.**

-*Arcobacter thereius*

Aislada de hígados y riñones de cerdos con abortos espontáneos y en muestras fecales de patos (Houf et al.,2009)**.**

-*Arcobacter cibarius*

Descrita en 2005, aislada de la carne de pollos en Bélgica. Revelan similitudes del gen 16S rRNA del 97.5 % con *A. cryaerophilus* y un 96.5 % con respecto a *A. butzleri* (Houf et al.,2005).

1.5. Reservorios y rutas de transmisión

Algunas especies de *Arcobacter* están asociadas con plantas y animales, se encuentran en los órganos reproductores y en fetos abortados de varios animales, tracto intestinal de seres humanos y animales. Los reservorios incluyen agua, ríos, lagunas, alcantarillado, comunidades de campos petrolíferos, ambientes marinos e hipersalinos, aguas termales de aguas profundas. El consumo de agua contaminada, alimentos de origen animal o la contaminación directa con la materia fecal, por contacto directo con el individuo enfermo o reservorios naturales, se consideran vías de transmisión para el género *Arcobacter* (Bayas, 2016)**.**

1.5.1. Transmisión por agua

Probablemente el agua es un componente clave para la transmisión de *Arcobacter*, en la mayoría de estudios que analizan las tasas de transmisión en animales, los suministros de agua presentaban *Arcobacter*. Esto es común en operaciones agrícolas, donde el agua es consumida por los animales o utilizada para lavar los cadáveres de animales y productos vegetales (Collado y Figueras, 2011).

Demostraron que posee la capacidad de formar biopelículas, sobreviviendo en superficies abióticas. Identificaron *Arcobacter* en biofilms de tuberías de distribución de agua y en equipos de los mataderos de aves de corral. Con la observación de que *Arcobacter* puede sobrevivir a largos períodos en el agua o incluso replicarse a temperatura ambiental y a 4 - 10°C (Ramees et al.,2017).

Propagación de estiércol o la liberación de aguas residuales al aire libre, llegando por medio de la lluvia a los acuíferos o las vías fluviales cercanas, lo que puede provocar la posible transmisión al hombre. También han descrito la asociación de *Arcobacter* con plancton y organismos unicelulares. Dos brotes se relacionaron en aguas de pozo contaminadas, siendo el primer informe en EE.UU, aislando *A. butzleri* del agua subterránea. Las fallas con el proceso de cloración utilizado para la desinfección del agua potable se han considerado a causa de la presencia de *Arcobacter* (Banting y Figueras, 2017).

Las especies de *Arcobacter* son autóctonas de los ambientes acuáticos, aunque también se ha observado prevalencia de estas en las heces de animales de granja y en los efluentes de la exportación agrícola. Sin embargo, *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* son más frecuentes en el agua que está contaminada. Estas especies ingresan al agua de mar, mediante el agua dulce contaminada, donde coexisten con otras especies como *A. marinus* o *A. halophilus*, que han sido aislados solo en esos ambientes. Un importante reservorio para este organismo son las aguas residuales, donde mostraron una diversidad de especies del género *Arcobacter*, incluso identificaron una nueva especie *A. defluvi* (Collado y Figueras, 2011).

El agua sometida a un proceso inadecuado de potabilización puede ser señalada como un factor de riesgo en la adquisición de enfermedades diarreicas asociadas con *Arcobacter* (Collado et al., 2008; Fong et al.,2007). Por ejemplo se confirmó la presencia de *Arcobacter* en plantas de tratamiento de agua potable en Alemania y en España (Bayas, 2016).

1.5.2. Transmisión por animales

El contacto con heces de mascotas o simplemente el lamido, es una potencial vía de transmisión. Recientemente en un estudio, empleando multiplex-PCR, se reportaron altas prevalencias de *A. butzleri* y *A. cryaerophilus*, las muestras fueron tomadas del hisopado oral de gatos; también han reportado la presencia de la bacteria en perros, mapaches y tortuga de galápagos con una prevalencia relativa. Sugiere que estos animales podrían desempeñar un papel importante en la epidemiología de este agente etiológico, ya que comparten el ámbito urbano o suburbano con los seres humanos (Collado y Figueras, 2011).

Existen algunas especies de *Arcobacter* que pueden compartir al mismo tiempo nichos ecológicos en especial ambientes húmedos, en un estudio que indican que *A. butzleri* puede ingresar en amebas (*Acanthamoeba castellana*) y ubicarse en el interior de vacuolas. En donde puede sobrevivir al menos por 10 días, de lo que podría constituir un eventual reservorio de *A. butzleri* en el medio ambiente y actuar como vector, para que la bacteria se transmita de un ambiente o de un hospedador a otro (Fernández *et al*., 2014).

Probablemente las aves de corral producidas para el consumo humano son una fuente importante de *Arcobacter*. Varios estudios demuestran tasas de aislamiento de *Arcobacter* de la carne y en el matadero de aves de corral, hasta el 100%. Las cifras de aislamiento de *Arcobacter* son variables ya que actualmente no se adopta un método de aislamiento estándar. De acuerdo con los informes actuales, las especies de *Arcobacter* comúnmente aisladas de aves de corral son *A. butzleri, A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* (esta frecuencia es similar a la detectada a partir de muestras de heces humanas). Durante años no estuvo claro de donde es la fuente de *Arcobacter*, debaten si *Arcobacter* se encuentra en el intestino de los pollos o en el agua de proceso que podría ser la fuente de contaminación para los cadáveres de pollo. Sin embargo estudios posteriores demostraron que *Arcobacter* puede habitar en el intestino de pollo, pero que la edad de los animales y el método de recuperación e identificación influyen en la prevalencia de *Arcobacter* (Banting y Figueras, 2017).

Estudios demuestran que existe transmisión transplacentaría de *Arcobacter* en cerdas, y en lechones por transmisión postnatal o con el ambiente. Además, han demostrado que los tractos intestinales y oviductos de las gallinas reproductoras pueden infectarse con *Arcobacter*, aunque no se encontraron evidencias de transmisión de gallinas a huevos (Collado y Figueras, 2011).

1.6. Epidemiología

La mayoría de infecciones causadas por *Arcobacter* permanecen asintomáticas por naturaleza y solo unas pocas presentan condiciones clínicas. La distribución de *Arcobacter* es actualmente aún desconocida debido a la escaza información que existe, pero es probable que tenga una distribución más amplia que *Campylobacter*; debido a su capacidad de sobrevivir y replicarse en el agua. Hasta el momento hay poca información proveniente de cuatro continentes, lo que puede sugerir una amplia distribución (Banting y Figueras, 2017). En animales, *Arcobacter* causa abortos, diarrea y mastitis (Aydin, Gümüşsoy, Atabay, Iça y Abay, 2007; Collado y Figueras, 2011; On et al.,2002; Ramees et al.,2017).Ciertas especies del género *Arcobacter* son consideradas como patógenos entéricos emergentes y de origen zoonótico (Fernández et al., 2007). Ha sido aislada de ciertos animales

domésticos como, aves de corral, ganado porcino, ovino, vacuno y canino; en fetos abortados de porcinos y bovinos, de vegetales y humanos. Algunas especies de *Arcobacter* se han aislado de superficies de plantas procesadoras de carne, agua potable, alcantarillas, agua de río y de mar. La especie *Arcobacter* no forma parte de la flora intestinal y el hombre se puede infectar y verse afectado por dicho organismo (Calvo *et al,.* 2013).

Menciona en un estudio realizado en Chile que existe una prevalencia del 20 % en muestras cloacales de pollos y de heces de caninos un 3% (Fernández et al., 2007). Se ha encontrado *Arcobacter* de muestras fecales de aves de corral; mencionando que podrían ser un reservorio natural de especies de *Arcobacter*. En varios países, como Japón, Australia, países bajos y europeos han aislado la especie *Arcobacter* de muestras de pollo con una prevalencia del 23 al 100%, lo que les llevó a sugerir que el pollo puede ser un reservorio significativo (Amare *et al.*, 2011), en América Latina existen escasos estudios sobre la prevalencia de esta bacteria en caninos y aves de corral, así mismo en Ecuador no existen datos sobre su frecuencia.

1.7. Patogenia

Arcobacter spp., se lo ha identificado en abortos y enteritis en el ganado, mientras que las infecciones humanas se lo asocian principalmente con enteritis y bacteriemia (Wesley y Miller, 2010). En la actualidad el potencial patogénico de *Arcobacter* permanece relativamente desconocido. Usaron modelos tanto in vivo como in vitro para comenzar a conocer el mecanismo que desencadena la infección por *Arcobacter*. Utilizaron ensayos in vitro, en cultivos de células humanas y animales para demostrar que varias especies de *Arcobacter* pueden adherirse e invadir células eucariotas, y pueden producir toxinas que dañan estas células huésped. Por otro lado, también realizaron estudios in vivo para explicar la fisiopatología y potencial patogénico de *Arcobacter* spp. Los datos de la secuenciación del genoma resaltaron marcadores potenciales que son útiles para el estudio y comprensión del mecanismo (Ferreira, Queiroz, Oleastro, y Domingues, 2015).

La determinación de la secuenciación del genoma de *A. butzleri* RM4018, fue un paso importante para la investigación de *Arcobacter*. Identificaron varios factores de virulencia putativos, de los cuales algunos presentaron homología con los determinantes factores de virulencia de *Campylobacter jejuni* (Miller et al., 2007).

Algunos genes putativos (cadF, cj349, mviN, pldA, tlyA, hecA, hecB, irgA) han recibido una atención especial debido a su homología con genes asociados a la patogenicidad en otros microorganismos (Ferreira et al., 2015).

Desarrollaron un ensayo de PCR para detectar estos nueve genes de virulencia putativos y evaluaron 319 cepas de *Arcobacter* provenientes de muestras de animales y humanas. En donde identificaron las especies *A. butzleri*, *A. skirrowii* y *A. cryaerophilus*; los nueve genes de virulencia putativos se encontraron en 26 de los 182 aislamientos de *A. butzleri*, en relación con las cepas de *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* que no se encontraron estos nueve genes. Lo que sugieren que *Arcobacter* tiene un comportamiento patogénico diferente o una mayor heterogeneidad del genoma (Douidah et al., 2012).

Los mecanismos de patogenicidad y virulencia de las especies de *Arcobacter* son aún muy poco conocidos, existen varios estudios sobre la capacidad de adhesión, invasión y citotoxicidad de este microorganismo en varias líneas celulares como HeLa, CHO, Hep-2, demostrando grandes diferencias. Estudios mencionan que estas diferencias pueden deberse al origen de las cepas (ambientales o clínicas), así como las diferentes líneas celulares utilizadas en los ensayos (Gugliandolo et al., 2008; Collado, 2010).

A. butzleri demostró ser la especie más invasiva en infecciones en animales experimentales (Wesley, Baetz y Larson, 1996), mientras que *A. cryaerophilus* la describieron por primera vez cuando observaron que las cepas indujeron la acumulación de líquido y electrolitos en un ensayo in vitro con células Hep-2 de ratas (Collado, 2010).

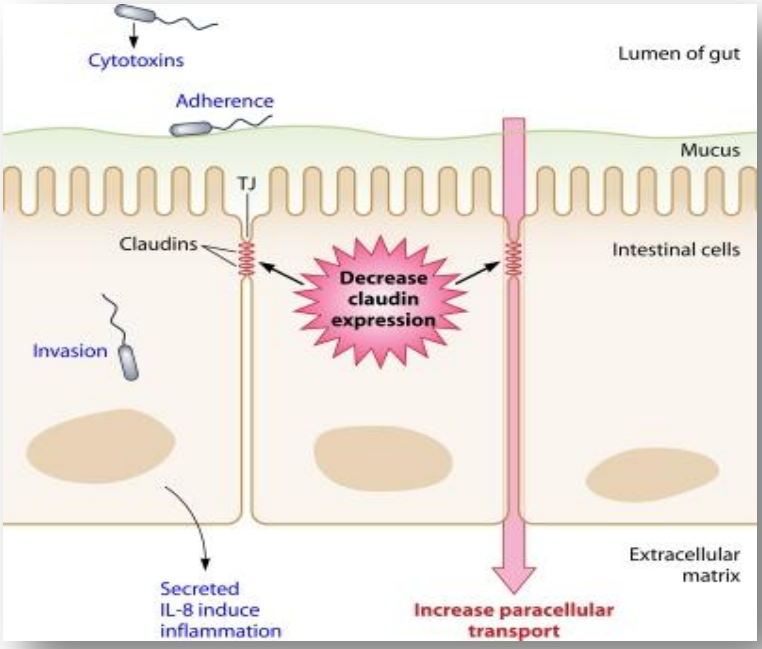


Figura 1. Mecanismo de virulencia descrita para *Arcobacter*.

Fuente y Elaboración: (Collado y Figueras, 2011)

Las especies de *Arcobacter* mostraron la capacidad de ocasionar citotoxicidad, adherencia, invasión e inflamación, (**Figura 1**). Se conoce muy poco sobre cuál es el rol que juegan en la infección las características del hospedador, como la edad, sexo y estado inmunológico, pero se estima que son factores predisponentes, que pueden facilitar o propiciar la infección por *A. butzleri*. La capacidad de adherencia al epitelio por parte de *A. butzleri*, causa un desequilibrio funcional de la barrera epitelial, provocando cambios en las proteínas de unión estrecha y apoptosis celular, produciendo la diarrea secretora. Además se ha observado el efecto citotóxico sobre células Vero, posiblemente a la producción de citotoxinas vacuolizantes (Collado y Figueras, 2011).

