



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE POSGRADO Y POSTÍTULO.

**RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS Y CARACTERIZACIÓN DE
FACTORES DE VIRULENCIA DE CEPAS DE *CAMPYLOBACTER* spp.
AISLADAS DE PAVOS.**

MARIO ALEJANDRO MATA CARRANZA

Tesis para optar al Grado de
Magíster en Ciencias Animales y
Veterinarias
Mención Ciencias Avícolas

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Lisette Lapierre A.
UNIVERSIDAD DE CHILE

FUENTE DE FINANCIAMIENTO: PROYECTO FONDECYT N° 11110200.
PROYECTO FIV 2011.
FONDO DE INCENTIVOS MICIT. N° 365-2011.

SANTIAGO, CHILE
2013

AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología (MICIT) y al Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) de Costa Rica, gracias a su aporte económico se hizo posible realizar mis estudios de postgrado.

Al proyecto FONDECYT de iniciación que cubrió los costos relacionados con la parte experimental de esta tesis.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Lisette Lapierre por el apoyo, facilidades y compromiso para realizar esta tesis y así concluir el Magister.

A mis amigos y compañeros de la Universidad de Chile que me apoyaron, acompañaron y brindaron su amistad desinteresada.

A mi familia, en especial a mi madre que siempre me dio el apoyo necesario para llevar a cabo y concluir estos estudios.

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN	6
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
GENERALIDADES.....	8
ETIOLOGÍA.....	8
EPIDEMIOLOGÍA DE CAMPYLOBACTER EN AVES	9
PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD.....	10
FACTORES DE VIRULENCIA.....	10
RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS.....	11
Resistencia de <i>Campylobacter</i> spp. aislados de pavos.....	12
PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE PAVO EN CHILE	13
CAMPYLOBACTER SPP. AISLADOS DE PAVOS EN CHILE.....	13
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO GENERAL.....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
OBJETIVO ESPECÍFICO 1	15
Aislamientos	15
Pruebas de sensibilidad.....	15
Análisis de resultados.....	15
Análisis de perfiles.....	16
OBJETIVO ESPECÍFICO 2	16
Extracción de DNA	16
Identificación de especie.....	16
Caracterización de los genes de virulencia presentes por PCR.....	17
Análisis de resultados.....	17
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN	19
BIBLIOGRAFÍA	23
MATERIAL COMPLEMENTARIO	28
Cuadro 1.....	28
Tabla 1	29
Tabla 2	29
Tabla 3	30
Tabla 4	30
Figura 1	31
Figura 2	32
Figura 3-6.....	33
Figura 7-9.....	34

RESUMEN

La campilobacteriosis es una enfermedad emergente transmitida por los alimentos y es la principal enfermedad gastrointestinal en seres humanos en países desarrollados. El desarrollo de resistencia de *Campylobacter* spp. a los antimicrobianos empleados como tratamiento en personas es un problema de salud pública que está relacionado con el uso inadecuado de estos agentes en los sistemas de salud y en la producción animal. Aún se debe esclarecer la patogenia de esta enfermedad y el mecanismo por el que actúan los factores de virulencia que no son completamente conocidos.

En el mundo existe escasa información de la prevalencia de genes de virulencia de *Campylobacter* spp. aislados de pavos y de igual manera poca información de la susceptibilidad antimicrobiana en esta especie. El objetivo de este trabajo fue determinar los perfiles de resistencia a los antimicrobianos: Ciprofloxacino, Tetraciclina, Eritromicina y Gentamicina de 105 cepas de *Campylobacter* spp. aisladas de sistemas de producción de pavos, empleando la técnica de Kirby Bauer.

