



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA EN CEPAS DE  
*Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* AISLADAS DE BOVINOS DE  
CARNE Y CERDOS.**

**DIEGO ENRIQUE PULGAR CÁCERES**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

PROFESORA GUÍA: LISETTE LAPIERRE ACEVEDO

Proyecto Fondecyt 11110200

**SANTIAGO, CHILE**

**2016**

A mis padres y hermanas que me apoyaron en este proceso, sin ustedes esto no sería posible. A mis amigos de la U gracias por todo lo vivido juntos, lo bueno y lo malo, Paula, Pablo, Camen, Juan y a todos los amigos entrañables que de una u otra forma compartieron este hermoso proceso, simplemente gracias y Cata fuiste tremendamente importante en esta última etapa, gracias por todo.

## RESUMEN

La resistencia a los antibióticos es un problema de salud pública mundial, ya que complica y encarece el tratamiento de las enfermedades infecciosas. En el caso de *Campylobacter spp.*, este es un problema emergente, dado que en los últimos años se ha observado un incremento en la resistencia a antibióticos principalmente a las fluoroquinolonas y macrólidos. Esto es de gran importancia dado que estos fármacos son utilizados como primera elección para el tratamiento de campilobacteriosis. El uso indiscriminado, no solo en producción animal, sino también en medicina humana se describe como unas de las principales causas de este fenómeno. En Chile, existen muy pocos estudios sobre la susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Campylobacter spp.* El objetivo de este trabajo fue evaluar la susceptibilidad a los antibióticos en 120 cepas de *Campylobacter spp.*, provenientes de cerdos y 60 cepas aisladas de bovinos de carne. Los antibióticos analizados fueron ciprofloxacino, tetraciclina, eritromicina y gentamicina. Se utilizaron dos métodos, primero se realizó un screening con la técnica de Kirby Bauer y todas aquellas cepas que resultaron resistentes, fueron sometidas a determinación de concentración mínima inhibitoria en placa mediante el Método Etest. Se analizaron 180 cepas y se observó que el 10,5% de ellas fueron resistentes a gentamicina, el 57,9% a eritromicina, el 82,6% a ciprofloxacino y el 91,4% lo fue a tetraciclina, mientras que el 87,1% de las cepas fueron clasificadas como multiresistentes. Nuestros resultados indican que los niveles de resistencia a los antimicrobianos en las cepas de *Campylobacter spp.*, son elevados especialmente para ciprofloxacino y tetraciclina. Esto hace necesario proponer y establecer sistemas de vigilancia de la resistencia en este patógeno, con un enfoque integral entre Medicina Veterinaria, Medicina Humana y en producción de alimentos, con el fin de resguardar la salud pública.

Palabras claves: *Campylobacter spp.*, sensibilidad antimicrobiana, bovinos, cerdos.

## **ABSTRACT**

Antibiotic resistance is a public health problem, because it complicates and increases the cost of treatment of infectious diseases. As for *Campylobacter spp.*, this is a relevant emerging problem, since in recent years it has seen an increase in antibiotic resistance mainly to fluoroquinolones and macrolides. This is of great importance since drugs are used as the first choice for the treatment of campylobacteriosis. Their indiscriminate use not only animal production but also in human medicine, is described as one of the main causes of this phenomenon. In Chile, there are only a few studies on the antimicrobial susceptibility of *Campylobacter spp* strains. This study was meant to evaluate the susceptibility to antibiotics in 120 strains of *Campylobacter spp* isolated from pigs and 60 strains isolated from beef cattle. The antibiotics analyzed were: ciprofloxacin, tetracycline, erythromycin and gentamicin. Two methods were used, the first, the Kirby Bauer screening technique and all of those strains that performed resistant on this test, were subjected to determination of minimum inhibitory concentration MIC`s through Etest Method. A total of 180 strains were evaluated, and of these 10.5% strains were resistant to gentamicin, 57.9% to erythromycin, 82.6% to ciprofloxacin and 94.1% to tetracycline. Also, a total of 87.1% from the tested strains were multiresistant. Our results indicate that levels of antimicrobial resistance in strains of *Campylobacter spp.*, they are higher especially for ciprofloxacin and tetracycline. Making it necessary to propose and establish systems for monitoring and reporting of resistance in this pathogen, an integrated approach between Veterinary Medicine, Food production and Human Medicine, in order to protect public health.

**Keywords:** *Campylobacter spp.*, antimicrobial susceptibility, pigs, beef cattle.

## Introducción

*Campylobacter* spp., es una bacteria zoonótica, agente causal de la campylobacteriosis que es considerada una enfermedad transmitida por los alimentos (ETA). En los países desarrollados es el primer agente de gastroenteritis en el ser humano y el segundo o tercero en las naciones en vías de desarrollo.

Las aves de consumo y sus subproductos constituyen uno de los principales reservorios y fuentes de infección humana, no obstante, las bacterias del género *Campylobacter* spp., se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, reconociéndose como portadores naturales a una gran variedad de animales, tanto domésticos como de vida silvestre, entre los que podemos mencionar: vacunos, cerdos, ovejas, aves de corral, cabras, perros, gatos, roedores, entre otros. Esta bacteria provoca más casos de diarrea transmitida por los alimentos que *Salmonella* (OMS, 2011), siendo *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, las especies patógenas más frecuentemente asociadas a campilobacteriosis en humanos (García *et al.*, 2009).

La campilobacteriosis es una enfermedad autolimitante; la cual, por lo general no requiere tratamientos con antibióticos, sin embargo, en el caso de infecciones graves o prolongadas y en pacientes inmunocomprometidos, es necesario su uso.

En la actualidad, macrólidos y fluoroquinolonas son los antimicrobianos de primera y segunda elección, respectivamente, en el tratamiento de la campilobacteriosis (Rivera *et al.*, 2011). Lamentablemente, en los últimos 20 años en todo el mundo, se ha observado un aumento en la resistencia a estos antibióticos en cepas de *Campylobacter* spp. (Rivera *et al.*, 2011). La resistencia bacteriana es un problema grave de preocupación mundial, que se produce por múltiples causas, y que como consecuencia puede llevar al fracaso terapéutico.

El riesgo más importante para la salud de los consumidores, vinculado con la utilización de antibióticos en animales, es el desarrollo de resistencia en bacterias zoonóticas, donde hay un potencial de transferencia de bacterias resistentes desde los animales al hombre (Errecalde, 2012). Para poder establecer medidas de control es necesario primero realizar un diagnóstico de la situación de la resistencia a los antibióticos en este patógeno en cepas aisladas en nuestro país.