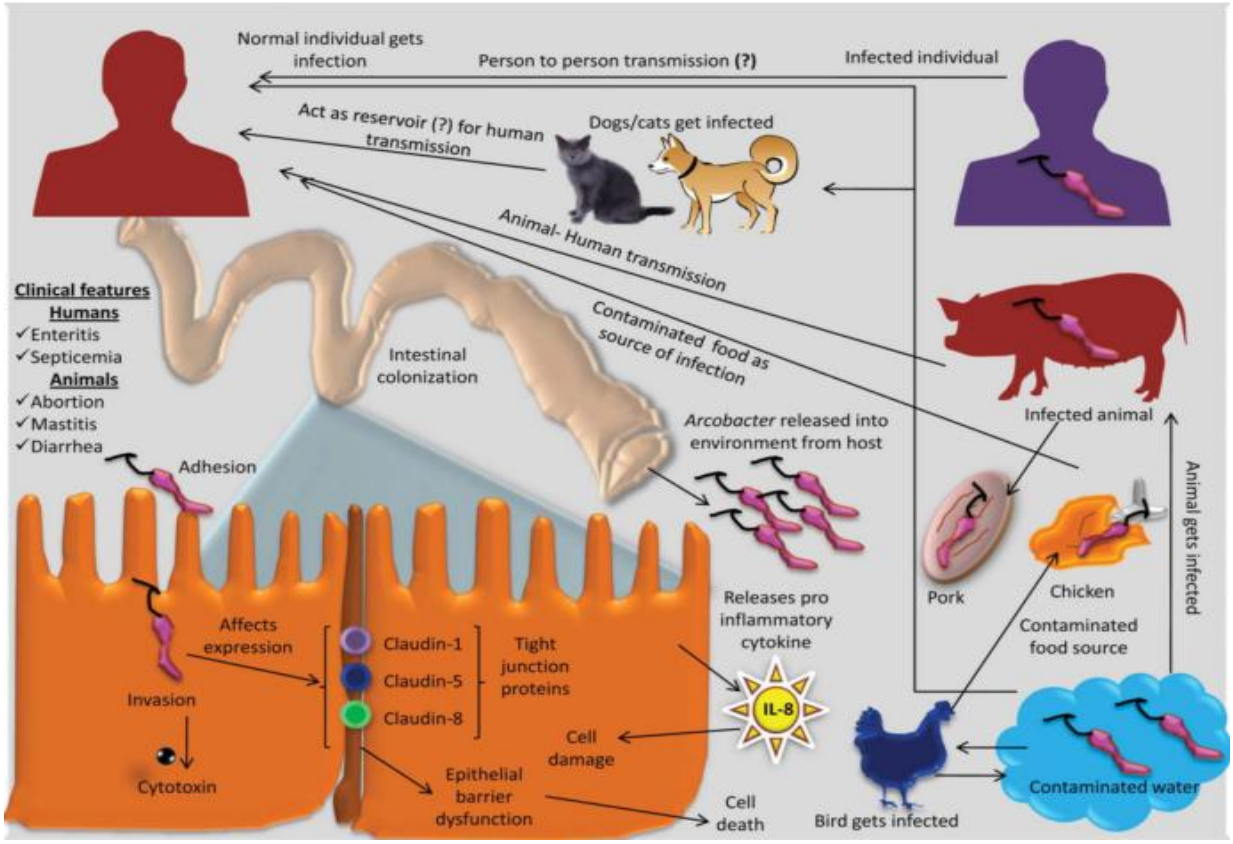


Figura 2. Mecanismo de patogenia

Fuente y Elaboración: (Ramees et al.,2017)

La transmisión de *Arcobacter* puede darse por diferentes fuentes como animales, alimentos contaminados o agua. Después de la entrada de *Arcobacter* a través del tracto digestivo, coloniza el intestino. Produce una citotoxina que afecta la expresión de la familia de proteínas de unión estrecha, claudina 1-5 y 8, produciendo la liberación de citocinas proinflamatorias IL-8 y la disfunción de la barrera epitelial. Lo que conduce a un desequilibrio en la barrera epitelial y aumento en el transporte paracelular, resultando en una diarrea de

flujo de escape **(Figura 2)**. Luego la bacteria es liberada al medio ambiente, donde contamina el agua y otras fuentes de alimentos (Ramees et al.,2017).

1.8. Sintomatología en caninos y aves de corral

Arcobacter ha sido frecuentemente aislado de los tractos intestinales y muestras fecales de diferentes animales de granja, sin embargo tienen la capacidad de causar enfermedad solo en algunos de ellos. Los efectos más graves que causan en animales incluyen abortos, mastitis y diarrea. *Arcobacter cryaerophilus* es la especie predominante asociada al aborto animal, mientras que *A. butzleri* y *A. skirrowii* son menos frecuentes (Calvo et al., 2013).

En un estudio comprobaron la presencia de *Arcobacter* en muestras de saliva de humanos y perros en Dinamarca, observaron que los humanos no sufrían de problemas dentales, pero en los caninos si (Pejchalova et al., 2016; Petersen, Harrington, Kortegaard y On, 2007).

La presencia *de Arcobacter* en heces fecales es bien conocido en aves de corral; no existen informes acerca de la asociación de la enfermedad en los animales, en algunas estudios mencionan que, las aves podrían ser un reservorio natural de la especie *Arcobacter* (Assata, Roy, Lemay y Montpetit, 2002; Ho, Lipman y Gaastra, 2008). Género *Arcobacter* se aísla con mayor frecuencia en la carne de pollo, pero no se aísla con la misma incidencia en su tracto intestinal. Una razón a ello sería posiblemente a la alta temperatura corporal de los pollos (41°C) lo que no contribuye a crear un ambiente favorable para el desarrollo de especies de *Arcobacter* (Fernández et al., 2007).

La edad de las aves también influye para que se dé la colonización de *Arcobacter* spp.,presentándose la bacteria en pollos de 56 semanas de edad en comparación con pollos de 8 a 16 semanas que carecían del microorganismo (Calvo et al., 2013).

1.9. Diagnóstico.

La identificación de *Arcobacter* en caninos y aves de corral no es específico pero de igual manera se lo realiza con los protocolos que existen para el aislamiento de *Arcobacter*. Debido a la falta de métodos de detección precisos, no existen datos claros sobre la prevalencia de *Arcobacter* en diferentes partes del mundo. El desarrollo de métodos de diagnóstico puede conducir a un informe más preciso de las infecciones humanas y obtener una prevalencia exacta de *Arcobacter* (Merga et al., 2011a; Prouzet-Mauléon, Labadi, Bouges, Ménard y Mégraud, 2006). Los avances actuales en el desarrollo de diagnósticos rápidos y específicos han proporcionado diversos métodos moleculares que brindan mayor sensibilidad y especificidad (Ramees et al.,2017).

El incremento de casos relacionados a infecciones en humanos y animales por parte de *Arcobacter* sugiere una importancia en Salud Pública. Su carácter patogénico ha sido

subestimada, ya que no se ha normalizado un protocolo estándar y específico para la identificación de *Arcobacter*, uno de los protocolos de aislamiento para *Arcobacter* comúnmente empleado se basan en el uso de un caldo de enriquecimiento suplementado con antibióticos, seguido de una filtración del caldo sobre agar sangre. Johson y Murano plantearon un nuevo caldo de enriquecimiento suplementado con cefoperazona y 5 – fluorouracilo, logrando una buena recuperación de *Arcobacter*. Otro método muy conocido fue diseñado por Houf, después de un estudio de susceptibilidad antimicrobiana a *Arcobacter,* en donde incorpora cinco antibióticos tanto en el caldo de enriquecimiento como en el medio de cultivo; siendo el único método validado para muestras fecales (Collado y Figueras, 2011).

Existe una variedad de métodos para el aislamiento de *Arcobacter* spp., que van desde técnicas modificadas de *Campylobacter* a métodos específicos para *Arcobacter*. El primer aislamiento que se informó de *Arcobacter*, emplearon un medio Leptospira-Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) suplementado con 5-fluorouracilo (Corry y Atabay, 2001). Algunos científicos evaluaron el uso de caldo de *Arcobacter* con un suplemento de cefoperazona, anfotericina y teicoplanina (Corry y Atabay, 2001). Desarrollo Houf un método específico de aislamiento de *Arcobacter* que implica el uso de cinco antibióticos (cefoperazona, trimetropin, anfotericina, novobiocina y 5-fluouracilo). Este método se utiliza actualmente en estudios sobre la prevalencia de *Arcobacter.* A pesar de la variedad de métodos de aislamiento, no existe un protocolo estándar pata determinar el aislamiento a partir de muestras fecales (Merga et al., 2011b).

Los métodos de cultivo generalmente se dividen en dos etapas para la detección de especies de *Arcobacter*, son la etapa de enriquecimiento y de siembra. El enriquecimiento se realiza principalmente a una temperatura de 30°C y la siembra, las muestras se inoculan en la superficie del agar o se inoculan en un medio sólido (Goni et al., 2017).

Para el aislamiento de *Arcobacter* de muestras de aves de corral, utilizaron agar de desoxicolato de cefoperazona de carbón modificado suplementado con antibióticos CAT. En 1996 desarrollaron un caldo medio agar modificado de cefsulodin-irgasanovobiocina (mCIN) con suplemento CAT para la recuperación de *Arcobacter* de aves de corral (Goni et al., 2017).

Debido a que la identificación fenotípica no resulta ser específica para *Arcobacter*, existen métodos moleculares que han sido diseñados para su identificación a nivel de especie. El método más usado a nivel mundial es el multiplex-PCR y demostró ser una alternativa rápida y específica para la detección simultánea de diferentes especies de *Arcobacter*. Siendo útil para evaluar la prevalencia, control de calidad de alimentos, potencial clínico y

zoonótico de *Arcobacter* (Collado y Figueras, 2011;Goni et al., 2017), aunque este método es muy conocido produce una identificación errónea de *A. nitrofigilis* con *A. skirrowii* debido a que se obtiene amplicones idénticos. En el año 2003, planteo otra m-PCR para la identificación de las especies consideradas de importancia clínica, es decir*, A. butzleri, A. cryaerophilus* y *A. skirrowii*, que han sido aisladas de muestras fecales y de alimentos. En 2008, un método molecular RFLP (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción) que se basa en el análisis de los polimorfismos del gen 16S rRNA para especies de *Arcobacter*. En donde utiliza una digestión con la enzima M*seI* y produce patrones específicos para todas las especies descritos en ese momento (Bayas, 2016); esta técnica ofrece una serie de ventajas, debido a que es más discriminatorio que los métodos fenotípicos y más rápido y simple que las técnicas moleculares no basadas en PCR, como la hibridación de DNA (Hurtado y Owen, 1997). Estos dos métodos suelen ser los más utilizados en cuanto a la identificación de *Arcobacter*, pero estudios demuestran que se encontraron resultados incongruentes entre estos métodos, por lo cual recomiendan una identificación final por secuenciación del gen 16S r RNA (Kabeya, 2003).

El ensayo PCR para la detección de especies de *Arcobacter*, es por medio de DNA purificado o lisado, en el que los resultados se obtienen en menos de 8 horas en comparación con varios días usando los métodos de cultivo (Goni et al., 2016).

Una técnica que ha existido hace más de 30 años e innovado el diagnóstico microbiológico es la técnica MALDI-TOF (Espectrometría de masas mediante desorción de Matriz Asistida por Láser/Ionización-TOF). Es un método confiable, específico y rápido, en donde permite la utilización de la espectrometría de masas en la identificación de microorganismos, mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosomales, a través de la creación de un espectro de masas que es específico para cada género y especie (Marshall et al., 1999; Plascencia, 2003).

La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y el esquema de tipado de secuencia de múltiples locus (MSLT) también son usadas para la caracterización de *Arcobacte*r. La PFGE evalúa las diversas características genéticas de los aislamientos de *Arcobacter* para caracterizar su epidemiología y la vigilancia de brotes. Otro método para la detección de especies de *Arcobacter* es la hibridación por inmunofluorescencia in situ (FISH) que proporciona resultados impresionantes debido a su diseño rápido y sensible, también permite la determinación de las características morfológicas, tamaño y contenido de rRNA celular bacteriano (Fera et al., 2009; Goni et al., 2017; Moreno et al., 2003).

1.10. Resistencia Antimicrobiana

La gravedad o prolongación de los síntomas puede justificar el uso de tratamiento antibiótico, pero en la mayoría de casos de enteritis y bacteriemia causados por el género *Arcobacter* suelen ser autolimitantes y no requieren de tratamiento antimicrobiano. Las pruebas de susceptibilidad para *Arcobacter* no están estandarizadas, por lo que han llevado a cabo diversos estudios a utilizar diferentes métodos, es decir, dilución en agar, difusión en agar disco y micro dilución en caldo. Resultados demuestran que cepas de *A. butzleri* son resistentes a clindamicina, azitromicina, ciprofloxacina, metronidazol, carbenicilina y cefoperazona. Las fluoroquinolonas y la tetraciclina han sido sugeridas para tratamiento de infecciones humanas y animales causadas por *Arcobacter* (Šilha, Pejchalová y Šilhová, 2017).

Las quinolonas se consideran como los medicamentos de primera línea para el tratamiento en infecciones por campylobacterias en pacientes humanos, actualmente existen pocos datos disponibles sobre los niveles de resistencia ante estos antibióticos entre las especies de *Arcobacter.* El mecanismo de acción de las quinolonas se basa en interferir en la síntesis de DNA (Lapongov et al., 2009), penetrar la pared celular a través de porinas, inhibiendo directamente la replicación bacteriana al interactuar con dos enzimas: DNA girasa, proteína tetramérica codificada por los genes gyrA y gyrB (Aldred et al.,2014 y Maruri et al.,2012)y la topoisomerasa IV, codificada por los genes prC y parE. Estas enzimas son necesarias para el superenrollamiento del DNA (Bayas, 2016).*A. butzleri* y *A. cryaerophilus* mostraron una mutación en el gen gyrA, el cual codifica la subunidad A del DNA girasa, que podría explicar la resistencia frente a las quinolonas, la presencia del gen cat (codifica una O-acetiltransferasa) se relacionó con la resistencia al cloranfenicol, la ausencia del gen upp(codifica el uracilo fosforribosiltransferasa) se asoció con la resistencia al 5 –fluouracilo (Collado y Figueras, 2011).

La multirresistencia a fármacos también es de gran preocupación ya que limita la elección a un tratamiento con antibióticos y su dosis. Las características genéticas como plásmidos, los trasposones, bombas de efluvio multidrug y los integrones están involucrados con la evolución y diseminación de la resistencia a múltiples fármacos en bacterias (Arhin, Draghi, Pillar, Moeck y Sahm, 2012).

CAPITULO II

METODOLOGÍA

2.1. Población de Estudio

Se recolectaron 50 muestras de heces de caninos, durante el periodo marzo-abril 2017 en la ciudad de Loja. La recolección de las heces de caninos se realizó con temperaturas que oscilaban entre los 18°C y los 23°C en los parques: Parque Recreacional Jipiro y Parque Lineal la Tebaida, las muestras fueron tomadas al azar y de deposiciones recientes.

Figura 3. Muestreo de caninos de las diferentes zonas de Loja.
Fuente: Autora
Elaboración: Autora.

Se recolectaron 50 muestras de aves de corral de los alrededores de la ciudad de Loja. Las condiciones físicas y ambientales en las que se encontraban las aves de corral fueron, en contacto físico con otras aves como pavos o patos, cerca de animales de compañía como perros y gatos. La estructura del corral en donde se encontraban las aves, eran en jaulas elaboradas con alambre y madera. Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología Clínica del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Técnica Particular de Loja.

Figura 4. Muestreo de aves de corral en las diferentes zonas de la ciudad de Loja.
Fuente: Autora
Elaboración: Autora.

2.2. Siembra e Incubación

Las muestras se inocularon en caldo de enriquecimiento para *Arcobacter* (**Anexo 1**) con la mezcla antibiótica de Houf, incubadas a 30 °C por 72 horas.

Aislamiento

Las muestras fueron filtradas con una membrana de triacetato de celulosa (poro de 0.45µm) sobre el medio de agar enriquecido para *Arcobacter* (**Anexo 2**). Se tomó 200 µl del caldo, homogenizando suavemente por pipeteo se colocó sobre las membranas, evitando salir del área del filtro y procurando salpicaduras en el agar. Se incubo por 48 a 72 horas a 30 °C en aerobiosis.