Se obtuvieron 76 cepas resistentes a Ciprofloxacino y 42 a Tetraciclina. Ninguna cepa fue resistente a Eritromicina ni a Gentamicina. Del total de las cepas resistentes a Tetraciclina, 41 de ellas fueron multiresistentes (Ciprofloxacino y Tetraciclina). Al mismo tiempo las 105 cepas fueron analizadas por PCR en busca de genes de virulencia asociados con adherencia y colonización (*cadF*, *racR*, *flaA*), invasión (*ciaB*, *pldA*), producción de toxinas (*cdtA*, *cdtC*) y mimetismo del LPS (*wlaN*). La prevalencia de *cadF* fue de 64,8%, *racR* 45,7%, *flaA* 53,3%, *ciaB* 24,8%, *pldA* 36,2%, *cdtA* 65,7%, *cdtC*, 61% y *wlaN* 21%. Los resultados sugieren que existe un potencial patógeno de algunos de los aislamientos y demuestra la necesidad de implementar un plan de vigilancia con el fin de resguardar la Salud Pública.

Palabras claves: *Campylobacter* spp., resistencia antimicrobiana, genes de virulencia, pavos.

SUMMARY

Campylobacteriosis is an emerging disease transmitted by foods, it is also a main human gastrointestinal disease in developed countries. The evolvement of *Campylobacter* spp. resistance to antimicrobials used for treatment in humans is a public health problem, related to the inappropriate use of these agents in animal production and health systems. The pathogenesis of this human disease still needs to be elucidated, since the mechanism by which virulence factors act are not completely known.

In the world there is insufficient information on the prevalence of the virulence genes of *Campylobacter* spp. isolated from turkeys, as well as little information on antimicrobial susceptibility in this species. The aim of this study was to determine the antimicrobial resistance profiles to Ciprofloxacin, Tetracycline, Erythromycin and Gentamicin of 105 strains of *Campylobacter* spp. isolated from turkey production systems using the Kirby-Bauer technique.

As a result we found 76 strains resistant to ciprofloxacin, 42 to Tetracycline, moreover Erythromycin and Gentamicin had no antimicrobial resistance. Of the total tetracycline resistant strains 41 of them were multiresistant (Ciprofloxacin and Tetracycline). These 105 strains were analyzed by PCR for genes associated with virulence adhesion and colonization (*cadF*, *racR*, *flaA*), invasion (*ciaB*, *pldA*), toxins production (*cdtA* *cdtC*) and mimetics of LPS (*wlaN*). With a prevalence of 64.8% *cadF*, 45.7% *racR*, 53.3% *flaA*, 24.8% *ciaB*, 36.2% *pldA*, 65.7% *cdtA*, 61% *cdtC* and 21% *wlaN*. The results suggest that there is a pathogen potential of some of the isolates and demonstrates the necessity of implementing a surveillance plan in order to protect public health.

Keywords: *Campylobacter* spp., antimicrobial resistance, virulence genes, turkeys.

1. INTRODUCCIÓN

Campylobacter es un género bacteriano causante de zoonosis y enfermedad transmitida por alimentos (ETA), de distribución mundial y catalogado como patógeno emergente. En las últimas tres décadas se ha convertido en un tema de salud pública importante, ya que es considerado la mayor causa de enfermedad gastrointestinal en los países desarrollados, ocupando el primer lugar en la Unión Europea desde el 2004 (EFSA y ECDC, 2011) y uno de los primeros en los países en vías de desarrollo. Las especies principalmente implicadas son *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, también en menor grado han emergido *Campylobacter lari* y *Campylobacter upsaliens* (Hermans *et al*, 2012; Levin, 2007; Moore *et al*, 2005).

Los casos de campilobacteriosis en humanos se caracterizan por gastroenteritis y presentación aislada de diarrea que en su mayoría afecta principalmente a niños, adultos mayores y pacientes inmunodeprimidos. Existen reportes escasos de brotes, entre ellos algunos ocurridos en el Reino Unido (Teixeira *et al*, 2011; ACMSF, 2010). Síntomas más severos de la infección pueden incluir diarrea sanguinolenta, artritis reactiva y una forma grave del síndrome Guillain-Barré que involucra la parálisis neuromuscular de las extremidades (Levin, 2007; Moore *et al*, 2005).