## GENERALIDADES

*Campylobacter spp.*, es considerada como el primer agente etiológico de diarrea en el ser humano en los países desarrollados y el segundo en los países en vía de desarrollo. La incidencia de infecciones por *Campylobacter* notificadas se ha incrementado notablemente en países desarrollados en los últimos años (ISP 2014). Por ejemplo en la Unión Europea (EU) se han confirmado alrededor de 200 mil casos por año (Calciati *et al.*, 2012). Las especies termotolerantes, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, son las más frecuentemente aisladas en casos de diarrea aguda en el hombre (Tamborini *et al.*, 2012). Más del 80% y aproximadamente el 10% de los casos humanos son causados por *C. jejuni* y *C. coli*, respectivamente (EFSA, 2011)

La familia *Campylobacteraceae*, pertenece a la clase Epsilon de las *Proteobacterias* y consta de dos géneros, *Campylobacter* y *Arcobacter* y se presentan principalmente como comensales en animales domésticos (Silva *et al.*, 2011). Las bacterias del género *Campylobacter spp.*, son bacilos Gram-negativos, microaerófilos, móviles, curvados o en espiral (Silva *et al.*, 2011). La mayoría de las especies de este género crecen a una temperatura de 37°C, a excepción de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari* que pueden también crecer a 42°C (Cervantes y Cravioto, 2007).

El diagnóstico presuntivo de esta bacteria, puede realizarse por la observación del microorganismo en examen directo o a través del cultivo bacteriano (Malbrán, 2001). En el caso del cultivo y aislamiento a partir de una muestra, se requiere de una atmósfera microaerófila, además de medios de cultivo selectivos para inhibir la microbiota acompañante e incubar a una temperatura de 42°C en el caso de los *Campylobacter* termotolerantes como son las especies *C. jejuni* y *C. coli* por 48 horas (Malbrán, 2001). La identificación final clásica para la especie *C. jejuni* se realiza determinando sensibilidad al ácido nalidíxico y cefalotina; producción de ácido sulfhídrico e hidrólisis del hipurato (Malbrán, 2001). *C. jejuni* se puede diferenciar de otras especies de *Campylobacter* por medio de la hidrólisis del hipurato, ya que es la única especie hipurato-positiva (Malakauskas, *et al.*, 2006). La especie además puede identificarse por técnicas como reacción de la polimerasa en cadena.

## EPIDEMIOLOGÍA

La vía de transmisión de *C. jejuni* y *C. coli* en humanos es la manipulación y/o el consumo de carne contaminada mal cocida, especialmente carne de aves de corral o por la contaminación cruzada de otros productos alimenticios. Sin embargo, *Campylobacter* spp., también se puede adquirir a partir del consumo de carnes de bovino, leche no pasteurizada, carne de cerdos y agua contaminada (van Vliet y Ketley, 2001).

La información publicada sobre la incidencia de *Campylobacter* spp., en animales destinados a consumo humano, confirma que este patógeno también se encuentra comúnmente en ganado vacuno, cerdos, vacas lecheras, y cordero. De hecho, el tracto digestivo de los bovinos sanos ha demostrado ser un reservorio de consideración para cepas de *Campylobacter* spp, con una frecuencia de aislamiento desde un 5% a un 76% en heces de ganado vacuno, de las cuales, la mayor proporción son *C. jejuni* y *C. coli* (Silva *et al.*, 2011). Respecto de los cerdos como reservorio de *Campylobacter* spp., la literatura señala que esta bacteria puede ser aislada desde sus heces en una amplia gama de frecuencias hasta en un 100%. Los cerdos portan una mayor proporción de especies de *C. coli* que de *C. jejuni*. En América del Sur la prevalencia de *Campylobacter* spp., varía entre un 15-35% en bovinos y de 37-60% en cerdos (Fernández *et al.*, 2007). Específicamente en el caso de Chile, existen pocos estudios pero se señala una frecuencia de aislamiento de *C. jejuni* en bovinos es del 22,5% y en cerdos es de un 95% y en *C. coli* las frecuencias van entre un 7,5% y 55% en muestras de heces de bovinos y cerdos respectivamente (Fernández, 2011).

La campilobacteriosis es una enfermedad que afecta a todos los rangos etarios, pero principalmente a niños menores de 4 años y adulto mayor (Cervantes y Cravioto, 2007). La principal manifestación es diarrea inflamatoria con dolores abdominales severos dolor abdominal agudo, que a menudo es acompañado de fiebre y malestar general. Los síntomas progresan desde una diarrea profusa a una diarrea con mucosidad y sangre (Silva *et al.*, 2011). La enfermedad suele ser autolimitada pero en casos severos o prolongados, donde la infección es en pacientes inmunocomprometidos, así como también en pacientes muy jóvenes menores de 4 años, ancianos o aquellos pacientes en los que la enfermedad dure más de una semana, estos pacientes pueden requerir tratamiento con antimicrobianos (Lehtopolku *et al.*, 2010). Para el tratamiento clínico de la

campilobacteriosis, los macrólidos (MC) se consideran los fármacos de primera elección y las fluoroquinolonas (FQ) como segunda elección. Otros antibióticos alternativos incluyen las tetraciclinas y gentamicina, que se utilizan en casos de infección sistémica. Sin embargo, *Campylobacter spp.*, es cada vez más resistente a los antibióticos clínicamente importantes (Luangtongkum *et al.*, 2009). Las complicaciones después de la infección por *Campylobacter spp.*, son infrecuentes pero pueden ser muy graves como es el Síndrome de Guillan Barré (Van Vliet y Ketley, 2001).

### **Resistencia a los antimicrobianos en *Campylobacter spp.***

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es el fenómeno por el cual un microorganismo deja de verse afectado por un antimicrobiano al que anteriormente era sensible (OMS, 2012); la RAM desarrollada por *Campylobacter* es un hecho de preocupación a nivel mundial y definido como un problema de salud pública por parte de la OMS (Silva *et al.*, 2011).

La campilobacteriosis generalmente es una enfermedad gastrointestinal que sólo en raras ocasiones se le asocia con manifestaciones extra intestinales, como por ejemplo: septicemia, infección de la piel y subcutáneo, endocarditis o meningitis (Lehtopolku *et al.*, 2010). La presentación de estas manifestaciones requiere tratamiento con antibióticos, sin embargo esta bacteria cada vez está siendo más resistente a los antibióticos, especialmente a los de la familia de las fluoroquinolonas. El uso y abuso de antibióticos en producción animal y en medicina humana, puede influir en el desarrollo de cepas de *Campylobacter* resistentes a los antibióticos (Luangtongkum *et al.*, 2009).

Se ha reportado un rápido incremento de cepas de *Campylobacter spp.*, resistentes a antimicrobianos. Antes de 1992, la resistencia a las FQ era poco observado en Estados Unidos y Canadá, pero estudios recientes reportan que aproximadamente el 19-47% de las cepas aisladas desde humanos son resistentes a ciprofloxacino (Zhao *et al.*, 2010). En distintos países de la Unión Europea se ha observado un aumento de las infecciones con cepas resistentes a FQ, como en el caso de Finlandia que la tasa de resistencia a FQ se incrementó desde un 40% en 1995, a un 60% en el año 2000 (Zhao *et al.*, 2010; Lehtopolku *et al.*, 2010).