Identificación fenotípica

Pasado el tiempo de incubación, se procedió a revisar las placas observando el crecimiento de colonias transparentes, convexas, redondas, brillantes o de un ligero tono blanquecino grisáceo y que sigan la línea del estriado (**Figura 5**). Seguido a esto se realizó un análisis microscópico por medio de la tinción de Hucker (**Anexo 3**), observando así la morfología característica de *Arcobacter*.

También se realizaron pruebas de catalasa y oxidasa, siembra en agar Macconkey que se realiza con el fin de identificar presuntivamente a *Arcobacter butzleri (***Anexo 4***)*.

Las muestras identificadas presuntivamente como *Arcobacter* fueron crioconservadas a -80°C en glicerol y en DMSO (Dimetilsulfóxido) al 10% (**Anexo 6)**.

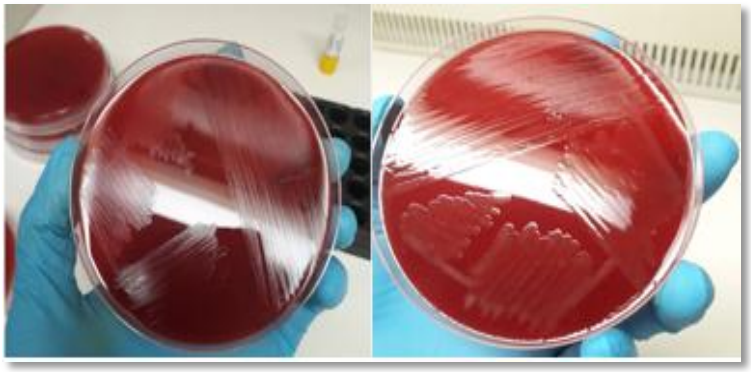


Figura 5. Cepas de *Arcobacter* spp., aisladas en aves de corral**.**

Fuente: Autora

Elaboración: Autora.

2.3. Identificación molecular.

2.3.1. Extracción de DNA.

De los controles positivos y de los cultivos puros de las cepas aisladas, se procedió a hacer la extracción de DNA, mediante el kit de purificación de DNA genómico Wizard® (PROMEGA) (**Anexo 7**). El DNA obtenido fue conservado a -8°C.

2.3.2. Multiplex PCR.

Las cepas identificadas presuntivamente como *Arcobacterspp.*, serán reconocidas de forma definitiva mediante la técnica de Multiplex PCR (Laid Douidah, De Zutter, Vandamme y Houf, 2010). El volumen final de reacción fue de 25µl (**Anexo 8).** Se utilizó 5 µl de DNA, 5X Green GoTaq Buffer, 10 mM dNTPs, 25mM $MgCl_2$, 5U/µl GoTaq Flexi DNA Polimerasa (Promega). Para la identificación a nivel de género se amplificó fragmentos del gen 16S rRNA y a nivel de especie dirigido al gen 23S rRNA. Se utilizaron los siguientes cebadores (**Tabla 3**) a una concentración de 5uM (Invitrogen^{TM}).

La amplificación de los genes se ejecutó mediante Touch Down, disminuyendo 0.5°C cada 2 ciclos (**Anexo 8**). Los amplicones obtenidos fueron detectados en un gel de agarosa Ultrapura (Invitrogen^{TM}) al 2%, en condiciones de corrida de 120 V, 60 minutos, 300 mA. Se empleó un marcador de peso molecular de 100pb (Promega). Las bandas se visualizaron en un transiluminador UV Enduro^{TM} GDSTOUCH Labnet.

Tabla 3. Secuencias de primers utilizados para la Multiplex-PCR para identificación de especies de *Arcobacter* spp.

Especie	Tamaño(bp)	Gen	Primer	Secuencia
Género *Arcobacter*		16S rRNA	ArcoF	5′-GCYAGAGGAAGAGAAATCAA-3′
A. butzleri	2061	23S rRNA	ButR	5′-TCCTGATACAAGATAATTGTACG- 3′
A. thereius	1590	23S rRNA	TherR	5′-GCAACCTCTTTGGCTTACGAA-3′
A. cibarius	1125	23S rRNA	CibR	5′-CGAACAGGATTCTCACCTGT-3′
A. skirrowii	198	23S rRNA	SkiR	5′-TCAGGATACCATTAAAGTTATTGATG-3′
A. cryaerophilus	395	Giras a A	GyrasF	5′-AGAACATCACTAAATGAGTTCTCT-3′
			GyrasR	5′-CCAACAATATTTCCAGTYTTTGGT-3′

Fuente:(Douidah et al.,2010)

Elaboración: Autora

2.4. Actividad antimicrobiana

La determinación de la actividad antimicrobiana de las cepas aisladas de *Arcobacter* se realizó mediante el método de difusión en disco en agar Muller Hinton (**Anexo 10**), enriquecido con extracto de levadura y sangre al 5%. Se utilizó seis antibióticos: ciprofloxacina (CIP-5µg), ácido nalidíxico (30µg), eritromicina (E-15µg), gentamicina (GM-10µg), ampicilina (AM-10µg), tetraciclina (TE-30µg). La interpretación de los resultados se lo realizó en base a las recomendaciones por el Comité de Antibiograma de la Sociedad

Francesa de Infectología (CA-SFM) y del Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) tomando en cuenta los puntos de corte para *Campylobacter* spp., y Enterobacterias (**Tabla 4**), ya que no existe en la actualidad puntos de corte establecidos para la evaluación de la susceptibilidad de especies de *Arcobacter*.

Tabla 4. Puntos de corte utilizados para determinar la susceptibilidad antimicrobiana.

Antibióticos	Concentración del disco (µg)	Diámetro del punto de corte (mm)	
		S ≥	R≤
Ciprofloxacina	5	26	26
Ácido nalidíxico	30	19	14
Eritromicina	15	20	20
Gentamicina	10	17	17
Ampicilina	10	19	14
Tetraciclina	30	30	30

Fuente: (EUCAST, 2017).
Elaboración: Autora

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Prevalencia de *Arcobacter* spp., en caninos.

De las 50 muestras recolectadas de heces de caninos el 12% (6/50) correspondieron para *Arcobacter* spp., (**Tabla 5**); en Ecuador no hay información sobre la prevalencia de este microorganismo. Es importante mencionar que las heces de caninos que fueron positivas para *Arcobacte*r no mostraron anormalidades en la consistencia y color; (Kurt Houf, De Smet, Baré y Daminet, 2008); por lo que podría haber animales que no presenten sintomatología.

Tabla 5. Prevalencia de *Arcobacter* en heces de caninos.

Muestras de heces	Número de muestras	Porcentaje
Positivas	6	12 %
Negativas	44	88 %
Total	50	100 %

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Sin embargo, existen cifras inferiores con respecto a nuestros resultados como por ejemplo Bélgica registra el 1.9%, en el sur de Chile un 3.3%, República Checa 3.7% y Japón el 4%. Existen datos que indican resultados alarmantes en la identificación de *Arcobacter*, Malaysia con el 54.4%. Es importante indicar que según investigaciones llevadas en India y Turquía de las muestras analizadas ninguna de ellas fue identificada para *Arcobacter* (Aydin et al., 2007; Fernández et al., 2007;Goni et al., 2016;Houf et al., 2008; Patyal, Rathore et al.,2011; Pejchalova et al., 2016). En Latinoamérica existen pocos estudios de *Arcobacter* en caninos. De igual manera en países europeos como en Bélgica, encontraron una prevalencia de 1.9% de *Arcobacter* en heces de caninos y el 0.7% portaban el microorganismo en la cavidad bucal (Houf et al., 2008).

Los resultados obtenidos mencionan que los caninos son una fuente significativa para *Arcobacter*, por ende es un factor que contribuye a infecciones en humanos. La incidencia es relativamente baja en perros domésticos pero elevada en caninos que se encuentran en refugios, callejeros o que estén en contacto con el ganado (Talay et al., 2016). Estudios han demostrado que *Arcobacter* causa problemas reproductivos en caninos; a menudo resulta en infertilidad, problemas crónicos de nacimiento y problemas entéricos (Vandenberg et al., 2004).

La presencia de *Arcobacter* en las mascotas en este caso los caninos, tiene implicaciones altas en la Salud Pública, ya que pueden transmitir la bacteria a los seres humanos a través de mordeduras o lamidos y a diseminarse hacia el medio ambiente (Rahimi, 2014).

Se podría decir que los caninos son considerados como un nuevo reservorio para *Arcobacter*, siendo un patógeno emergente de carácter zoonótico involucrado en infecciones entéricas. Es necesario estudiar la distribución ambiental de esta especie de la familia *Campylobacteraceae* para aportar información más amplia en nuestro país que permitan entender o comprender mejor la epidemiología de este grupo bacteriano.

3.2. Identificación de especies de *Arcobacter* en caninos.

En la identificación de especies de *Arcobacter* en caninos, la especie predominante en nuestro estudio fue *Arcobacter butzleri* con un porcentaje de 83.3% (5/6) mientras que *Arcobacter cryaerophilus* alcanzó un menor porcentaje de 16.7% (1/6). (**Tabla 6**).

Tabla 6. Identificación de especies de *Arcobacter* en caninos.

Resultados	Numero de muestras positivas	Porcentaje
Arcobacter butzleri	5	83.3 %
Arcobacter cryaerophilus	1	16.7%
Total	6	100 %

Fuente: Autora

Elaboración: Autora.

Estudios informan que detectaron *A. butzleri* y *A. cryaerophilus* a partir de la cavidad bucal de caninos a través de técnicas moleculares (Talay et al., 2016). En países como Japón y Australia, mostraron tasas de ocurrencia de 7% y 2.2% para *A. butzleri, A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* (Kabeya et al., 2004; Rivas, Fegan, y Vanderlinde, 2004). Las diferentes tasas de frecuencia indican que *A. butzleri* es la especie más frecuente seguida de *A. cryaerophilus* y con una prevalencia baja *A. skirrowii* (Kurt Houf et al., 2008;Houf, De Zutter, Verbeke, Hoof y Vandamme, 2003; Ongor, Cetinkaya, Aciky Atabay, 2004). Probablemente *A. butzleri* es una de las especies que crece con mayor rapidez. Se encuentra en la enfermedad del viajero afectando y generalmente causado por el consumo de alimentos contaminados (Goni et al., 2016). *A. cryaerophilus* se ha aislado de las heces de humanos, con una prevalencia comparable a la de los caninos, se han reportado casos de enteritis o septicemia en humanos asociados a esta especie *A. cryaerophilus*, por ello su patogenia aún está bajo discusión (Kurt Houf et al., 2008). De acuerdo con Houf *A. skirrowii* y *A. cryaerophilus* rara vez se detectaron en caninos, probablemente debido a su naturaleza de crecimiento lento y de ser susceptibles a los suplementos de antibióticos utilizados en los medios de aislamiento. La escases de un protocolo estándar dificultó la comparación de los resultados de las tasas de aislamiento de otros (Aydin et al., 2007).

Estudios mencionan (Zacharow, Bystroń, Wałecka-Zacharska, Podkowik, y Bania, 2015) que la baja recuperación de *A. cryaerophilus* puede deberse por la dificultad de las técnicas de aislamiento, también por la microflora competidora acompañante y algunos antibióticos utilizados en el medio, ya que han informado que la resistencia de *A. cryaerophilus* frente a cefalosporinas es muy baja. En nuestro estudio para el medio de enriquecimiento se utilizó una cefalosporina por lo que se presume que posibles aislamientos no se hayan recuperado del material estudiado, de igual manera hay que tener cuidado sobre la incidencia real de esta especie.

3.3. Prevalencia de *Arcobacter* spp., en aves de corral

De las 50 muestras obtenidas de hisopados cloacales de aves de corral, se estableció una prevalencia del 14% (7/50) de *Arcobacter* spp., (**Tabla 7**), con base a las características fenotípicas y análisis bioquímico, las colonias aisladas se mostraron de color blanco a gris blanquecino, pequeñas de 2-4mm de diámetro, convexas y opacas, lisas, transparentes; los presuntos aislamientos de *Arcobacter* fueron gram-negativos, observándose en el microscopio en forma de S curvos, oxidasa y catalasa positiva.

Tabla 7. Prevalencia de *Arcobacter* en aves de corral.

Resultados	**Numero de muestras**	**Porcentaje (%)**
Positivo	7	14
Negativo	43	86
Total	50	100

Fuente: Autora

Elaboración: La autora.

Existe datos similares con respecto a nuestros resultados como por ejemplo en Japón registra un 14.5%, en India el 14.67% y en Estados Unidos un 15%. Hay datos que indican una prevalencia del 20% en Chile y en otras investigaciones como en Malaysia que no detectaron la presencia de *Arcobacter* de hisopados cloacales (Amare et al., 2011; Fernández, Vera, y Villanueva, 2007; Kabeya, 2003; Patyal et al.,2011; Wesley y Baetz, 1999).

También reportan resultados de tasas superiores a los valores obtenidos de nuestra investigación, en un estudio en Tailandia, la frecuencia de aislamiento de *Arcobacter* fue de 100% de carne de aves, en Bélgica 90%, en Australia 73%, en Japón 48%, Malasia 39% y en Países bajos un 24% (Houf et al., 2001;Kabeya et al., 2004; Morita et al., 2004; Rivas et al, 2004). En Canadá, registraron el 97% de prevalencia de *Arcobacte*r spp., en carcasas de pollos, en Estados Unidos el 90% y en Francia un 81%. En Turquía, una investigación

determinó la prevalencia en canales de pollo del 95% (Amare et al., 2011; Festy, Squinazi, Marin, Derimay y Lior, 1993; Kurt Houf et al., 2001; Lammerding, Breynaert, VanEtterijack, Revets y Mets, 1997). En Brasil, registraron el 46,25% de prevalencia de canales de aves de corral (Oliveira et al., 2001). En España, registraron el 53% de prevalencia de *Arcobacter* de mercados minoristas (González et al.,2000) y en Alemania, aislaron el 52.3% de pollos de engorde recién sacrificados (Harrab, Schwarz y Wenzel, 1998). Sin embargo, existen cifras inferiores de *Arcobacter* spp*.,* en la India determinaron el 12% de aislamientos en carne de pollo (Patyal et al., 2011).