La infección en humanos se asocia principalmente al consumo de productos contaminados de origen animal y puede proceder de diversas fuentes: leche cruda, productos de cerdo, destacándose la contaminación cruzada con agua, vegetales y frutos. El consumo de productos avícolas, especialmente carne de pollo es categorizado como el principal factor de riesgo (Maurtua-Neumann y Oberhelman, 2013).

Los mecanismos específicos por los que actúan los factores de virulencia de *Campylobacter spp.* no son completamente conocidos, mas conocer la naturaleza y regulación de estos mecanismos es primordial para prevenir y tratar adecuadamente la enfermedad en humanos (Cervantes y Cravioto, 2007). Diversos genes de virulencia han sido descritos en las cepas de *Campylobacter*, entre ellos los relacionados con adherencia y colonización como *flaA*, *cadF*, *racR* y *dnaJ*, con invasión *virB11*, *ciaB* y *pldA*, con producción de toxinas CDT: *cdtA*, *cdtB* y *cdtC* y uno relacionado con el síndrome Guillain-Barré: *wlaN* (Teixeira *et al*, 2011; Talukder *et al*, 2008).

El tratamiento de la campilobacteriosis en pacientes humanos generalmente incluye tratamiento de sostén como la fluidoterapia, mientras que los antibióticos quedan relegados a casos prolongados o graves. En los casos que necesitan fármacos la

antibioticoterapia de elección son los macrólidos y fluoroquinolonas, específicamente Eritromicina y Ciprofloxacino. Actualmente, hay reportes de aislamientos que presentan resistencia a estos antimicrobianos que hacen difícil el tratamiento (García *et al*, 2009). La resistencia en bacterias zoonóticas se relaciona principalmente al uso inadecuado de los antibióticos en la cadena de producción de alimentos de origen animal y al uso indiscriminado de estos fármacos en los sistemas de salud, que lleva a la selección de bacterias resistentes que pueden transferirse a la población.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1 GENERALIDADES.

Campylobacter spp. fue identificado en 1916 por dos Veterinarios Británicos que reportaron un organismo peculiar en el muco uterino de una oveja preñada. Décadas después en los años 40 la bacteria fue aislada de sangre de mujeres embarazadas que presentaron aborto espontáneo y sepsis, probablemente *Campylobacter fetus* estaba relacionado con estos casos. En lo que concierne a la asociación entre *Campylobacter* spp. y casos de diarrea en humanos se produjo hasta la década de los 70, debido a las dificultades en el cultivo del agente (Butzler, 2004). Actualmente, es el principal agente causante de gastroenteritis en países desarrollados y con una prevalencia importante en los países en vías de desarrollo (Maurtua-Neumann y Oberhelman, 2013).

2.2 ETIOLOGÍA.

El género *Campylobacter* pertenece a la familia Campylobacteraceae, son bacilos, Gram negativos, no esporulados, flagelados, móviles, de colonias incoloras que tiene un mejor crecimiento entre 37° y 42° C. Con forma curva o espiral, poseen medidas que oscilan entre 0,5 a 6,0 µm de largo y 0,2 a 0,8 µm de ancho. Su metabolismo respiratorio es microaerófilico, no fermentadores de carbohidratos, su energía proviene de la degradación de aminoácidos y generan resultados positivos a las pruebas bioquímicas de la Catalasa y Citocromo oxidasa (Levin, 2007).

Existen 25 especies reportadas de *Campylobacter* (Allos, 2012), entre ellas sobresalen las conocidas: *Campylobacter* termofílicas, *C. jejuni* y *C. coli* causantes de cuadros de campilobacteriosis en humanos en al menos 95% de los casos (Zhang, 2008; Butzler, 2004).

Las especies de *Campylobacter* llamadas termofílicas crecen óptimamente a 42° C, conocidas como bacterias fastidiosas, requieren de una atmósfera microaerófila estricta, son sensibles ante altas temperaturas, pH ácido, oxígeno, desecación y estrés osmótico (Zhang, 2008).