En algunos países se ha observado un aumento de cepas resistentes a los macrólidos. En Canadá y en los Estados Unidos se ha reportado que la prevalencia de cepas

resistentes a eritromicina tanto en *C. jejuni* como en *C. coli* aisladas desde humanos y bovinos es menor al 10%, en contraste más del 40% de las cepas de *C. coli* aisladas de cerdos en los Estados Unidos son resistentes a este fármaco (Luangtongkum *et al.*, 2009). Hasta el momento, la resistencia a los macrólidos se ha mantenido en un nivel bastante bajo y estable. Sin embargo, algunos estudios muestran que la tasa de resistencia a los macrólidos puede estar aumentando lentamente (Lehtopolku *et al.*, 2010).

En América Latina, *Campylobacter* ha sido aislado con menor frecuencia que en países industrializados, representando cerca del 25% de los casos de diarrea en la pacientes humanos, con mayor prevalencia de *C. coli* que de *C. jejuni* (Fernández, 2011).

En distintos países sudamericanos se ha estudiado el comportamiento de *Campylobacter spp.*, frente a diferentes antimicrobianos, demostrando la aparición de cepas aisladas desde pacientes humanos y desde animales, resistentes a eritromicina, tetraciclina, ampicilina y a quinolonas, encontrándose que la resistencia a esta última familia ha sido explosiva, alcanzando tasas superiores al 50% (Fernández, 2011).

Por todas estas razones, la resistencia a los antibióticos que han desarrollado los patógenos como *Campylobacter spp.*, tanto en cepas aisladas desde humanos como desde animales, es un hecho de preocupación a nivel mundial. Este ha sido descrito por diversos investigadores y definido como un problema importante de salud pública por parte de la OMS (Silva *et al.*, 2011), el que debe ser estudiado e investigado para poder proponer medidas de control con base científica.

## **HIPÓTESIS**

Dado los antecedentes señalados se postula que existen cepas de *Campylobacter* spp., aisladas desde animales de producción como son bovinos de carne y cerdos resistentes a los antimicrobianos de uso en clínica humana.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la susceptibilidad a eritromicina, ciprofloxacino, tetraciclina y gentamicina en cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas desde bovinos de carne y cerdos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1.- Determinar la susceptibilidad a eritromicina, ciprofloxacino, tetraciclina y gentamicina en las cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas desde heces de bovinos de carne y desde heces de cerdos.

2.- Describir los perfiles de resistencia fenotípicos observados en las cepas bacterianas aisladas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El estudio se realizó en dos fases, la primera fue el cultivo y aislamiento de las cepas de *Campylobacter* spp., y la segunda fue la realización de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

El cultivo de las muestras de heces fue realizado en el Laboratorio de Enterobacterias del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) perteneciente a la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Las cepas fueron aisladas a partir de una cantidad de muestras necesarias para lograr un total de al menos 120 cepas de *Campylobacter* spp. Finalmente se logró aislar un total de 120 cepas desde cerdos y 60 cepas desde bovinos.

### **1.- Recolección de muestras**

Las muestras consistieron en heces de bovinos de carne y cerdos. Estas fueron obtenidas desde animales adultos en peso de faena, en las granjas de producción o en las plantas faenadoras entre agosto y diciembre del 2014. Las muestras se recolectaron mediante

tómulas estériles, desde el recto de los animales. La toma de las muestras fue realizada por un veterinario propio de los planteles o por un veterinario del S.A.G. Para que las muestras fueran representativas, el muestreo se realizó en forma aleatoria, considerando no más de 10 animales por predio en diferentes semanas y meses. Posteriormente, las tómulas se transportaron al laboratorio en medio de transporte Cary Blair (Difco), analizándose en un plazo máximo de 4 horas.

Las tómulas fueron sembradas en agar carbón vegetal, cefoperazona y deoxicolate modificado (mCCDA) (Oxoid®). La incubación de las placas se realizó a 42°C por 48 horas en microaerofilia con jarras de anaerobiosis, con un generador de microaerofilia (Oxoid®). Se seleccionaron colonias que presentaron la forma típica, plana, no hemolíticas de aspecto acuoso, grisáceas, con bordes irregulares y con tendencia a diseminarse (Malbrán, 2001). Para luego ser observadas bajo el microscopio, en donde se buscó la forma y motilidad característica de la bacteria; posteriormente la muestra fue teñida con la tinción de Gram. Las colonias sospechosas fueron resembradas en agar Tripticasa de Soya (Oxoid) con 5% de sangre ovina, e incubadas en las mismas condiciones anteriores pero por 24 horas en agar Tripticasa de Soya (Oxoid) con 5% de sangre ovina (Malbrán, 2001).

Utilizando los métodos de microbiología clásica se realizó la identificación según especie, mediante la prueba del hipurato, que es la única prueba bioquímica utilizada para diferenciación de *C. jejuni* y *C. coli* (OIE, 2008).

*C. jejuni* se puede diferenciar de otras especies de *Campylobacter* sobre la base de la hidrólisis del hipurato, ya que esta es la única especie que lo hidroliza (OIE, 2008). Se suspendió una alícuota de una o más colonias sospechosas en 400 µl de solución de hipurato sódico al 1%, posteriormente la solución fue incubada a 37°C durante 2 horas, después se añadió lentamente 200 µl de solución de ninhidrina al 3,5% a un extremo del tubo para formar una capa superpuesta. Se re incubó a 37°C durante 10 minutos, para finalmente leer la reacción. La reacción es positiva cuando la solución se torna de un color azul/violeta oscuro y negativa cuando se torna de un color clara o gris (OIE, 2008).

La identificación final se realizó mediante la reacción de la polimerasa en cadena o PCR, en un estudio realizado por Oyarzún, 2014 (datos no publicados). Para ello, el ADN de las cepas se obtuvo por calentamiento en un termociclador (Bioer®) a 99°C y

centrifugación a 5.000 rpm por 10 minutos. Se cuantificó el ADN obtenido mediante espectrofotometría. Se siguió el protocolo descrito por wang *et al.*, 2012, considerando los *primers* que amplifican para los genes *hipO* de *C. jejuni* y *glyA* de *C. coli* (Tabla 1).

### **Objetivo específico Nº 1:**

El estudio de susceptibilidad a los antimicrobianos se realizó en el Laboratorio de Inocuidad de Alimentos (LIA) perteneciente al Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Se evaluó la sensibilidad frente a eritromicina, ciprofloxacino, tetraciclina y gentamicina, mediante la técnica de difusión en agar o Kirby Bauer siguiendo las recomendaciones del CLSI, 2007. Posteriormente las cepas resistentes o con sensibilidad intermedia se evaluaron mediante la técnica del Etest. Ambas técnicas constan de tres etapas fundamentales: la estandarización del inóculo, la aplicación de sensidiscos o de las tiras de antibióticos en la placa sembrada y la lectura de los resultados.

### **Procedimiento:**

#### **1.- Difusión en placa o Kirby Bauer:**

El ensayo de difusión en placa o Kirby-Bauer se realizó de acuerdo a las normas recomendadas por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007).