Las muestras recolectadas en el transcurso de este estudio, especialmente de gallinas, contenían altas concentraciones de microfloras acompañantes, concordando con otros estudios publicados (HO, LIPMAN, Y GAASTRA, 2006) . El bajo número de muestras positivas puede deberse tanto por una baja selectividad del medio de cultivo o por la baja densidad de *Arcobacter* en las muestras (Pejchalova et al., 2016)**.** Otro factor que puede influir en la prevalencia es la edad de los animales, en investigaciones observaron una baja prevalencia de *Arcobacter* spp. en pollos de 8 y 16 semanas, mientras que la mayor prevalencia se presentó en pollos de 56 semanas (Wesley y Baetz, 1999)**.**

Estadísticamente debería significar que solo una minoría de aves posee un alto nivel de *Arcobacter*, pero hay informes contradictorios que dan explicación a que se debe tener un método de aislamiento más específico y también en la del muestreo. Otros estudios mostraron claramente que el tiempo y el procedimiento de muestreo son cruciales, y puede afectar el resultado del estudio (Van Driessche y Houf, 2007)**.**

La importancia de las superficies contaminadas en relación con la posible transmisión de patógenos es evidente, varios estudios sugirieron que las bacterias sobreviven en esponjas, utensilios de cocina y superficies durante periodos considerables (Mattick et al., 2003). *A. butzleri* puede sobrevivir en superficies de acero y formar biopelículas, siendo un entorno adecuado para la transmisión de este microorganismo. También el manejo de aves de corral, la contaminación cruzada y el consumo de productos avícolas mal cocidos se han impulsado como posibles fuentes de infección (Corry y Atabay, 2001; K Houf, De Zutter, Van Hoof, y Vandamme, 2002).

Varias bibliografías mencionan que estas diferencias significativas de aislamiento en aves de corral, se deben a que el microorganismo atraviesa pero no colonizan el intestino del pollo, por lo que posteriormente contaminan el medio ambiente, como las superficies de las viviendas y se informó que tienen una gran capacidad para la supervivencia en el medio ambiente. Además sugieren que el tracto intestinal del pollo puede no ser un lugar favorable para *Arcobacter* debido a la alta temperatura corporal (42°C) (Ho, Lipman y Gaastra, 2008).

Otra razón puede deberse a la limitación del método empleado, el diseño experimental, el tamaño de la muestra y el método de identificación/aislamiento que si no son los correctos, no ayudará en la recuperación de aislamientos de *Arcobacter* (Van Driessche et al., 2005; Van Driessche et al., 2004).También sugirieron una influencia estacional en la prevalencia de *Arcobacte*r en animales de granja, establecieron que la prevalencia es más alta en primavera y verano que en invierno (Ellen Van Driessche et al., 2004)(Manke, Wesley, Dickson y Harmon, 1998)**.**

Arcobacter siendo aerotolerante sigue el gradiente concentración de oxígeno, favoreciendo su ubicación en la parte superior aeróbica (íleon), que la parte inferior más anaeróbica (ciegos) del intestino del pollo. Por lo que, el hisopado cloacal puede no ser una buena muestra para determinar la presencia de *Arcobacter* o posiblemente las muestras fueron negativas. Sin embargo, (Atabay et al., 2006) aislaron *Arcobacter* de hisopados cloacales en un 72% y de heces frescas un 4.3% y detectaron la presencia de *Arcobacter* en el 62.5% de heces de pollo. Existe la necesidad de realizar investigaciones para determinar la susceptibilidad de colonización de *Arcobacter* en aves de corral y las posibles fuentes de contaminación a las mismas (Amare et al., 2011; Morita et al., 2004)**.**

En cuanto a los alimentos se ha reportado mayor prevalencia en carne de aves de corral, seguida de carne de cerdo, ternero y cordero. *Arcobacter* se ha identificado en carne de pollo con tasa de prevalencia del 23 a 100%. Por ello, sugieren que el pollo es un reservorio significativo para *Arcobacter*. La contaminación cruzada durante el manejo de la carcasa de pollo juega un papel importante en la diseminación de *Arcobacter*.

3.4. Identificación de especies de *Arcobacter* en aves de corral.

En la identificación de especies de *Arcobacter* en aves de corral; la especie predominante en nuestro estudio fue *A. butzleri* con un porcentaje de 85.7% (6/7) mientras que *A. skirrowii* representa el 14.3% (1/7) (**Tabla 8**).

Tabla 8. Identificación de especies de *Arcobacter* en muestras de aves de corral.

Especies	**Numero de muestras**	**Porcentaje (%)**
Arcobacter butzleri	6	85.7
Arcobacter skirrowii	1	14.3
Total	7	100

Fuente: Autora

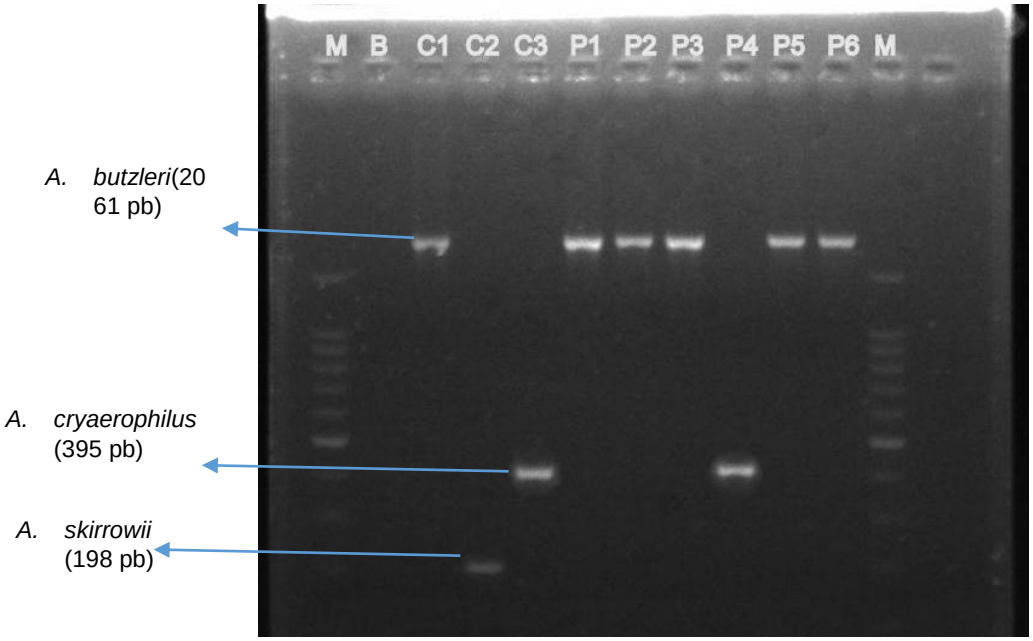
Elaboración: Autora.

Un estudio en Malasia, reportaron una tasas inferiores a la de nuestros resultados, un 39% para *A. butzleri* en carne de pollo (Amare et al., 2011), en Dinamarca obtuvieron una prevalencia de 62.5% para *A. butzleri*, 27% *A. cryaerophilus* y 9.7% para *A. skirrowii* (Atabay et al., 2006), en Corea un 18.9% para *A. butzleri* y un 3.3% para *A. cryaerophilus* (Lee et al., 2010). En la India, identificaron el 19.4% para *A. butzleri* y 11.1% para *A. skirrowii* (Patyal et al., 2011). En Francia, el 81% fueron para *A. butzleri* (Festy et al., 1993).

Arcobacter butzleri es la especie más común y predominante aislada de aves de corral con tasas de hasta el 100% (Amare et al., 2011; Corry y Atabay, 2001;Kabeya et al., 2004)(Collado et al.,2009). *A. skirrowii* no se lo aísla a menudo, debido a que existe una baja prevalencia en la carne o por el hecho de que es más difícil de aislar (Patyal et al., 2011).

3.5. Análisis molecular de *Arcobacter* spp., en caninos y aves de corral.

Se representa **(Figura 4 y 5)** un gel de electroforesis mostrando la aplicación directa del protocolo de multiplex-PCR utilizando muestras de heces de caninos y de aves de corral.

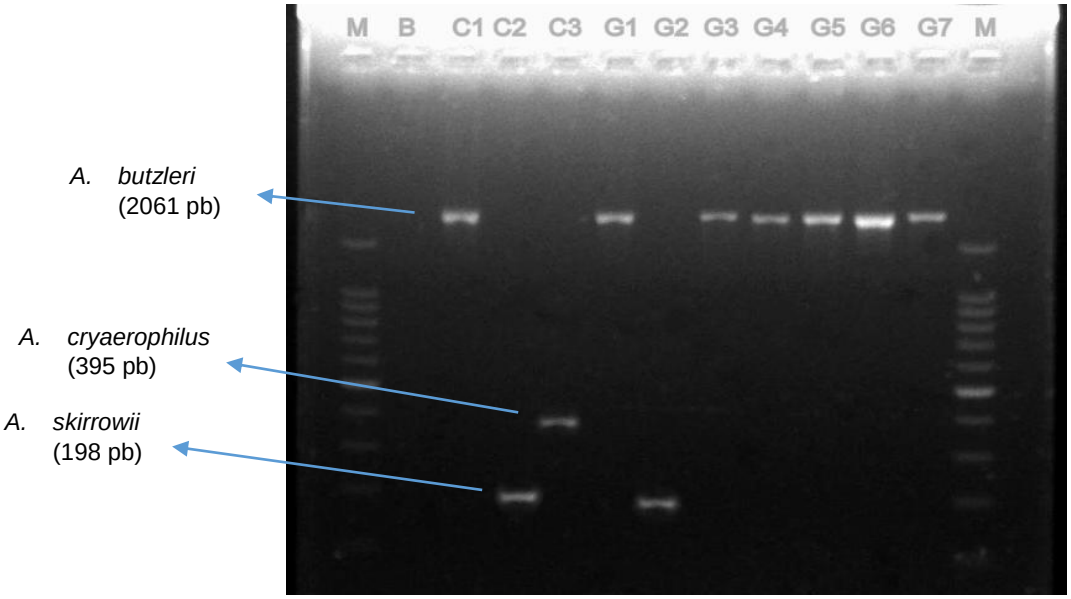


(M: marcador de peso molecular 1000 pb; B: blanco; C1: control positivo, *A. butzleri*; C2: control positivo, *A. skirrowii;* C3: control positivo, *A. cryaerophilus*; P1-P6: muestras de caninos)

Figura 6. Electroforesis de especies de *Arcobacter* spp., de muestras de heces de caninos.

Fuente: Autora

Elaboración: Autora.



(M: marcador de peso molecular 1000 pb; B: blanco; C1: control positivo, *A. butzleri*; C2: control positivo, *A. skirrowii*; C3: control positivo, *A. cryaerophilus*; G1-G7: muestras de aves de corral)

Figura 7. Especies de *Arcobacter* aisladas de muestras de heces de aves de corral.

Fuente: Autora

Elaboración: Autora.

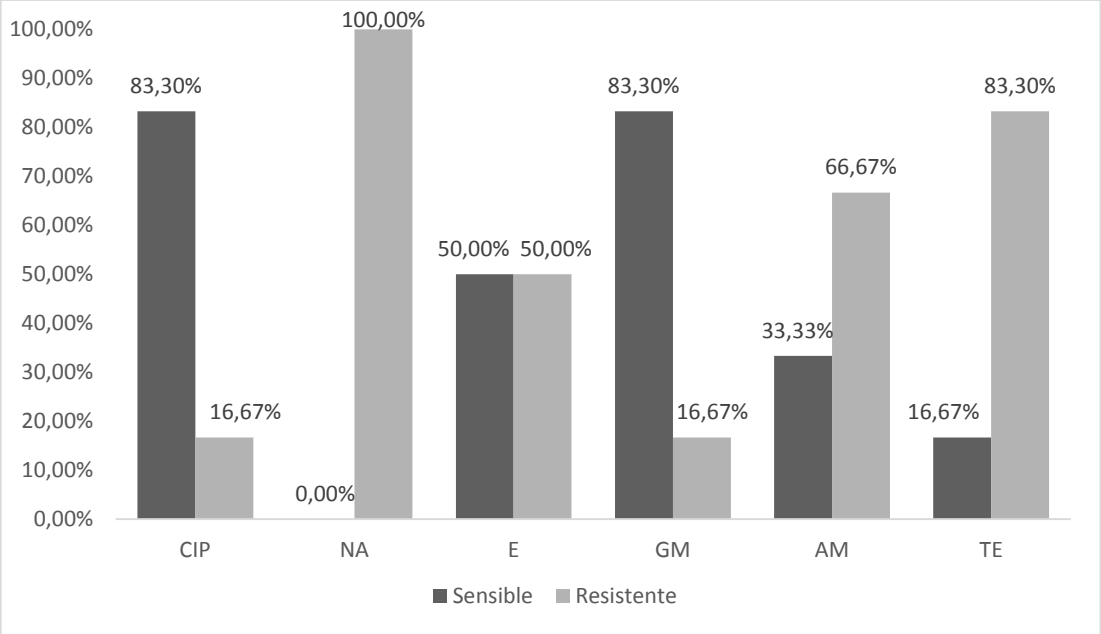
Es importante conocer con precisión las temperaturas de anillamiento de cada cebador, debido a que pueden existir grandes variaciones en los intervalos de temperatura de los cebadores. El proceso de amplificación del producto de PCR en esta experimentación, se realizó utilizando una PCR *Touch-down* previa a la etapa del cycling lo que permitió aumentar la especificidad del anillamiento de cada cebador en un mismo proceso, realizando múltiples reacciones en una sola PCR (Farace y Viñas, 2007).

La temperatura y tiempo de desnaturalización inicial está determinado por la clase de polimerasa que se usará en la PCR, debido a que en tiempos cortos o prolongados a lo establecido por el fabricante puede ocasionar que no se active la polimerasa (Farace y Viñas, 2007).

La identificación y detección de especies de *Arcobacter* se realiza de manera más confiable por medio de técnicas moleculares, siendo la multiplex PCR una alternativa rápida y específica en la detección simultánea de diferentes especies de *Arcobacter* (Fera et al., 2004), por lo tanto es favorable a gran escala para evaluar la prevalencia y definir la potencialidad clínica y zoonótica de *Arcobacter* (Çelik y Ünver, 2015).

3.6. Actividad antimicrobiana de seis antibióticos frente a *Arcobacter* spp., en caninos.

La actividad antimicrobiana de seis antibióticos frente a las cepas de *Arcobacter* spp., en caninos demostraron una resistencia del 100% al ácido nalidíxico, seguido de un 83.30% a la tetraciclina, 66.67% a la ampicilina y una susceptibilidad del 83.3 % para ciprofloxacina y gentamicina (**Gráfica 1).**



Gráfica 1. Actividad antimicrobiana de especies de *Arcobacter* en caninos.

Fuente: Autora

Elaboración: Autora.