2.3 EPIDEMIOLOGÍA DE CAMPYLOBACTER EN AVES.

C. jejuni y *C. coli* se encuentran bien adaptados al tracto intestinal de las aves y están ampliamente distribuidos en ellas. El porcentaje de aves portadoras es mayor en la avicultura que en aves silvestres, ello está asociado a las condiciones propias de producción como la alta densidad que favorece la transmisión del agente. Además, no es un patógeno específico de las aves, en las que ha sido catalogado como un microorganismo comensal (Zhang, 2008).

Con respecto a las especies y sistemas productivos infectados se encuentran: pollos de engorde, reproductoras livianas y pesadas, gallinas ponedoras y pavos en los diferentes sistemas, con una mayor prevalencia en sistemas orgánicos y de pastoreo. En todos estos casos es rara la detección de aves infectadas menores de tres semanas de edad, lo que acrecienta la prevalencia al aumentar la edad de las aves, con un punto máximo de presencia de *Campylobacter* spp. en el momento del sacrificio, donde se pueden encontrar una o varias especies colonizando las aves de un mismo lote (Zhang, 2008). En pavos se ha aislado *Campylobacter* spp. en el tracto reproductor de hembras, a pesar de ello, no se ha demostrado la transmisión vertical (Cole *et al*, 2004).

En cuanto a la prevalencia de *Campylobacter* spp. en aves comerciales los estudios se han centrado en los pollos de engorde. El consumo de pavo aumenta a nivel mundial y pocos estudios disponibles se encuentran relacionados a esta especie, pese a que es un reservorio importante como indican los reportes de la European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) del año 2007. En ellos se encontró una prevalencia del 63,2% en 76 lotes analizados en mataderos (EFSA y ECDC, 2007), mientras Olah y colaboradores en los Estados Unidos, reportan una prevalencia de 34,9% en el 2003 (Olah *et al*, 2003).

En producto terminado de pavo la prevalencia reportada por Zhao y colaboradores alcanza un 15% (Zhao *et al*, 2001), mientras el Sistema Nacional de Monitorización de Resistencia Antimicrobiana (NARMS) de la agencia de alimentos y medicamentos (FDA) de los Estados Unidos, en carne de pavo molida, reporta una prevalencia que varía anualmente del 1% al 6,6% entre el 2002 y el 2011 (NARMS, 2011).

2.4 PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD.

Crushell y colaboradores indican que los mecanismos de patogenicidad son diversos y no completamente conocidos. El primer paso es la invasión de la mucosa intestinal tanto a nivel del intestino delgado como de colon y es mediado por receptores a la adhesina. Seguidamente las bacterias sobreviven y replican en vacuolas intracitoplasmáticas y a través de las proteínas citoletales o citolíticas de distensión (CDT) afectan el ciclo celular, lo que causa distensión y liberación de citoquinas proinflamatorias. Posteriormente las bacterias migran a las células aledañas por uniones estrechas dañadas, lo que da como resultado una enterocolitis inespecífica (Crushell *et al*, 2004).

Campylobacter spp. puede también relacionarse con la presentación de complicaciones como el síndrome Guillain-Barré (SGB) mediante un mecanismo que implicaría la similitud entre el ácido siálico de antígeno O y los gangliósidos humanos (Cervantes y Cravioto, 2007).

2.5 FACTORES DE VIRULENCIA.

En bacterias se han descrito diversos factores de virulencia asociados con adhesión, invasión, producción de toxinas y otros, que afectan los procesos de la célula hospedera. En el caso de *Campylobacter* los mecanismos específicos no son claros por diversos factores: a. La carencia de un modelo animal adecuado; b. Diferencia de interacción con respecto a otros patógenos; c. La variabilidad de la virulencia entre cepas y d. La dificultad inicial para su manipulación genética (Crushell *et al*, 2004).