Desde la placa de cultivo fresco con *Campylobacter spp.*, se seleccionaron entre 3 y 5 colonias (de no más de 48 hrs. en cultivo) y se prepararon los inóculos en suero fisiológico estéril; los tubos fueron calibrados a una concentración estándar de 0.5 del nefelómetro de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  ufc/ml). Cada tubo con la cepa fue agitado mediante vortex por unos 30 a 45 segundos para homogeneizar el contenido. Estos inóculos fueron sembrados con tórula estéril en placas de agar Mueller Hinton Sangre 5% (Biomérieux®) en tres direcciones diferentes; teniendo la precaución de que la placa quedara totalmente sembrada de forma homogénea. Posteriormente utilizando una pinza previamente esterilizada se aplicó los sensidiscos de ciprofloxacino (5µg), tetraciclina (30ug), eritromicina (15µg) y gentamicina (10µg) (Biomérieux®) en cada placa de forma equidistante. Finalmente las placas fueron incubadas a  $37 \pm 0,5$  °C por 48 horas en condiciones de microaerofilia.

Al finalizar el tiempo de incubación se realizó la lectura de los resultados, midiendo con un pie de metro el diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano proyectado desde el centro del sensidisco, interpretándose como Sensible (S), Intermedio (I) o Resistente (R) usando como pauta los rangos establecidos por el CLSI, 2007 (Tabla 2). Los ensayos se realizaron por duplicado y en cada uno se sembró la cepa control *Campylobacter jejuni* ATCC 33560. Los puntos de corte utilizados para la cepa control en los métodos de Etest y difusión en agar, son los descritos por el CLSI, 2007 (Tabla 2). Finalmente solo aquellas cepas que resultaron ser resistentes se les realizó la prueba del Etest para determinar la concentración mínima inhibitoria del antibiótico (CMI; µg/ml)

## **2.- Etest o concentración mínima inhibitoria en placa:**

El método Etest es un método cuantitativo en el cual la lectura es directa desde la tira reactiva y se determina la concentración inhibitoria mínima del antibiótico (CMI) a la cual es inhibida la cepa bacteriana.

El Etest consiste en una tira de plástico no poroso de 6 cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones.

El protocolo para preparar el inóculo y las placas es el mismo que se detalla para la técnica de difusión en disco. Siguiendo el método de difusión, una vez inoculada la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de Etest (Biomerieux®) sobre su superficie, produciéndose de forma inmediata una difusión del antibiótico desde el soporte hasta el agar, creándose de este modo a lo largo de la tira un gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano.

La lectura de las placas se realizó directamente observando el halo de inhibición del crecimiento bacteriano proyectado desde la tira antibiótica, en donde la sensibilidad de la cepa a cada antimicrobiano fue la concentración mínima en donde comenzó el halo de crecimiento bacteriano y se registró la concentración expresada en µg/ml. Estos valores obtenidos fueron comparados con los puntos de corte establecidos para cada antimicrobiano por el CSLI, 2007 (Tabla 2).

## **Objetivo específico N°2**

Con los resultados obtenidos de sensibilidad, utilizando el programa Microsoft Excel 2010® a los cuales se les aplicó estadística descriptiva, se realizaron tablas y gráficos con la descripción de los perfiles de resistencia y multiresistencia. La multiresistencia fue definida como la resistencia conjunta a dos o más antibióticos de distinta clase. Esto también fue considerado para la concentración mínima inhibitoria, tanto en las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas de desde bovinos de carne y las cepas obtenidas desde cerdos.

## **RESULTADOS**

### **1.- Cepas aisladas desde heces de bovinos:**

En bovinos de carne se tomaron 335 muestras, aislando 60 cepas de *Campylobacter spp.*, lo que corresponde a una prevalencia del 17,9%. De ellas 50 cepas fueron clasificadas como *C. jejuni* (83,4%) y 10 como *C. coli* (16,6%). Debido a que la frecuencia de aislamiento de *C. jejuni* y *C. coli* fue baja se decidió trabajar con todas las especies como *Campylobacter spp.*, de las cuales tan solo el 19,4% de ellas presentó resistencia a al menos uno de los antimicrobianos estudiados. En contraste, el 80,6% mostraron susceptibilidad a todos los antimicrobianos analizados; como se muestra en la Tabla 3.

De los 60 aislados de *Campylobacter spp.*, de bovinos, el 12,5% presentó resistencia frente a tetraciclina, a 5,3% a ciprofloxacino y el 1,6% a eritromicina, mientras que todos los aislamientos resultaron ser sensibles a gentamicina. Respecto de los perfiles de multiresistencia de las cepas de *Campylobacter spp.*, se observó que solo 2 (3,3%) cepas mostraron resistencia simultánea a tetraciclina y ciprofloxacino (Figura 1).

### **2.- Cepas aisladas desde heces de cerdos:**

Respecto de las cepas aisladas desde cerdos, se tomaron 227 muestras de las cuales fue posible aislar 120 cepas; el 100% de ellas resultó pertenecer a la especie *C. coli*. Los porcentajes de resistencia que presentaron las cepas aisladas a lo menos a un antimicrobiano fueron del 92,5% (figura 2) y solo 9 cepas (7,5%) mostraron susceptibilidad a todos los antimicrobianos estudiados.

Al observar los niveles de resistencia frente a cada antimicrobiano, los mayores porcentajes se obtuvieron frente a tetraciclina con un 78,9% de las cepas resistentes, seguido de ciprofloxacino (77,3%) eritromicina (56,3%) y gentamicina (10,9%) (Tabla 4 y 5).

El estudio logró determinar que el 83,8% de las cepas de *C. coli* aisladas desde cerdos mostraron multiresistencia (Figura 2). Así mismo en la Tabla 5 se grafica un resumen con los porcentaje de resistencia y distribución de concentraciones mínimas inhibitorias CMI observadas, tanto en bovinos y como en cerdos. El perfil de multiresistencia en cepas de *C. coli* más frecuentemente observado fue eritromicina/tetraciclina/ciprofloxacino (41,6%), seguido de tetraciclina/ciprofloxacino en el 24,1% de las cepas multi-resistentes (Figura 3). A su vez se observó que el 3,3% de las cepas *C. coli* fueron resistentes a todos los antimicrobianos estudiados (Figura 3).

## **DISCUSIÓN**

La incidencia de infecciones por *Campylobacter* notificadas se ha incrementado en países desarrollados y en Chile, en los últimos años (ISP, 2014). La mayoría de las infecciones en humanos (alrededor del 90%) son causadas por *Campylobacter jejuni*, (Hughes *et al.*, 2009). Los resultados de vigilancia del Instituto de Salud Pública de Chile demuestra que entre el 2005 y 2013, las especies más frecuentes que producen campilobacteriosis son *C. jejuni* y *C. coli*, afectando principalmente a niños menores de 10 años (ISP, 2014).