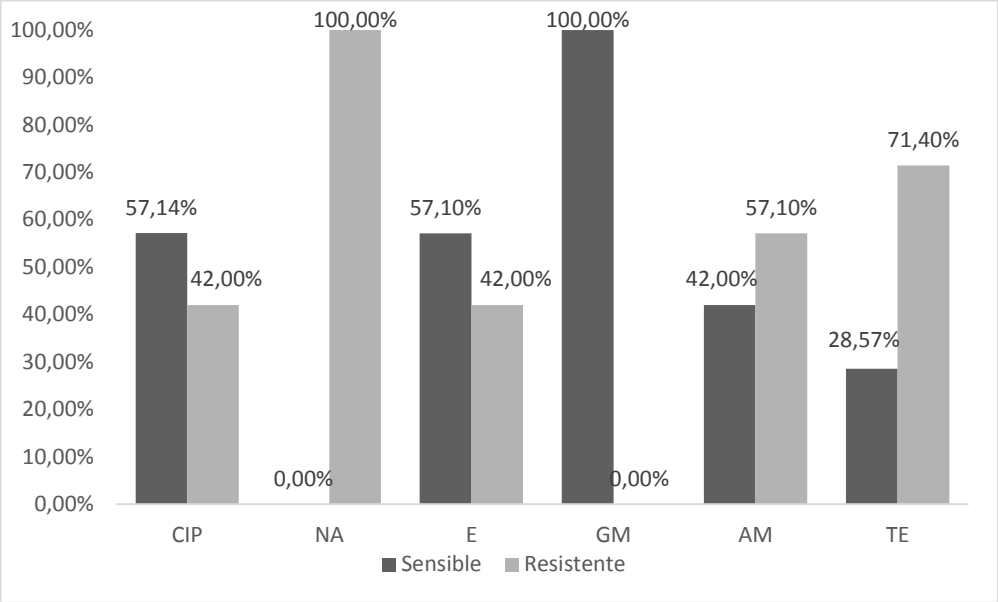
El uso frecuente de antibióticos en animales domésticos puede ser una de las principales causas de desarrollo a una resistencia a antibióticos en *Arcobacter*. Siendo de importancia en la Salud Pública ya que están en contacto cercano con humanos y puede transmitirse estos organismos resistentes (Ferreira, Fraqueza, Queiroz, Domingues y Oleastro, 2013).

Estudios informan que *Arcobacter* al igual que otros microorganismo zoonóticas que causan enfermedades, son cada vez más resistentes a los antibióticos, principalmente al uso excesivo generalizado en animales. Las especies de *Arcobacter* resistentes pueden transferirse a los seres humanos a través de la ingesta de alimentos contaminados o mediante el contacto con animales (Angulo, Nargund y Chiller, 2004;Goni et al., 2017). Existen pocos estudios sobre el mecanismo de resistencia de las especies de *Arcobacter*, sin embargo estudios revelaron que el único mecanismo de resistencia es su naturaleza cromosómica, identificaron que en los plásmidos se encuentra esta resistencia a antibióticos (Harmon y Wesley, 1997; Ramees et al., 2014).

En 2015, menciona en un estudio que la tetraciclina y los aminoglucósido presentaron mayor susceptibilidad contra las especies *A. butzleri* y *A. cryaerophilus* pero en nuestros resultados existe una sensibilidad del 83.3% para gentamicina y ciprofloxacina, en cambio hay una alta resistencia para tetraciclina (Zacharow et al., 2015).

3.7. Actividad antimicrobiana de seis antibióticos frente a *Arcobacter* spp., en aves de corral.

La actividad antimicrobiana de seis antibióticos frente a *Arcobacter* spp., en aves de corral registró una resistencia del 100 % al ácido nalidíxico, 71,40% a tetraciclina, 57,1% a ampicilina y 42 % a ciprofloxacina y eritromicina; la gentamicina presenta una sensibilidad del 100% y ciprofloxacina y eritromicina 57.1% (**Grafica 2).**



Gráfica 2. Actividad Antimicrobiana de especies de *Arcobacter* en aves de corral.

Fuente: Autora

Elaboración: Autora.

En la mayoría de aislamientos de *A. butzleri* presentó una resistencia múltiple, las muestras aislados en el caso de gallinas fueron susceptibles a la gentamicina con un 100%, dato concordante con un estudio en Portugal e Irán que reportan 100% de susceptibilidad (Ferreira et al., 2013; Rahimi, 2014). Otros autores también indican que las cepas de *Arcobacter* en general suelen ser susceptibles a los aminoglucósidos (Fera et al., 2003; Hidenori Kabeya et al., 2004; Son, Englen, Berrang, Fedorka-Cray, y Harrison, 2007).

Encontraron que cepas de *A. butzleri* aisladas de aves de corral tenían una susceptibilidad disminuida a ciprofloxacina en comparación con las cepas encontradas en humanos (Houf et al., 2004).

La resistencia a la ampicilina ha sido reportado previamente para *A. butzleri*, con una tasa de resistencia del 64.1% de pollos de engorde en Turquía (Atabay y Aydin, 2001), y otro estudio en Irán reportó una resistencia del 60% (Rahimi, 2014); otros autores también concuerdan con los mismos datos para ampicilina (Atabay y Aydin, 2001; Kiehlbauch, Baker y Wachsmuth, 1992; Shah et al., 2013); estas cifras son similares a la de nuestro estudio. Sin embargo, en Japón informan que, el 90% de las cepas de *Arcobacter* spp., fueron susceptibles para ampicilina (Kabeya et al., 2004). Investigaciones en Polonia mencionan que existen aislamiento de especies de *Arcobacter* que resultaron ser altamente resistentes a los antibióticos β-lactámicos (Zacharow et al., 2015).

Encontraron que las cepas de *A. butzleri* aisladas de aves de corral tenían una susceptibilidad disminuida a ciprofloxacina (Houf et al., 2004). En cambio en otros estudios registraron una alta resistencia a la ciprofloxacina (Ferreira et al., 2013; Houf et al., 2004; Son et al., 2007). También informaron (Atabay y Aydin, 2001; Son et al., 2007) una menor prevalencia de resistencia al ácido nalidíxico, mientras que en Japón registraron un 63.5% de resistencia al ácido nalidíxico (Kabeya et al., 2004), en cambio en nuestros resultados presentan una alta resistencia a este antibiótico.

La falta de un método estandarizado para determinar la susceptibilidad a antibióticos y las recomendaciones de puntos de corte para *Arcobacter*, hace difícil comparar resultados de diferentes estudios. El uso de antibióticos para el control de enfermedades en animales, conduce a la propagación de bacterias resistentes a los antibióticos (Aarestrup et al., 2008; Rathlavath et al., 2017)

Diversas investigaciones informan que *Arcobacter*, al igual que otros organismos zoonóticas emergentes causantes de enfermedades, son cada vez más resistentes a los antibióticos. Principalmente debido a su uso excesivo generalizado en los animales (Davies y Davies, 2010). Lo que más preocupa es que las especies de *Arcobacter* resistentes se pueden transferir a los seres humanos a través de la ingestión directa de los alimentos contaminados o mediante el contacto directo con animales. La Organización Mundial de la Salud (OMS) sugiere suspender el uso de antibióticos que pertenecen a una clase de antimicrobianos utilizados en la medicina humana (OMS, 2018). También el uso continuo excesivo de antibióticos en animales hace que sean más susceptibles a la adquisición de las cepas resistentes (Angulo et al., 2004; Goni et al., 2017).

CONCLUSIONES

- La presencia de *Arcobacter* en muestras fecales de caninos y aves de corral (gallinas) en la ciudad de Loja, siendo su frecuencia de aislamiento de 12% y 14% respectivamente.
- Las especies identificadas de *Arcobacter* en caninos correspondieron a: 83.3% *A. butzleri* y 16.7% *A. cryaerophilus*.
- Las especies aisladas de *Arcobacter* en aves de corral fueron un 85.7% *A. butzleri* y un 14,3% *A. skirrowii*.
- La actividad antimicrobiana de *Arcobacter* spp*.,* en caninos mostró un 100% y 83.3% de resistencia a ácido nalidíxico y tetraciclina respectivamente.
- En aves de corral la actividad antimicrobiana de *Arcobacter* determinó el 100% y 71.4% de resistencia a ácido nalidíxico y tetraciclina.

RECOMENDACIONES

- Ampliar los estudios epidemiológicos de los reservorios de *Arcobacter* spp en nuestro país, teniendo en cuenta la participación de equipos de Instituciones de la Salud Pública.
- Implementar programas de control y prevención a la población en riesgo, es decir que se encuentran en contacto permanente con estos animales que son reservorios de *Arcobacter*.
- Informar a la población sobre los riesgos que implica el consumo de alimentos mal procesados que pueden estar posiblemente infectados con *Arcobacter* spp., principalmente carnes de aves y productos derivados que son una de las fuentes principales de reservorios de esta bacteria.
- Tener un control en las mascotas ya que pueden contraer la bacteria por contacto con otros animales o por alimentos contaminados, y así no contribuyan a la contaminación ambiental de esta bacteria.
- El uso indiscriminado de los antibióticos en animales, debido a que es una manera indirecta de generar resistencia bacteriana y la transmisión a diferentes reservorios.
- Conocer más sobre sus características bioquímicas y molecular de *Arcobacter* spp., debido a que se ha observado complicaciones clínicas producidas por este agente no solo en humanos sino que también en animales, generando enfermedades graves a largo plazo en estos pacientes.

BIBLIOGRAFIA

Aarestrup, F., Battisti, A., Bengtsson, B., Piriz Duran, S., Emborg, H. D., Kahlmeter, G., … Bronzwaer, S. (2008). Harmonised monitoring of antimicrobial resistance in Salmonella and Campylobacter isolates from food animals in the European Union. *Clinical Microbiology and Infection*, *14*(6), 522–533. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02000.x

Abdelbaqi, K., Buissonnière, A., Prouzet-Mauleon, V., Gresser, J., Wesley, I., Mégraud, F., & Ménard, A. (2007). Development of a real-time fluorescence resonance energy transfer PCR to detect arcobacter species. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(9), 3015–21. https://doi.org/10.1128/JCM.00256-07

Aldred, K.J.; Kerns, R. & Oshereof, N. (2014). Mechanism of Quinolone action and resistence. *Biochemestry,53:*, 1565–1574.

Amare, L. B., Saleha, A. A., Zunita, Z., Jalila, A., & Hassan, L. (2011). Prevalence of Arcobacter spp. on chicken meat at retail markets and in farm chickens in Selangor, Malaysia. *Food Control*, *22*(5), 732–736. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.004

Angulo, F. J., Nargund, V. N., & Chiller, T. C. (2004). Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, *51*(8–9), 374–9. https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2004.00789.x

Arhin, F. F., Draghi, D. C., Pillar, C. M., Moeck, G., & Sahm, D. F. (2012). Correlation between oritavancin and vancomycin minimum inhibitory concentrations in staphylococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *40*(6), 562–563. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.06.019

Assata, M.A; Roy, D; Lemay, M & Montpetit, D. (2002). Attachment of Arcobacter butzleri, a new waterborne pathogen, to water distribution pipe surfaces. *J. Food Prot. 65:*, 1240–1247.

Atabay, H. I., & Aydin, F. (2001). Susceptibility of Arcobacter butzleri isolates to 23 antimicrobial agents. *Letters in Applied Microbiology*, *33*(6), 430–433. https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.01025.x

Atabay, H. I., Wainø, M., & Madsen, M. (2006). Detection and diversity of various Arcobacter species in Danish poultry. *International Journal of Food Microbiology*, *109*(1–2), 139–145. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.020

Aydin, F., Gümüşsoy, K. S., Atabay, H. I., Iça, T., & Abay, S. (2007). Prevalence and distribution of Arcobacter species in various sources in Turkey and molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR. *Journal of Applied Microbiology*, *103*(1), 27–35. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03240.x

Banting, G. y Figueras Salvat, M. (2017). Arcobacter | Proyecto Global de Patógenos de Agua. *Www.watherpathogens.org*. Retrieved from http://www.waterpathogens.org/book/arcobacter

Banting, G., & Figueras, M. J. (2017). *Arcobacter*. *Global Water Pathogen Project*. Retrieved from http://www.unesco.org/openaccess/terms-use-ccbysa-en

Bayas, I. (2016). APORTACIONES A LA EPIDEMIOLOGÍA DE Arcobacter Y Helicobacter spp.: APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES A SU DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN EN ALIMENTOS. *Article*. Retrieved from https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/75087/BAYAS - Aportaciones a la epidemiología de Arcobacter y Helicobacter spp.%253A Aplicación de métodos ....pdf?sequence=1

C. Gugliandolo, G.P Irrera, V. Letini, T. L. M. (2008). Pathogenic Vibrio, Aeromonas and Arcobacter spp. associated with copepods in the Straits of Messina (Italy). *Marine Pollution Bulletin*, *56*(3), 600–606. https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2007.12.001

Calvo, G; Arias, M & Fernández, H. (2013). Arcobacter: un patógeno emergente de origen alimentario. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.*, *63*(2), 164–172. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222013000200008

Çelik, E., & Ünver, A. (2015). Isolation and Identification of Arcobacter spp. by Multiplex PCR from Water Sources in Kars Region. *Current Microbiology*, *71*(5), 546–550. https://doi.org/10.1007/s00284-015-0883-x

Collado, L.; Inza, I.; Guarro, J. & Figueras, M. (2008). Presence of Arcobacter spp., in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution. *Environ. Microbiol, 10 (6):*, 1635–1640.

Collado, L., Cleenwerck, I., Van Trappen, S., De Vos, P., & Figueras, M. J. (2009). Arcobacter mytili sp. nov., an indoxyl acetate-hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *59*(6), 1391–1396. https://doi.org/10.1099/ijs.0.003749-0

Collado, L., & Figueras, M. J. (2011). Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus Arcobacter. *Clinical Microbiology Reviews*, *24*(1), 174–192.

https://doi.org/10.1128/CMR.00034-10

Collado, L., Guarro, J., & Figueras, M. J. (2009). Prevalence of Arcobacter in meat and shellfish. *Journal of Food Protection*, *72*(5), 1102–6. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19517742

Collado, L. R. (2010). *Taxonomy and epidemiology of the genus Arcobacter doctoral thesis*. *Taxonomy and Epidemiology of the Genus Arcobacter*. Universitat Rovira i Virgili]. Retrieved from http://www.tdx.cat/handle/10803/8744?show=full

Corry, J. E., & Atabay, H. I. (2001). Poultry as a source of Campylobacter and related organisms. *Symposium Series (Society for Applied Microbiology)*, (30), 96S–114S. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01358.x

Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, *74*(3), 417–33. https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10

Douidah, L., de Zutter, L., Bare, J., De Vos, P., Vandamme, P., Vandenberg, O., … Houf, K. (2012). Occurrence of Putative Virulence Genes in Arcobacter Species Isolated from Humans and Animals. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(3), 735–741. https://doi.org/10.1128/JCM.05872-11

Douidah, L., De Zutter, L., Vandamme, P., & Houf, K. (2010). Identification of five human and mammal associated Arcobacter species by a novel multiplex-PCR assay. *Journal of Microbiological Methods*, *80*(3), 281–286. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.01.009

Driessche, E. Van, Houf, K., Vangroenweghe, F., Zutter, L. De, & Hoof, J. Van. (2005). Prevalence, enumeration and strain variation of Arcobacter species in the faeces of healthy cattle in Belgium. *Veterinary Microbiology*, *105*(2), 149–154. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.11.002

Ellis, W., Neill, S., O'Brien, J., Ferguson, H., & Hanna, J. (1977). Isolation of Spirillum/Vibrio-like organisms from bovine fetuses. *Veterinary Record*, *100*(21), 451–452. https://doi.org/10.1136/vr.100.21.451

EUCAST. (2017). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Retrieved November 13, 2017, from http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_7.1_Breakpoint_Tables.pdf

Farace, M., & Viñas, M. (2007). Manual de Procedimientos para el aislamiento y caracterización de Campylobacter spp. *Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas*. Retrieved from http://bvs.panalimentos.org/local/File/Manual_Campylobacter_31-08-2007.pdf

Fera, M. T., La Camera, E., Carbone, M., Malara, D., & Pennisi, M. G. (2009). Pet cats as carriers of *Arcobacter* spp. in Southern Italy. *Journal of Applied Microbiology*, *106*(5), 1661–1666. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04133.x

Fera, M. T., Maugeri, T. L., Giannone, M., Gugliandolo, C., La Camera, E., Blandino, G., & Carbone, M. (2003). In vitro susceptibility of Arcobacter butzleri and Arcobacter cryaerophilus to different antimicrobial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *21*(5), 488–491. https://doi.org/10.1016/S0924-8579(03)00004-9

Fera, M. T., Maugeri, T. L., Gugliandolo, C., Beninati, C., Camera, E. La, Carbone, M., & Giannone, M. (2004). Detection of Arcobacter spp . in the Coastal Environment of the Mediterranean Sea Detection of Arcobacter spp . in the Coastal Environment of the Mediterranean Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(3), 1271–1276. https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1271

Fernández, Heriberto; Villanueva, María; Medina, G. (2014). *Endosimbiosis de Arcobacter butzleri en Acanthamoeba castellanii.Revista argentina de microbiología* (Vol. 46). Asociación Argentina de Microbiología. Retrieved from http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412014000400004&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Fernández, H., & Jaramillo, A. (2016). Arcobacter butzleri. *Revista Chilena de Infectología*, *33*(6), 663–664. https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000600008

Fernández, H., Vera, F., & Villanueva, M. P. (2007). Especies de Arcobacter y Campylobacter en aves y mamíferos del sur de Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*, *39*(2), 163–165. https://doi.org/10.4067/S0301-732X2007000200011

Fernández, H., Villanueva, Mansilla, I., Gonzalez, M., & Latif. (2014). Retrato Microbiológico Heriberto Fernández. *Parasitol Res Braz J Microbiol*, *113*(46), 1933–42. Retrieved from http://www.scielo.cl/pdf/rci/v33n6/art08.pdf

Ferreira, S., Fraqueza, M. J., Queiroz, J. A., Domingues, F. C., & Oleastro, M. (2013). Genetic diversity, antibiotic resistance and biofilm-forming ability of Arcobacter butzleri isolated from poultry and environment from a Portuguese slaughterhouse. *International Journal of Food Microbiology*, *162*(1), 82–88.

https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.003

Ferreira, S., Queiroz, J. A., Oleastro, M., & Domingues, F. C. (2015). Insights in the pathogenesis and resistance of *Arcobacter* : A review. *Critical Reviews in Microbiology*, *7828*, 1–20. https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.954523

Festy, B., Squinazi, F., Marin, M., Derimay, R., & Lior, H. (1993). Poultry meat and water as the possible sources of Arcobacter butzleri associated human disease in Paris, France. *Acta Gastro-Enterol.Belg.,35,suplemment.*

Fong, T.T.; Mansfield, L.S.; Wilson, D.L.; Scheab, D; Molloy, S.L. & Rose, J. B. (2007). Massive microbiological groundwater contamination associated with a waternorne outbreak in Lake Erie, South Bass Island, Ohio. *Environ. Health Perspect, 115(6):*, 856–864.

Goni, D. M., Abdulaziz, S., Dhaliwa, G. K., Zakaria, Z., Muhammad, I. J., Mohamed, M. A., … Bitrus, A. A. (2016). Occurrence of Arcobacter in dogs and cats in Selangor, Malaysia, and associated risk factors. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, *40*(6), 769–775. https://doi.org/10.3906/vet-1602-7

Goni, M. D., Muhammad, I. J., Goje, M., Bitrus, A. A., Jajere, S. M., Adam, B. M., & Abbas, M. A. (2017). Occurrence of emerging Arcobacter in dogs and cats and its public health implications: A Review. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, *5*(9), 362–370. https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2017/5.9.362.370

González, I., García, T., Antolín, A., Hernández, P. E., & Martín, R. (2000). Development of a combined PCR-culture technique for the rapid detection of Arcobacter spp. in chicken meat. *Letters in Applied Microbiology*, *30*(3), 207–212. https://doi.org/DOI 10.1046/j.1472-765x.2000.00696.x

Harmon, K. M., & Wesley, I. V. (1997). Multiplex PCR for the identification of Arcobacter and differentiation of Arcobacter butzleri from other arcobacters. *Veterinary Microbiology*, *58*(2–4), 215–227. https://doi.org/10.1016/S0378-1135(97)00151-X

Harrab, B., Schwarz, S., & Wenzel, S. (1998). Identification and characterization of Arcobacter isolates from broilers by biochemical tests, antimicrobial resistance pattern and plasmid analysis. *Journal Veterinary Medicine*, *45*, p.87-94.

Hausdorf, L., Neumann, M., Bergmann, I., Sobiella, K., Mundt, K., Fröhling, A., … Klocke, M. (2013). Occurrence and genetic diversity of Arcobacter spp. in a spinach-processing plant and evaluation of two Arcobacter-specific quantitative PCR assays. *Systematic and Applied Microbiology*, *36*(4), 235–243.

https://doi.org/10.1016/J.SYAPM.2013.02.003

Ho, H. T.; Lipman, L.J. & Gaastra, W. (2008). Introduction of Arcobacter spp., in poultry slaughterhouses. *Int. J. Food Microbiol*, 125:223-229.

HO, H., LIPMAN, L., & GAASTRA, W. (2006). Arcobacter, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent! *Veterinary Microbiology*, *115*(1–3), 1–13. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.03.004

Ho, H. T. K., Lipman, L. J. A., & Gaastra, W. (2008). The introduction of Arcobacter spp. in poultry slaughterhouses. *International Journal of Food Microbiology*, *125*(3), 223–229. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.012

Houf, K.; On, S.L.; Coenye, T.; Debruyne, L.; De Smet, S. & Vandamme, P. (2009). Arcobacter thereius soo. nov., isolated from pgs and ducks. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 59(10):*, 2599–2604.

Houf, K.; On, S.L.; Coenye, T.; Mast, J.; Van Hoof, J. & Vandamme, P. (2005). Arcobacter cibarius spp.nov., isolated from broiler carcasses. *Int.J. Syst.Evol. Microbiol, 55(2):*, 713–717.

Houf, K., De Smet, S., Baré, J., & Daminet, S. (2008). Dogs as carriers of the emerging pathogen Arcobacter. *Veterinary Microbiology*, *130*(1–2), 208–213. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.01.006

Houf, K., De Zutter, L., Van Hoof, J., & Vandamme, P. (2002). Occurrence and distribution of Arcobacter species in poultry processing. *Journal of Food Protection*, *65*(8), 1233–1239.

Houf, K., De Zutter, L., Verbeke, B., Hoof, J. Van, & Vandamme, P. (2003). Molecular Characterization of Arcobacter Isolates Collected in a Poultry Slaughterhouse. *Journal of Food Protection*, *66*(3), 364–369. Retrieved from http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-66.3.364?code=fopr-site

Houf, K., Devriese, L. A., De Zutter, L., Van Hoof, J., & Vandamme, P. (2001). Development of a new protocol for the isolation and quantification of Arcobacter species from poultry products. *International Journal of Food Microbiology*, *71*(2–3), 189–196. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00605-5

Houf, K., Devriese, L. A., Haesebrouck, F., Vandenberg, O., Butzler, J.-P., Hoof, J. Van, & Vandamme, P. (2004). Antimicrobial Susceptibility Patterns of Arcobacter butzleri and Arcobacter cryaerophilus Strains Isolated from Humans and Broilers. *Microbial Drug Resistance*, *10*(3), 243–247. https://doi.org/10.1089/mdr.2004.10.243

Hurtado, A., & Owen, R. J. (1997). A Molecular Scheme Based on 23S rRNA Gene Polymorphisms for Rapid Identification of Campylobacter and Arcobacter Species. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, *35*(9), 2401–2404. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC229976/pdf/352401.pdf

Inzunza, F. D. (2005). Capacidad de adherencia de cepas de Arcobacter butzleri Aisladas de diferentes origenes.

Kabeya, H. (2003). One-step polymerase chain reaction-based typing of Arcobacter species. *International Journal of Food Microbiology*, *81*(2), 163–168. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00197-6

Kabeya, H., Maruyama, S., Morita, Y., Ohsuga, T., Ozawa, S., Kobayashi, Y., … Mikami, T. (2004). Prevalence of Arcobacter species in retail meats and antimicrobial susceptibility of the isolates in Japan. *International Journal of Food Microbiology*, *90*(3), 303–308. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00322-2

Kiehlbauch, J. A., Baker, C. N., & Wachsmuth, I. K. (1992). In vitro susceptibilities of aerotolerant Campylobacter isolates to 22 antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *36*(4), 717–22. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1503434

Kim, H. M., Hwang, C. Y., & Cho, B. C. (2010). Arcobacter marinus sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *60*(3), 531–536. https://doi.org/10.1099/ijs.0.007740-0

Lammerding, A. ., Breynaert, R., VanEtterijack, R., Revets, H., & Mets, T. (1997). *Isolation method for the recovery of Arcobacter butzleri from fresh poultry products.Newall,D.G, Ketley,H.J.(Eds)* (Vol. Campylobac).

Lapongov, I; Sohi, M.K.; Veselkov, D.A.; Pan, X.S.; Saechney, R.; THompson, A. W. . et al. (2009). Structural insight into the quinolone-DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. *Nat. Struct. Mol. Biol, 16 (6):*, 667–669.

Larrauri, R. Z., Alarcón Villaverde, J. O., Lezama Vigo, P. E., Gabriel, L. P., Dioses, A. R., Valencia Ramírez, A. M., … León, M. J. A. (2014). Identification of Arcobacter in children and adult feces with/without diarrhea, and in animal reservoirs. *Anc.Fac.Med., 75 (2)*, 185–7. Retrieved from http://www.scielo.org.pe/pdf/afm/v75n2/a17v75n2.pdf

Lee, M. ., Cheon, D. ., Choi, S., Lee, B., Yung, J. ., & Choi, C. (2010). Prevalence of Arcobacter species isolated from retail meats in Korea. *J. Food Protect.*, *73*, 1313–1316.

Levican,A; Collado,L & Figueras, M. J. (2013). Arcobacter cloacae spp. nov. and Arcobacter suis spp. nov., two new species isolated from food and sewage. *Syst. Appl. Microbiol, 36(1)*, 22–27.

Manke, T. R., Wesley, I. V, Dickson, J. S., & Harmon, K. M. (1998). Prevalence and genetic variability of Arcobacter species in mechanically separated turkey. *Journal of Food Protection*, *61*(12), 1623–1628.

Marshall, S. M., Melito, P. L., Woodward, D. L., Johnson, W. M., Rodgers, F. G., & Mulvey, M. R. (1999). Rapid identification of Campylobacter, Arcobacter, and Helicobacter isolates by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(12), 4158–60. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10565952

Maruri, F.; Sterling, T.R.; Kaiga, A.W.; Blackman, A.; van der Heijden, Y.F.; ayer, C.; Cambau, E. & Aubry, A. (2012). A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistnt Mycobacterium tuberculosis and a proposed gyrase numbering system. *J. Antimicrob. Chemother, 67 (4):*, 819–31.

Mattick, K., Durham, K., Domingue, G., Jørgensen, F., Sen, M., Schaffner, D. W., & Humphrey, T. (2003). The survival of foodborne pathogens during domestic washing-up and subsequent transfer onto washing-up sponges, kitchen surfaces and food. *International Journal of Food Microbiology*, *85*(3), 213–226. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00510-X

Merga, J. Y., Leatherbarrow, A. J. H., Winstanley, C., Bennett, M., Hart, C. A., Miller, W. G., & Williams, N. J. (2011a). Comparison of Arcobacter isolation methods, and diversity of Arcobacter spp. in Cheshire, United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(5), 1646–50. https://doi.org/10.1128/AEM.01964-10

Merga, J. Y., Leatherbarrow, A. J. H., Winstanley, C., Bennett, M., Hart, C. A., Miller, W. G., & Williams, N. J. (2011b). Comparison of Arcobacter isolation methods, and diversity of Arcobacter spp. in Cheshire, United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(5), 1646–50. https://doi.org/10.1128/AEM.01964-10

Miller, W. G., Parker, C. T., Rubenfield, M., Mendz, G. L., Wösten, M. M. S. M., Ussery, D. W., … Mandrell, R. E. (2007). The Complete Genome Sequence and Analysis of the Epsilonproteobacterium Arcobacter butzleri. *PLoS ONE*, *2*(12), e1358. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001358

Moreno, Y., Botella, S., Alonso, J. L., Ferrús, M. A., Hernández, M., & Hernández, J. (2003).

Specific detection of Arcobacter and Campylobacter strains in water and sewage by PCR and fluorescent in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(2), 1181–6. https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.1181-1186.2003

Morita, Y., Maruyama, S., Kabeya, H., Boonmar, S., Nimsuphan, B., Nagai, A., … Kimura, H. (2004). Isolation and Phylogenetic Analysis of *Arcobacter* Spp. in Ground Chicken Meat and Environmental Water in Japan and Thailand. *Microbiology and Immunology*, *48*(7), 527–533. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2004.tb03548.x

Oliveira, S. J. de, Moraes, H. L. de S., Kuchenbecker, B. S., Ikuta, N., Lunge, V., Fonseca, A., & Coiro, J. R. (2001). Isolation of Arcobacter spp from poultry carcasses, in Brazil. *Ciência Rural*, *31*(4), 639–643. https://doi.org/10.1590/S0103-84782001000400013

OMS | Organización Mundial de la Salud. (2018). *WHO*. Retrieved from http://www.who.int/es/

On, S. L. ., Jensen, T. K., Bille-Hansen, V., Jorsal, S. E., & Vandamme, P. (2002). Prevalence and diversity of Arcobacter spp. isolated from the internal organs of spontaneous porcine abortions in Denmark. *Veterinary Microbiology*, *85*(2), 159–167. https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00503-X

On, S. L. N. (2001). Taxonomy of Campylobacter , Arcobacter, Helicobacter and related bacteria: current status, future prospectsand immediate concerns. *J. Appl. Microbiol,90,(6)*, 1–15.