La proporción de cepas de *Campylobacter spp.*, resistentes a los antimicrobianos ha ido en aumento rápidamente siendo similar a otras especies bacterianas. El uso de antimicrobianos en animales destinados al consumo de alimentos y su papel en la propagación de la resistencia en los patógenos transmitidos por los alimentos es un problema de salud pública muy importante (Qin *et al.*, 2011).

Las cepas sensibles pueden volverse resistentes por mutación de sus genes (transmisión vertical) o por adquisición de genes de resistencia a partir de otro microorganismo que ya sea resistente (transmisión horizontal). Este es el primer paso para la aparición de una cepa resistente nueva. *Campylobacter spp.*, adquiere resistencia por estos dos

mecanismos antes señalados, es decir, mediante mutación o por transferencia de genes de resistencia que se movilizan de tres formas: transformación, conjugación y transducción (Luangtongkum *et al.*, 2009).

Las tetraciclinas son antibióticos de origen natural o semisintéticos, frecuentemente utilizados en medicina humana y en medicina veterinaria. Poseen amplio espectro, es decir son activos frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas. Su actividad es bacteriostática, aunque puede llegar a ser bactericida en altas dosis (Chopra y Robert, 2001); la resistencia a tetraciclinas en *Campylobacter spp.*, está relacionada principalmente con un cambio conformacional inducido en el gen de resistencia *tet(O)* el cual se encuentra codificado en un plásmido autotransferible, que puede transferirse entre cepas de *C. jejuni* y *C. coli* (Luangtongkum *et al.*, 2009).

La resistencia a tetraciclinas en cepas de *Campylobacter spp.*, aisladas desde bovinos y humanos ha sido baja, como lo publicado por Pantozzi y colaboradores en 2010; los autores obtuvieron alrededor del 10% de cepas resistentes en cepas de origen humano, algo muy similar a lo observado en las cepas de origen bovino (12,5%) del presente estudio (Tabla 5). Sin embargo se observó que la resistencia a tetraciclina en cepas aisladas desde cerdos (78,9%) (Tabla 3 y 4), fue mayor a lo reportado anteriormente. Estos resultados pueden deberse a su alto uso en producción animal, principalmente en cerdos, dado que es un fármaco de fácil absorción, dosificación y bajo costo (Qin *et al.*, 2011). Además que, las tetraciclinas se utilizan hace muchos años como agentes terapéuticos y/o profilácticos en ganado de engorda, aves de corral y cerdos, entre otros, (Gutiérrez *et al.*, 2010).

Las Fluoroquinolonas (FQ) son antibióticos sintéticos con una potente actividad bactericida frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas (Luangtongkum *et al.*, 2009). El desarrollo principal de resistencia a ciprofloxacino se debería a una mutación simple del gen de *gyrA* y a la exposición prolongada al antibiótico, que genera como resultado resistencia a la familia de las fluoroquinolonas (Luangtongkum *et al.*, 2009). Las fluoroquinolonas son ampliamente utilizadas en el tratamiento y control de enfermedades en la producción de cerdos en China (Qin *et al.*, 2011); en varios países se ha documentado que durante tal tratamiento se pueden desarrollar rápidamente cepas resistentes, además los clones resistentes podrían persistir de forma estable durante

largos periodos de tiempo, los cuales pueden competir fuertemente contra clones susceptibles (Qin *et al.*, 2011).

Los porcentajes de resistencia frente a ciprofloxacino encontrados en cerdos (77,3%), son mayores a los descritos por Fernández en el 2011 (5,3%), pero similares a lo descrito por González-Hein y colaboradores en el 2013, en cepas de *C. jejuni* (70%), provenientes de pacientes pediátricos de la Región Metropolitana. En los pacientes pediátricos no se recomienda usar las fluoroquinolonas como tratamiento empírico de diarrea. Distintas publicaciones han asociado el aumento de la resistencia de *Campylobacter* spp., a fluoroquinolonas con la introducción de estos fármacos en producción animal, principalmente de enrofloxacin, cuyo metabolito activo es ciprofloxacino (González-Hein *et al.*, 2013). En Chile, las fluoroquinolonas y macrólidos están autorizados para su uso en Medicina Veterinaria, de acuerdo con el registro de Medicamentos Veterinarios del Servicio Agrícola y Ganadero (González-Hein *et al.*, 2013).

El uso de antibióticos de la familia de los macrólidos, en producción animal tiene el potencial de seleccionar cepas resistentes y las que además pueden demostrar resistencia cruzada a otros macrólidos. Como resultado las cepas de *Campylobacter* spp., pueden ser, no sólo resistentes a los macrólidos utilizados en animales productores de alimentos (tilosina u otro), sino también a los macrólidos utilizados en medicina humana como eritromicina o azitromicina (Belanger y Shryock, 2007).

En este estudio se observó un 56,3% de resistencia a eritromicina en cepas de *C. coli* aisladas desde cerdos (Tabla 5). La frecuencia de resistencia en cepas de origen humano a eritromicina en países europeos ha sido baja (González-Hein *et al.*, 2013). Lo que concuerda a lo reportado en estudios recientes en nuestro país en donde el 100% de las cepas fueron susceptibles a este antimicrobiano tanto en cepas aisladas desde humanos como de aves de corral (Rivera *et al.*, 2011). Esto podría explicarse por el hecho que la selección de resistencias a macrólidos durante el tratamiento es infrecuente. Sin embargo, ya que los macrólidos se usan en medicina humana y en medicina veterinaria, existe un riesgo de emergencia de resistencia (González-Hein *et al.*, 2013).

Por otro lado, en este estudio la aparición de resistencia a los aminoglucósidos por parte de *Campylobacter* spp., ha sido prácticamente nula, en el caso de *Campylobacter* spp. aislada desde bovinos o muy baja como en *C. coli* aislada desde cerdos (10%)

(Tablas 2 y 3). El nivel de resistencia observado fue similar a lo obtenido en China (23%) por Qin *et al.*, en 2011. Esto puede ser debido a que en producción animal la gentamicina está indicada para el tratamiento de enfermedades extra-intestinales (afecciones broncopulmonares, urogenitales, articulares, diarreas y mastitis) y que además se administra por vía intramuscular, por lo que es más complicado de utilizar en bovinos de carne y por lo tanto, no ejercería una presión de selección en cepas de *Campylobacter spp.* Por otra parte Qin y colaboradores observaron que cepas de *C. coli* aisladas desde cerdos resistentes a tetraciclinas fueron también resistentes a gentamicina, lo cual se debe a que el gen *aphA-3* que codifica para la resistencia a gentamicina estaría ubicado en el mismo plásmido, que el gen *tet(O)* el cual codifica la resistencia a tetraciclinas, en este caso la resistencia sería por co-selección y puede explicar la aparición de resistencia a ambos antibióticos en cerdos (Qin *et al.*, 2011).