Ongor, H., Cetinkaya, B., Acik, M. N., & Atabay, H. I. (2004). Investigation of arcobacters in meat and faecal samples of clinically healthy cattle in Turkey. *Letters in Applied Microbiology*, *38*(4), 339–344. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01494.x

Patyal, A., Rathore, R. S., Mohan, H. V., Dhama, K., & Kumar, A. (2011). Prevalence of Arcobacter spp. in Humans, Animals and Foods of Animal Origin Including Sea Food from India. *Transboundary and Emerging Diseases*, *58*(5), 402–410. https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01221.x

Pejchalova, M., Zabcikova, S., Silhova, L., Silha, D., Brozkova, I., & Haslova, M. (2016). Presence of Arcobacter species in pet cats and dogs in the Czech Republic. *Veterinarni Medicina*, *61*(8), 449–455. https://doi.org/10.17221/273/2015-VETMED

Petersen, R. F., Harrington, C. S., Kortegaard, H. E., & On, S. L. W. (2007). A PCR-DGGE method for detection and identification of Campylobacter, Helicobacter, Arcobacter and related Epsilobacteria and its application to saliva samples from humans and domestic pets. *Journal of Applied Microbiology*, *103*(6), 2601–2615.

https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03515.x

Plascencia Villa, G. (2003). Espectrometría De Masas. *Instituto de Biotecnología*, 1–40. Retrieved from http://web4.cbm.uam.es/joomla-rl/images/Servicios/080.Proteomica/documentos/Espectrometria_de_masas_MALDI-TOF_enero_2015.pdf

Prouzet-Mauléon, V., Labadi, L., Bouges, N., Ménard, A., & Mégraud, F. (2006). Arcobacter butzleri: Underestimated Enteropathogen. *Emerging Infectious Diseases*, *12*. Retrieved from https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/12/2/pdfs/05-0570.pdf

Rahimi, E. (2014). Prevalence and antimicrobial resistance of Arcobacter species isolated from poultry meat in Iran. *British Poultry Science*, *55*(2), 174–180. https://doi.org/10.1080/00071668.2013.878783

Ramees, T; Dhama, K; Karthik, K; Rathore, R; Kumar, A; Saminathan, M; Tiwari, R; Malik, Y & Singh, R. (2017). Arcobacter: an emerging food-borne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control – a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, 37:1,136-161. https://doi.org/10.1080/01652176.2017.1323355

Ramees, T. P., Rathore, R. S., Bagalkot, P. S., Mohan, H. V., Kumar, A., & Dhama, K. (2014). Detection of Arcobacter butzleri and Arcobacter cryaerophilus in Clinical Samples of Humans and Foods of Animal Origin by Cultural and Multiplex PCR Based Methods. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, *9*(4), 243–252. https://doi.org/10.3923/ajava.2014.243.252

Rathlavath, S., Kohli, V., Singh, A. S., Lekshmi, M., Tripathi, G., Kumar, S., & Nayak, B. B. (2017). Virulence genotypes and antimicrobial susceptibility patterns of Arcobacter butzleri isolated from seafood and its environment. *International Journal of Food Microbiology*, *263*(March), 32–37. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.005

Rivas, L., Fegan, N., & Vanderlinde, P. (2004). Isolation and characterisation of Arcobacter butzleri from meat. *International Journal of Food Microbiology*, *91*(1), 31–41. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00328-3

Ruiz, L. (2005). COMPARACIÓN DE TRES MEDIOS SELECTIVOS PARA EL AISLAMIENTO DE ESPECIES DE ARCOBACTER. *Universidad de Chile. Facultad de Medicina.*

Sasi Jyothsna, T. S., Rahul, K., Ramaprasad, E. V. V., Sasikala, C., & Ramana, C. V. (2013). Arcobacter anaerophilus sp. nov., isolated from an estuarine sediment and emended description of the genus Arcobacter. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC*

AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, *63*(Pt 12), 4619–4625. https://doi.org/10.1099/ijs.0.054155-0

Shah, A. H., Saleha, A. A., Zunita, Z., Murugaiyah, M., Aliyu, A. B., & Jafri, N. (2013). Prevalence, Distribution and Antibiotic Resistance of Emergent *Arcobacter* spp. from Clinically Healthy Cattle and Goats. *Transboundary and Emerging Diseases*, *60*(1), 9–16. https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01311.x

Šilha, D., Pejchalová, M., & Šilhová, L. (2017). Susceptibility to 18 drugs and multidrug resistance of Arcobacter isolates from different sources within the Czech Republic. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *9*, 74–77. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.01.006

Son, I. (2005). Prevalence, genetic diversity, and antimicrobial resistance patterns of Arcobacter and Campylobacter on broiler carcasses during processing. Retrieved from https://getd.libs.uga.edu/pdfs/son_insook_200512_phd.pdf

Son, I., Englen, M. D., Berrang, M. E., Fedorka-Cray, P. J., & Harrison, M. A. (2007). Antimicrobial resistance of Arcobacter and Campylobacter from broiler carcasses. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *29*(4), 451–455. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.10.016

Talay, F., Molva, C., & Atabay, H. I. (2016). Isolation and identification of Arcobacter species from environmental and drinking water samples. *Folia Microbiologica*, *61*(6), 479–484. https://doi.org/10.1007/s12223-016-0460-0

Van Driessche, E., & Houf, K. (2007). Discrepancy between the occurrence of Arcobacter in chickens and broiler carcass contamination. *Poultry Science*, *86*(4), 744–751. https://doi.org/10.1093/ps/86.4.744

Van Driessche, E., Houf, K., Vangroenweghe, F., Nollet, N., De Zutter, L., Vandamme, P., & Van Hoof, J. (2004). Occurrence and strain diversity of Arcobacter species isolated from healthy Belgian pigs. *Research in Microbiology*, *155*(8), 662–666. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.04.011

Vandamme, P; Pugina, P; Benzi, G; Van Etterijck, R; Vlaes, L; Kersters, K; Butzler, J; Lior, H & Lauwers, S. (1992). Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with Arcobacter butzleri in an Italian school. *J.Clin. Microbiol,30(9)*, 2335–2337.

Vandamme, P., & De Ley, J. (1991). Proposal for a New Family, Campylobacteraceae. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *41*(3), 451–455. https://doi.org/10.1099/00207713-41-3-451

Vandamme, P., Gevers, D., & Debruyne, L. (2008). Taxonomy of the Family Campylobacteraceae. *Campylobacter, Third Edition*, 3–25. https://doi.org/10.1128/9781555815554.ch1

Vandenberg, O., Dediste, A., Houf, K., Ibekwem, S., Souayah, H., Cadranel, S., … Vandamme, P. (2004). Arcobacter species in humans. In *Emerging Infectious Diseases* (Vol. 10, pp. 1863–1867). Centers for Disease Control and Prevention. https://doi.org/10.3201/eid1010.040241

Wang, X., Seo, D. J., Lee, M. H., & Choi, C. (2014). Comparison of conventional PCR, multiplex PCR, and loop-mediated isothermal amplification assays for rapid detection of Arcobacter species. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(2), 557–63. https://doi.org/10.1128/JCM.02883-13

Wesley, I. ., & Miller, G. W. (2010). Arcobacter: an opportunistic human food-borne pathogen. *Emerging Infections 9.ASM Press*, 185–211.

Wesley, I. V, Baetz, A. L., & Larson, D. J. (1996). Infection of cesarean-derived colostrum-deprived 1-day-old piglets with Arcobacter butzleri, Arcobacter cryaerophilus, and Arcobacter skirrowii. *Infection and Immunity*, *64*(6), 2295–9. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8675340

Wesley, I. V, & Baetz, a L. (1999). Natural and experimental infections of Arcobacter in poultry. *Poultry Science*, *78*(4), 536–545.

Zacharow, I., Bystroń, J., Wałecka-Zacharska, E., Podkowik, M., & Bania, J. (2015). Prevalence and antimicrobial resistance of Arcobacter butzleri and Arcobacter cryaerophilus isolates from retail meat in Lower Silesia region, Poland. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, *18*(1), 63–69. https://doi.org/10.1515/pjvs-2015-0008

ANEXOS

ANEXO 1: Caldo de enriquecimiento para *Arcobacter*.

Fórmula para 1000 ml	
Medio base	**Cantidades**
Nutriente broth Nº2 (OXOID)	25 g
Extracto de Levadura	10 g
Agar technical Nº 2 (OXOID)	1 g
Sangre	50 ml
Agua destilada	950 ml
Mezcla Antibiótica de Houf	
Cefoperazona	16 mg
5-fluorouracil	100 mg
Novobiocina	32mg
Trimetoprim	64 mg

1. Pesar 25g de agar Nutrient Broth N°2.
2. Pesar 10g de Extracto de levadura.
3. Pesar 1g de Agar technical N°2.
4. Medir en una probeta 950 mL de agua destilada.
5. Colocar en un boheco con tapa el agar Nutrient Broth N°2, el extracto de levadura y el Agar technical N°2, añadiendo conjuntamente con el agua.
6. Mezclar hasta homogenizar completamente el medio.
7. Regular a un pH de 7, utilizando ácido clorhídrico al 5%.
8. Esterilizar el medio en el autoclave a 121°C y 1.5 atm de presión por 20 minutos.
9. Enfriar el medio hasta una temperatura aproximada de 37°C.
10. Agregar mezcla antibiótica de Houf.
11. Adicionar 50 mL de sangre humana y homogenizar la mezcla.
12. Dispensar 8 mL de caldo en tubos corning de 15 mL con tapa rosca estériles.
13. Conservar el medio a 4°C.

ANEXO 2: Medio de agar sangre enriquecido para *Arcobacter*

Fórmula para 1000 ml	
Medio base	**Cantidades**
Caldo Nutriente Nº2 (OXOID)	25 g
Extracto de levadura	10 g
Agar technical Nº 2 (OXOID)	14 g
Sangre	50 ml
Agua destilada	950 ml

1. Pesar 25 de agar Nutrient Broth N°2.
2. Pesar 14g de agar technical N°2.
3. Pesar 10g de extracto de levadura.
4. Medir en una probeta 950 ml de agua destilada.
5. Colocar en un boheco con tapa el agar Nutrient Broth N°2, el agar extracto de levadura y el extracto de levadura, añadiendo conjuntamente con el agua.
6. Mezclar todo hasta homogenizar.
7. Regular a un pH de 7, utilizando ácido clorhídrico al 5%.
8. Esterilizar el medio en el autoclave a 121°C y 1.5 atm de presión por 20 minutos.
9. Enfriar el medio hasta temperatura aproximada de 37°C.
10. Adicionar 50ml de sangre humana y homogenizar suavemente la mezcla con el fin de no formar burbujas.
11. Dispensar en cajas de Petri, dejar reposar hasta su solidificación.
12. Conservar el medio a 4°C.

Técnica de filtración en membrana de triacetato de celulosa de 47 mm de diámetro (0.45µm de tamaño de poro)

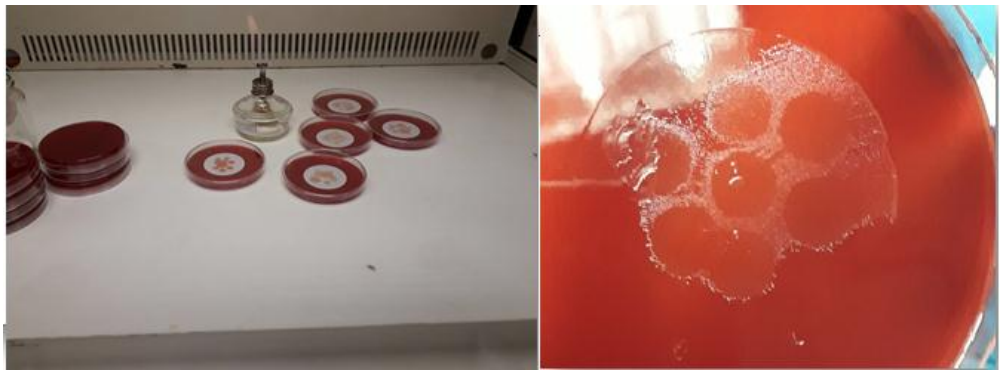


Figura 8. Método de aislamiento de especies de *Arcobacter* mediante técnica de filtrado.
Crecimiento de colonias sospechosas tras 72 horas de incubación a 30 °C.

Fuente: Autora.

Elaboración: Autora.

ANEXO 3: Tinción de Hucker	
Preparación de 100 ml de reactivo 1 de Hucker	
Reactivo 1	
Cristal violeta	2 g
Alcohol etílico	20 ml
Oxalato de amonio	0.8 g
Agua destilada	80 ml

Reactivo 2	
Oxalato de amonio	1%

1. Colocar una asada de la colonia sospechosa y fijar.
2. Colocar unas gotas del reactivo 1 de manera que cubra toda la muestra.
3. Agregar una gota del reactivo 2, dejar actuar la tinción por 2 min. y lavar la muestra en agua corriente.
4. Secar las placas y observar al microscopio con objetivo de 100X.

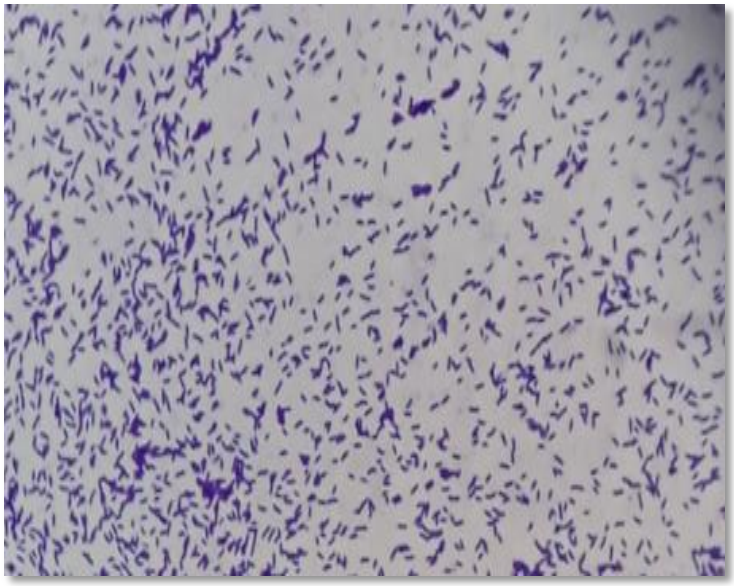


Figura 9. Microscopía óptica (100X). Tinción de Hucker.

Se puede apreciar la morfología característica curva de *Arcobacter* spp.

Fuente: Autora.

Elaboración: Autora.

ANEXO 4: Pruebas bioquímicas para la identificación de especies de *Arcobacter.*

Prueba de oxidasa

1. A partir de un cultivo puro, tomar una colonia aislada e inocular sobre una tira de oxidasa.
2. Esperar 10 segundos y observar si existe o no un cambio de coloración.
3. Se considera como una prueba positiva en caso de que antes de los 10 segundos se observe un color oscuro de la colonia. Si no hay cambio de coloración, la prueba es considerada negativa.

Prueba de catalasa

1. A partir de un cultivo puro, tomar con un asa estéril plástica una colonia aislada y depositarla sobre un portaobjetos limpio.
2. Añadir una gota de peróxido de hidrógeno sobre la colonia.
3. Se considera como prueba positiva la formación de burbujas, ya sea abundantes o no. Una prueba negativa es aquella en la que no se da la producción de burbujas.

Figura 10. Pruebas Catalasa (izquierda) y Oxidasa (derecha).
Fuente: Autora
Elaboración: Autora.

Prueba de crecimiento en MacConkey

1. Tomar una colonia aislada de un cultivo puro sospechoso de *Arcobacter* e inocular en un agar MacConkey.
2. Realizar un estriado por cuadrantes e incubar a 30ºC durante 24 a 48 horas.
3. Según la bibliografía, *A. butzleri* es la especie del género que mejor se desarrolla en este medio de cultivo.

Figura 11. Crecimiento en Agar MacConkey.

Fuente: Autora

Elaboración: Autora.

ANEXO 5: Caldotioglicolato modificado

Fórmula para 100 ml	
Medio base	**Cantidades**
Caldo Tioglicolato	2.98 g
Extracto de Levadura	1 g
Agar technical Nº 2 (OXOID)	0.1 g
Agua destilada	100 ml

1. Pesar 2.98 g de caldo tioglicolato.
2. Pesar 1 g de extracto de levadura.
3. Pesar 0.1 g de agar technical Nº2.
4. Medir en una probeta 100 ml de agua destilada.
5. Colocar en un frasco con tapa el medio de tioglicolato, el extracto de levadura e ir añadiendo conjuntamente poco a poco el agua.
6. Mezclar todo hasta su completa homogenización.
7. Esterilizar el medio en el autoclave a 121°C y 1.5 atm de presión por 20 minutos.
8. Enfriar y dispensar aproximadamente entre 7 ml a 8 ml en tubos Corning de 15 ml con tapa rosca estériles.
9. Conservar el caldo a 4°C.

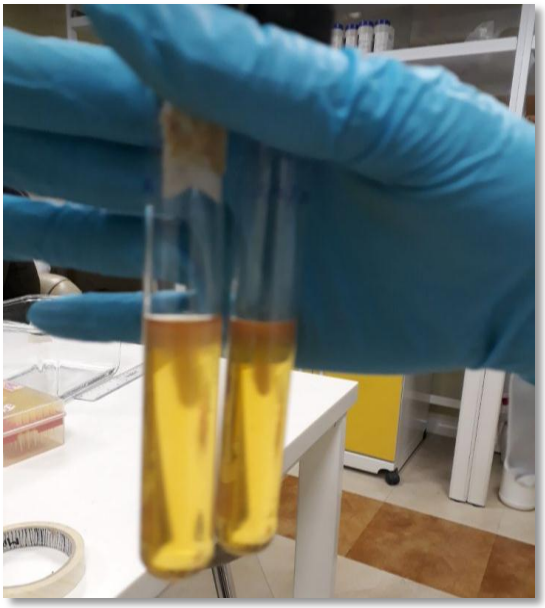


Figura 12. Caldo tioglicolato inoculado con una cepa de *Arcobacter spp.*

Fuente: Autora

Elaboración: Autora.

ANEXO 6: Criopreservación

Criopreservación en gricerol

1. A partir de un cultivo puro, tomar con un hisopo estéril todas las colonias.
2. Inocular dentro del criotubo que contiene gricerol.
3. Dejar reposar durante 15 min.
4. Retirar el glicerol restante e identificar las muestras.
5. Almacenar los criotubos a -80 ºC.

Criopreservación DMSO

1. Inocular en caldo tioglicolato la cepa de *Arcobacter* aislada y dejar incubar a 30 ºC de 24-48 h.
2. Tomar 900 µl de la parte superior del cultivo en tioglicolato y colocar en un eppendorf de 1.5 ml.
3. Añadir 100 µl de DMSO, dar vórtex e identificar las muestras.
4. Almacenar las muestras a -80 ºC.

ANEXO 7: Protocolo de Extracción de ADN Genómico de Bacterias gram negativas

Este protocolo fue basado en el empleo del kit de purificación de ADN genómico de Wizard® para la obtención de ADN procedente de células blancas de la sangre, cultivos celulares, tejido vegetal, verduras y bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Esta extracción se realiza en cuatro pasos. 1) lisis o rotura de la membrana celular y nuclear. 2) digestión enzimática mediante el uso de RNAsas. 3) Eliminación de proteínas celulares por precipitación salina, quedando el ADN genómico de alto peso molecular en la solución. 4) el ADN es concentrado y desalinizado mediante precipitación con isopropanol.

NOTA: El Kit debe ser almacenado a temperatura ambiente (15-30ºC).

REACTIVOS

- Solución de Lisis Celular
- Solución de Lisis Nuclear
- Solución de Precipitación proteica
- Solución de Rehidratación de ADN
- RNAsa A (4mg/ml)
- Isopropanol
- Etanol al 70%

MATERIALES Y EQUIPOS

- Tubos eppendorf de 1.5 ml
- Plancha calentadora de tubos
- Micro-centrifuga
- Vórtex
- Micropipetas
- Hielo

PROCEDIMIENTO

1. Tomar 1ml de cultivo de bacterias incubado durante la noche y depositarlo en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
2. Centrifugar a 13.000 – 16.000 rpm durante 5 min hasta obtener un sedimento celular. Eliminar el sobrenadante.
3. Añadir 600 µl de Solución de Lisis Nuclear. Resuspender las células o dar vórtex.
4. Incubar a 80ºC durante 5 min para lisar las células y dejar enfriar a temperatura ambiente.

5. Añadir 3 µl de RNAsa, invertir suavemente los tubos de 2-5 veces para mezclar.
6. Incubar a 37ºC durante 15-60 min. Enfriar las muestras hasta temperatura ambiente.
7. Añadir 200 µl de Solución de Precipitación Proteica al lisado celular tratado con RNAsa. Dar vórtex vigorosamente durante 20 segundos para mezclar.
8. Incubar las muestras en hielo durante 5 min.
9. Centrifugar a 13.000 - 16.000 rpm de 3-6 min.
10. Transferir el sobrenadante que contiene el ADN hacia un tubo eppendorf que contenga 600 ml de isopropanol a temperatura ambiente.

NOTA: Dejar una pequeña cantidad de sobrenadante a fin de evitar la contaminación del ADN con residuos de proteínas.

11. Mezclar suavemente invirtiendo los tubos hasta que las hebras de ADN formen un conglomerado visible.
12. Centrifugar a 13.000 – 16.000 rpm durante 5 min
13. Cuidadosamente eliminar el sobrenadante y conservar el pellet. Añadir 60 µl de etanol al 70 ºC y mezclar suavemente invirtiendo el tubo varias veces para lavar el pellet de ADN.
14. Centrifugar a 13.000 – 16.000 rpm durante 2 min. Cuidadosamente aspirar el etanol y desechar.
15. Dejar secar el pellet durante 10-15 min.
16. Añadir 100 µl de solución rehidratante de ADN al tubo y rehidratar el ADN, incubar a 65ºC durante 60 min.

NOTA: Dar pequeños movimientos periódicamente para mezclar la solución con el ADN.

17. Conservar el ADN obtenido a 2-8 ºC.

ANEXO 8: Multiplex-PCR para identificación de especies de *Arcobacter.*

Este protocolo está diseñado para la identificación de cinco especies (*A. butzleri, A. cryaerophilus, A. skirrowii, A. thereius* y *A, cibarius*) pertenecientes al género *Arcobacter.*

REACTIVOS

- Buffer Green
- dNTPs
- $MgCl_2$
- TaqPolimerasa
- Agua destilada estéril
- Primers

MATERIALES Y EQUIPOS

- Micropipetas
- Tubos eppendorf 1.5 ml
- Microtubos y tapas de 0.2 ml para PCR
- Termociclador

PROCEDIMIENTO

1. Prepara el mix según las especificaciones de la tabla.

Multiplex-PCR				
Componentes		**1X (µl)**	**Concentración**	**Concentración final**
H_2O		9.375		
Buffer Green		5	5 X	1 X
dNTPs		0.5	10 mM	200 µM
$MgCl_2$		1.5	25 mM	1.5 mM
Primers	ArcoF	0.5	100 µM	5 µM
	ButR	0.5	100 µM	5 µM
	TherR	0.5	100 µM	5 µM
	CibR	0.5	100 µM	5 µM
	SkiR	0.5	100 µM	5 µM
	GyrasF	0.5	100 µM	5 µM
	GyrasR	0.5	100 µM	5 µM
TaqPolimerasa		0.125	5 U/µl	1.25U/50 µl
ADN		5		
Volumen de reacción		25		

2. Dispensar 20 µl del mix en cada microtubo y añadir 5 µl de ADN de cada una de las muestras.
3. Mezclar cuidadosamente el ADN con el mix y llevarlo al Termociclador en base a las condiciones.

Condiciones de la Multiplex-PCR touchdown.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	2 min.	1
Desnaturalización	95	45 seg.	8
Anillamiento	61	45 seg.	
Extensión	72	2 min.	
Desnaturalización	95	45 seg.	27
Anillamiento	56	45 seg	
Extensión	72	2 min	
Extensión final	72	10 min	1

4. Terminada la PCR los productos de PCR son conservados a 4 ºC, hasta su uso.

ANEXO 9: Electroforesis en Gel de Agarosa

REACTIVOS

- Agarosa Ultrapura
- Buffer TAE 1X
- SYBR
- Marcador de 100 pb

MATERIALES

- Micropipeta
- Matraz de 250 ml
- Probeta de 50 ml
- Espátula
- Cubeta para geles de electroforesis
- Balanza analítica
- Fuente de poder
- Transiluminador UV

PROCEDIMIENTO

1. Pesar 0.7 g de agarosa UltraPure™ de Invitrogen.
2. Medir con ayuda de una probeta 35 ml de TAE 1X.
3. En un matraz limpio y seco, añadir la agarosa y el TAE 1X, disolver por calentamiento hasta su completa homogenización o hasta observar un líquido completamente transparente. Evitar llegar a la temperatura de ebullición con el fin de no perder producto.
4. Añadir 3.5 µl de SYBR a la solución y mezclar.
5. Verter el contenido total líquido en la bandeja de electroforesis, ubicar la peineta y reservar hasta la solidificación del gel.
6. Remover la peineta y accesorios. Colocar el gel de agarosa en la cubeta de electroforesis y adicionar TAE 1X hasta cubrir completamente.
7. En los pocillos correspondientes colocar 2 µl de marcador de peso molecular (100pb), seguidamente de 4 µl de cada uno de los controles y de las muestras resultantes de la PCR-múltiple.

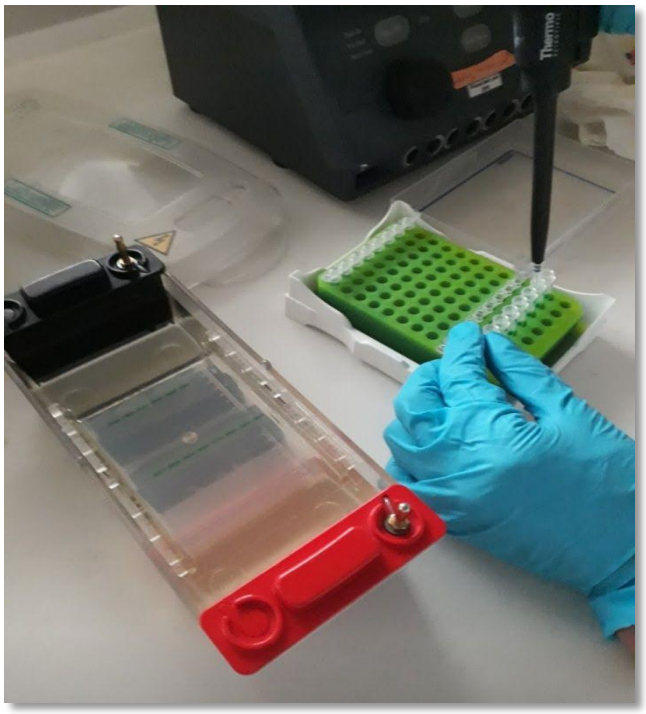


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa**.**

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

8. Tapar la cubeta y conectar los electrodos a la fuente de poder.

9. Programar la corrida a 120 V / 300 mA por 60 min.

10. Revelar gel en luz UV en transiluminador UV Enduro™ GDSTOUCH Labnet.

ANEXO 10. Determinación de actividad antimicrobiana.

Criterios de interpretación de susceptibilidad antimicrobiana.			
Antibióticos	**Concentración del disco (µg)**	**Diámetro del punto de corte (mm)**	
		S ≥	R<
Eritromicina	15	20	20
Gentamicina	10	17	14
Ciprofloxacina	5	26	26
Ácido nalidíxico	30	19	14
Ampicilina	10	14	14
Tetraciclina	30	30	30

1. Tomar con un hisopo estéril colonia del cultivo puro y colocarlo en 2 ml de solución fisiológica, homogenizar y ajustar la turbidez de 0.5 en la escala McFarlan.
2. Dar vórtex.
3. Sembrar mediante hisopado continuo en Medio Agar Muller Hilton, enriquecido con extracto de levadura y 5% de sangre.
4. Colocar los discos de antibióticos e incubar a 30°C por 48 horas.

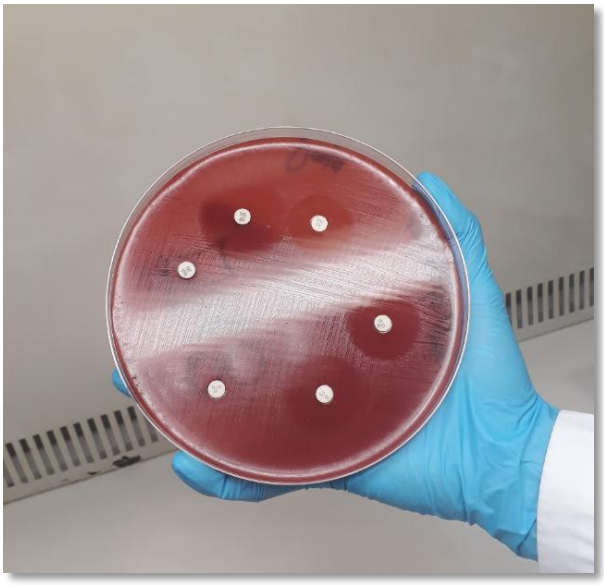


Figura 14. Determinación de la actividad antimicrobiana

Fuente: Autora
Elaboración: Autora.