En relación a los perfiles de multiresistencia, en este estudio se observó que aquellas cepas de *Campylobacter spp.*, aisladas desde bovinos resistentes a tetraciclinas también lo fueron a ciprofloxacino en niveles bajos (3,3%), mientras que en las cepas de *C. coli* aisladas desde cerdos, los perfiles de multiresistencia más importantes fueron para eritromicina, tetraciclina y ciprofloxacino (41,6%) y además para tetraciclina y ciprofloxacino (21,4%) (Figura 3). Lo que deja muy pocas alternativas de tratamientos para la campilobacteriosis en humanos (Lehtopolku *et al.*, 2010). En este estudio se pudo observar que la resistencia a eritromicina estaba presente en seis de los nueve perfiles de multiresistencia generados en todos los grupos de cepas analizadas (Figura 3).

Si bien el método del Etest no está estandarizado por el CLSI, publicaciones de distintos autores demuestran una buena concordancia entre el método de dilución en agar y difusión en agar Etest (Ge *et al.*, 2002). Actualmente, la prueba de difusión es ampliamente utilizada, ya que es fácil de realizar y más económica que el método de dilución en agar o CIM (Lehtopolku *et al.*, 2011). Se ha señalado que cualquiera de los dos métodos pueden ser usados indistintamente para la obtención de resultados precisos en bacterias fastidiosas, como es el caso de *Campylobacter spp.* (Rennie *et al.*, 2012).

En nuestro estudio las cepas clasificadas como resistentes por el método de Kirby Bauer fueron analizadas por el método de Etest. Todas fueron resistentes para ambos métodos, pero como el método del Etest es cuantitativo, se pudo obtener la concentración exacta a la cual se inhibía el crecimiento bacteriano para cada fármaco analizado. Es interesante

que se pueda estandarizar en el futuro la técnica de Etest con el fin de realizar una medición cuantitativa de la resistencia de forma menos engorrosa que con la técnica de la CIM. El uso intensivo de antibióticos en la producción animal y en medicina humana, parece ser uno de los principales factores en el aumento de la resistencia en patógenos como *Campylobacter spp.* (García *et al.*, 2009).

Los bajos niveles de resistencia de cepas de *Campylobacter spp.*, aisladas desde bovinos de carne pueden verse explicados por la forma de uso de antibióticos en esta producción animal, dado que en Chile la producción es mayoritariamente del tipo extensivo con una menor carga animal, que producciones como cerdos o aves, ya que los bovinos muestreados fueron procedentes de pequeños productores de la Región Metropolitana. Donde, los tratamientos son administrados de forma individual. Por otro lado, las producciones altamente intensivas como es la de cerdos, los animales son tratados en masa por vía oral administrando los antibióticos en el alimento o en el agua, y además estos animales se ven sometidos a mayores infecciones debido al gran número de animales que cohabita en un mismo espacio.

Con los resultados obtenidos se demuestra que las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas desde animales productores de alimentos como son bovinos y cerdos, presentan resistencia a los antimicrobianos utilizados en el tratamiento de la Campilobacteriosis en medicina humana. La contaminación con estas cepas resistentes por parte de la población podrían causar graves consecuencias en el posterior tratamiento de los casos severos o prolongados de Campilobacteriosis, lo que hace más patente la necesidad de un mayor control del uso de antibióticos tanto en la práctica de la medicina veterinaria como en la medicina humana, con el fin último de proteger la salud pública.

A pesar de distintos estudios que demuestran la importancia de *Campylobacter* en salud pública, es evidente que la vigilancia de la sensibilidad antimicrobiana en nuestro país es difícil, ya que la notificación y derivación de *Campylobacter spp.*, en pacientes humanos es baja, debido principalmente a que la mayoría de los laboratorios no estudian este agente, por falta de implementación de técnicas de diagnóstico. Esto a pesar que es agente de vigilancia de laboratorio obligatoria, según lo establece el reglamento sobre notificación de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria N° 158 (Rivera *et al.*, 2011).

Los datos obtenidos en el presente trabajo indican que en Chile, existen cepas de *Campylobacter spp.*, aisladas principalmente de cerdos, con resistencia a los antibióticos analizados. A la luz de la información recopilada de distintos trabajos y de los resultados obtenidos en este estudio, se indica la necesidad de realizar más investigaciones que determinen el origen de la resistencia y de la multiresistencia observada especialmente en cepas de *Campylobacter spp.*, aisladas de cerdo. Esto serviría junto con otros factores epidemiológicos para poder establecer un control sistemático de la presencia de *Campylobacter spp.*, y de cepas resistentes en distintos productos alimenticios de origen animal.

## BIBLIOGRAFÍA

**BELANGER, A.; SHRYOCK, T.** 2007. Macrolide-resistant *Campylobacter*: the meat of the matter. J. Antimicrob. Chemother. 60, 715–723

**CALCIATI, E.; LAFUENTE, S.; DE SIMÓ, M.; BALFAGONC, P.; BARTOLOMÉ, R.; CAYLÀ, J.** 2012. A *Campylobacter* outbreak in a Barcelona school. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 30(5):243–245.

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

**CHOPRA I, ROBERTS M.** 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65: 232-260.

**CLSI. (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE).** 2007. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard. 3<sup>a</sup> ed. CLSI. Wayne, PA. Document M31-A3.

**EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY).** 2011. Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. EFSA Journal (9):2105

**ERRECALDE, J.** 2012. Antimicrobial resistance: ¿Quo Vadis?. Veterinaria (Montevideo) 185: 19-25. [en línea]. <<http://www.revistasmvu.com.uy/revistas/numero185.pdf#page=19>>[consulta:20-12-2014]

**FERNÁNDEZ, H; VERA.; VILLANUEVA.** 2007. *Arcobacter* and *Campylobacter* species in birds and mammals from Southern Chile. Arch. Med. Vet. 39 (2): 163-165.

**FERNÁNDEZ, H.** 2011. *Campylobacter* and Campylobacteriosis: a view from south america. Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica. 28(1): 121-27.

**GARCÍA, P.; VALENZUELA, N.; RODRIGUEZ, M.; LEÓN, E.; FRENÁNDEZ, H.** 2009. Susceptibilidad antimicrobiana de *Campylobacter jejuni* aislado de coprocultivos en Santiago de Chile. Rev. Chil. Infectol. 26: 511-514.

- GE, B.; BODEIS, S.; WALKER,R.; WHITE, D.; ZHAO, S.; McDERMOTT, P.; MENG, J.** 2002. Comparison of the Etest and agar dilution for in vitro antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter*. J. Antimicrob. Chemother. 50(4):487-94.
- GONZALEZ-HEIN. G.; CORDERO, N.; GARCIA, P.; FIGUEROA, G.** 2013. Análisis molecular de la resistencia a fluoroquinolonas y macrólidos en aislados de *Campylobacter jejuni* de humanos, bovinos y carne de ave. Rev, Chil. Infectol. 30(2): 135-138.
- GUTIÉRREZ, K.; ALFARO, M; GRANADOS, F; SÁNCHEZ, J; GARCÍA, F; RODRÍGUEZ, C.** 2010. Detección de tetraciclinas en nueve lotes de alimentos para cerdos, tilapias y pollos producidos en Costa Rica: incumplimiento de normativas y desconformidades con el etiquetado oficial de garantía. Agron. Costarricense. 34(2). 145-151.
- HUGHES, L; BENNETT, M; COFFEY, P; ELLIOTT, P; JONES, T; JONES, R; LAHUERTA-MARIN, A; LEATHERBARROW, A; MC NIFFE, K; NORMAN, D; WILLIAMS, N; CHANTREY, J.** 2009. Molecular Epidemiology and Characterization of *Campylobacter* spp. Isolated from Wild Bird Populations in Northern England. J. Appl. Environ. Microbiol. 75, (10): 3007–3015.
- ISP (INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE).** 2014. Vigilancia de laboratorio de *Campylobacter* spp. Chile, 2005 al 2013. Boletín ISP Chile 4(1) [en línea]. <http://www.ispch.cl/sites/default/files/Bolet%C3%ADn%20Campylobacter.pdf>. [consulta:20-12-2015].
- LEHTOPOLKU, M.; NAKARI, U.; KOTILAINEN, P.; HUOVINEN, P.; SIITONEN, A.; HAKANEN, A.** 2010. Antimicrobial Susceptibilities of Multidrug-Resistant *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Strains: In Vitro Activities of 20 Antimicrobial Agents. J. Antimicrob. Chemother. 54(3): 1232-1236
- LUANGTONGKUM, T.; JEON, B.; HAN, J.; PLUMMER, P; LOGUE, C.; ZHANG, Q.** 2009. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. Future Microbiol. 4(2):189-200.
- MALAKAUSKAS, M.; JORGENSEN, K.; NIELSEN, EM.; B. OJENIYI, B.; OLSEN, J. E.** 2006. Isolation of *Campylobacter* spp. from a pig slaughterhouse and analysis of cross-contamination. Int. J. Food Microbiol. 108(3):295-300.

- MALBRÁN, C.** 2001. Manual de procedimientos *Campylobacter*. Subsecretaría de Investigación y Tecnología. Instituto Nacional de Enfermedades infecciosas. Ministerio de Salud. Argentina. [en línea]. [http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/gss/publications/documents/Argentina-Level1/ManualProcedimientos\\_Campylobacter.pdf](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/gss/publications/documents/Argentina-Level1/ManualProcedimientos_Campylobacter.pdf). [consulta:20-12-2015].
- OMS (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD).** 2011. *Campylobacter*. [en línea] <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/es/index.html>>. [consulta: 8-12-2015].
- OMS (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD).** 2012. Resistencia a los antimicrobianos (RAM) [en línea] <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>>, [consulta: 20-12-15].
- OIE (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL).** 2008. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. OIE Terrestrial Manual Cap. 2 .9.3. 1185-11193.
- OYARZÚN, C.** 2014. Comparación de 4 métodos, para la identificación de las especies *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria (no publicado)
- PANTOZZI, F.; MOREDO F.; VIGO G.; GIACOBONG, I.** 2010. Resistencia a los antimicrobianos en bacterias indicadoras y zoonóticas aisladas de animales domésticos en Argentina. Rev. Argent. Microbiol 42: 49-52.
- QIN, SS.; WU, CM.; WANG, Y.; JEON, B.; SHEN, SQ.; WANG, Y.; ZHANG, Q.; SHEN, J.** 2011. Antimicrobial resistance in *Campylobacter coli* isolated from pigs in two provinces of China. Int. J. Food Microbiol. 146(1):94-98.
- RENNIE, R.P.; TURNBULL, L.; BROSNIKOFF, C.; CLOKE, J.** 2012. First comprehensive evaluation on the M.I.C. evaluator device compared to Etest and CLSI reference dilution methods for antimicrobial susceptibility testing of clinical strains of anaerobes and other fastidious bacterial species. [en línea]. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3318539/>> [consulta: 10-10-15]

- RIVERA, N.; BUSTOS, R.; MONTENEGRO, S.; SANDOVAL, M.; CASTILLO, J.; FERNÁNDEZ, H.; MATURANA, M.; DELGADO, L.; CONTRERAS, A.; CHÁVEZ, D.; QUEVEDO, I.** 2011. Genotipificación y resistencia antibacteriana de cepas de *Campylobacter spp* aisladas en niños y en aves de corral. *Rev. Chil. Infect.* 28 (6): 555-562
- SILVA, J.; LEITE, D.; FERNÁNDEZ, M.; MENA, C.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P.** 2011. *Campylobacter spp.* As foodborne pathogen: a review. *Front. Microbiol.* (2): 1-12.
- TAMBORINI, A.; CASABONA, L.; VIÑAS, M.; ASATO, V.; HOFFER, A.; FARACE, M.; LUCERO, M.; CORSO, A.; PICHEL, M.** 2012. *Campylobacter spp.*: prevalencia y caracterización feno-genotípica de aislamientos de pacientes con diarrea y de sus mascotas en la provincia de La Pampa, Argentina. *Rev. Asoc. Argent. Microbiol.* (44): 266-271.
- VAN VLIET, AH.; KETLEY, JM.** 2001. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* (30): 45S-56S
- WANG, G.; CLARK, C.; TAYLOR, T.; PUCKNELL, C.; BARTON, C.; PRICE, L; WOODWARD, D.; RODGERS, F.** 2002. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* and *C. fetus* subsp *fetus*. *J. Clin. Microbiol.* 40 (12): 4744-47.
- ZHAO, S.; YOUNG, S.; TONG, E.; ABBOTT, W.; WOMACK, N.; FRIEDMAN, S.; McDERMOTT, P.** 2010. Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* Isolates from Retail Meat in the United States between 2002 and 2007. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(24):7949–7956.

**Tabla 1:** Secuencia de los partidores, tamaño del amplificado y temperatura de annealing utilizados en la confirmación de especies de cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*.

Gen	Secuencia del Partidor	Tamaño del amplificado	Temperatura de annealing
<i>hipO</i> <i>C. jejuni</i>	F: 5'- ACTTCTTTATTGCTTGCTGC-3' R: 5'- GCCACAACAAGTAAAGAAGC-3'	323 pb	59 (°C)
<i>glyA</i> <i>C. coli</i>	F: 5'- GTAAAAACCAAAGCTTATCGTG-3' R: 5'- TCCAGCAATGTGTGCAATG-3'	126 pb	59 (°C)

**Tabla 2.** Puntos de corte de la cepa *C. jejuni* ATCC 33560, frente a ciprofloxacino, tetraciclina, eritromicina y gentamicina para los métodos de Etest y Kirby Bauer

Antibiótico	Kirby Bauer (mm)			CIM (µg/ml)*		
	Sensible	Intermedio	Resistente	Sensible	Intermedio	Resistente
<b>Ciprofloxacino</b>	≥15	13-14	≤12	≤ 1	2-3	≥ 4
<b>Tetraciclina</b>	≥23	14-22	≤13	≤ 4	8-9	≥ 16
<b>Eritromicina</b>	≥30	19-20	≤-18	≤ 8	15-16	≥ 32
<b>Gentamicina</b>	≥21	16-20	≤15	≤7	-	≥ 8

(CLSI.; 2007)

\* Los puntos de corte señalados en el CLSI, 2007 son para la técnica de CIM Concentración Mínima Inhibitoria, y estos puntos son los que se utilizaron para el análisis de los resultados de la técnica de Etest.

**Tabla 3.** Porcentaje de cepas de *Campylobacter spp.*, aisladas desde bovinos de carne sensibles y resistentes a diferentes antimicrobianos, para los métodos de Etest y Kirby Bauer. (N=60)

<b>Antibiótico</b>		
	<b>Sensibles</b>	<b>Resistentes</b>
<b>Gentamicina</b>	100%	0%
<b>Eritromicina</b>	98,4%	1,6%
<b>Tetraciclina</b>	87,5%	12,5%
<b>Ciprofloxacino</b>	94,7%	5,3%

**Tabla 4:** Porcentaje de cepas de *C. coli.*, aisladas desde cerdos, susceptibles y resistentes a los diferentes antimicrobianos estudiados, para los métodos de Etest y Kirby Bauer (N=120)

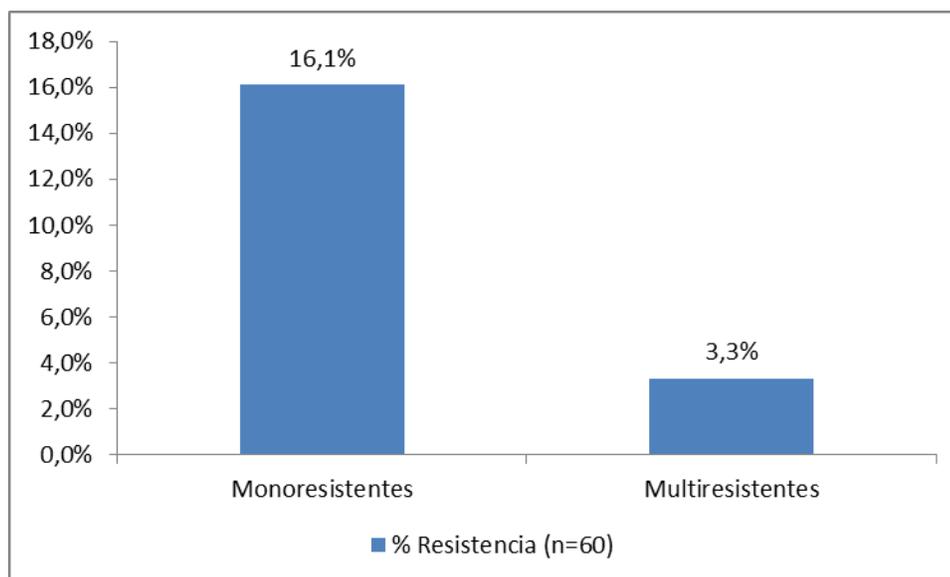
<b>Antibiótico</b>		
	<b>Sensibles</b>	<b>Resistentes</b>
<b>Gentamicina</b>	89,1%	10,9%
<b>Eritromicina</b>	43,7%	56,3%
<b>Tetraciclina</b>	21,1%	78,9%
<b>Ciprofloxacino</b>	22,7%	77,3%

**Tabla 5:** Porcentaje de Resistencia y distribución de Concentraciones Mínimas Inhibitorias ó CIM ( $\mu\text{g/ml}$ ) en cepas de *Campylobacter spp.*, aisladas desde bovinos de carne y cerdos.

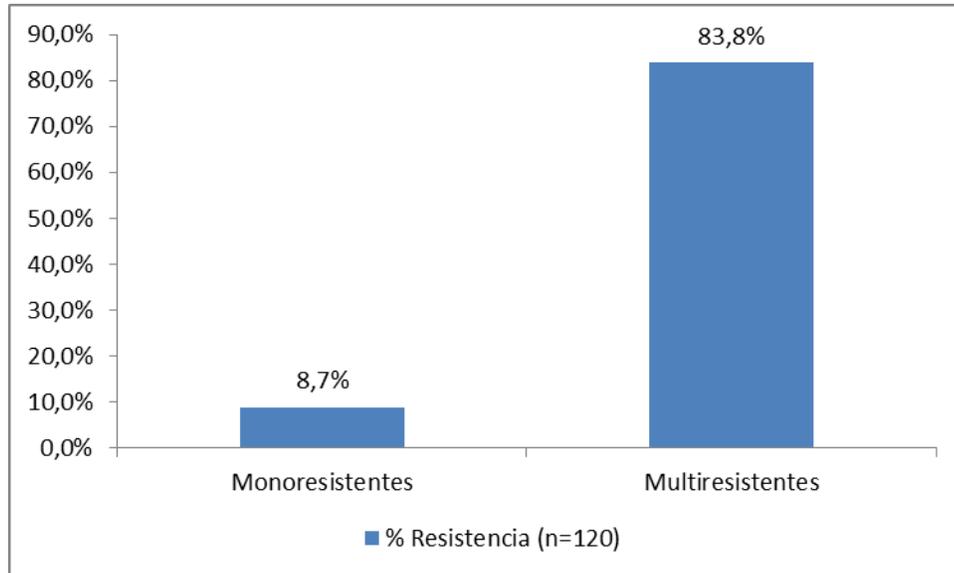
Origen	Antimicrobiano	Resistencia (%)	Distribución (%) de CIM ( $\mu\text{g/ml}$ )												
			$\leq 0.06$	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	
Bovinos de carne n= 60	Gentamicina	0%		39.3	14.3	46.4									
	Eritromicina	1.6%		98.4								1.6			
	Ciprofloxacino	5.3%			57.1	32.2	3.6	1.8	5.3						
	Tetraciclina	12.5%					8.9	35.7	17.9	25.0	12.5				
Cerdos n= 120	Gentamicina	10.5%	11.8	10.5	13.0	8.2	46.0				10.5				
	Eritromicina	56,3		1.1	5.4	17.1	0.9	17.2	0.8	0.8	4.7	13.7	42.6		
	Ciprofloxacino	77.3%			3.5	2.4				5.9	13.6	9.7	19.7	14.8	13.6
	Tetraciclina	78.9%				3.5	13.0	4.7			44.6	19.8	14.5		

Puntos de corte: gentamicina  $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ ; eritromicina  $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ ; ciprofloxacino  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$   
tetraciclina  $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ .

**Figura 1:** Porcentaje de monoresistencia y multiresistencia antimicrobiana en cepas de *Campylobacter jejuni.*, aisladas desde bovinos de carne (N=60)



**Figura 2:** Porcentajes de monoresistencia y multiresistencia antimicrobiana en cepas de *C. coli.*, aisladas desde cerdos (N=120).



**Figura 3:** Perfiles de multiresistencia antimicrobiana en cepas de *C. coli.*, aisladas desde cerdos (N=120).