Por factores de virulencia se reconocen: 1. Motilidad mediada por flagelos; 2. Adherencia a la mucosa intestinal; 3. Capacidad de invasión y; 4. Producción de toxinas (Teixeira *et al*, 2011). Otros factores a considerar son la producción de CDT y el lipopolisacárido (LPS) mimético a los gangliósidos humanos presente en cepas aisladas de pacientes del SGB asociado a la patogenia de la campilobacteriosis (Cervantes y Cravioto, 2007).

Los flagelos están asociados a la motilidad bacteriana, clave para la colonización del intestino delgado y para la sobrevivencia en diferentes medios que se encuentran en el tracto gastrointestinal. En *C. jejuni* el gen *flaA* se reporta como para la invasión de células epiteliales y es responsable de la capacidad de adherencia y colonización celular en el tracto gastrointestinal (Teixeira *et al*, 2011; Jain *et al*, 2008; Jagannathan y Penn, 2005;). El gen *cadF* es asociado a la adherencia por medio de una proteína de membrana externa

que media la adhesión a la fibronectina de la célula hospedero (Ziprin *et al*, 2001). Monteville y colaboradores demostraron la importancia *in vitro* de CadF, probado en mutantes knock-out de *C. jejuni*, obtuvieron una importante disminución en la capacidad de adherencia (Monteville *et al*, 2003).

El gen *racR* está relacionado con la capacidad de invasión intestinal por señales de transducción dependientes de temperatura (Brás *et al*, 1999). Mientras que, el gen *dnaJ* codifica para proteínas chaperonas con diversas funciones como el transporte y respuesta al estrés¹, por lo que ocupa un rol importante en la termotolerancia de *C. jejuni* y parece estar bajo el control transcripcional de RacR (Hermans *et al*, 2011).

En lo concerniente a la proteína CiaB² ingresa a la célula huésped durante el proceso de invasión. Konkel y colaboradores encontraron que las cepas de *C. jejuni* carentes de la proteína CiaB tienen una menor invasividad (Konkel *et al*, 1999). Krause y colaboradores sostienen que VirB11 formaría un hexámero en el lado citoplasmático de la parte interna de la membrana y proveerían de energía para la secreción intracelular de sustratos (Krause *et al*. 2000). El gen *pldA* codifica para la producción de fosfolipasa que ayuda en la ruptura de la capa de mucina durante la invasión a la célula huésped (Ziprin *et al*, 2001).

La CDT está formada por tres subunidades denominadas A, B y C. CdtB es la nucleasa que unida a CdtA y CdtC forman un complejo ternario que transloca a CdtB en la célula hospedera donde actúa rompiendo el DNA eucarionte. Así la DNAasa produce ruptura de la cromatina, lo que causa la muerte celular al detener el proceso de crecimiento y división celular en la fase G2/M (Crushell *et al*, 2004).

El gen *wlaN* se presume que está relacionado con la expresión mimética del SGB (Talukder *et al*, 2008).

2.6 RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS.

La resistencia a los antibióticos utilizados como tratamiento que presenta una cepa zoonótica es una característica que le da un carácter más virulento a un patógeno. Este tema está en auge en los últimos años, consecuencia del uso y abuso de los antimicrobianos tanto en sistemas productivos como en sistemas de salud. Debido a este

¹ Como el calor.

² Identificada por Konkel y colaboradores.

uso continuo de antibióticos en la producción animal aumenta la probabilidad de emergencia de cepas bacterianas resistentes.

La generación de la resistencia se da mayormente por la mutación de la bacteria o por la adquisición de genes de resistencia, debido comúnmente a la exposición previa a un agente, lo que provoca que se perpetúe la enfermedad e incluso en algunos casos puede ocasionar la muerte del paciente. Ello lleva al encarecimiento de los costos en los sistemas de salud al emplear productos de mayor costo. El uso de medicamentos de mala calidad, subdosificación, prescripciones erróneas, deficiencias de control y prevención de las enfermedades infecciosas son factores en común en los sistemas productivos y de salud que favorecen la resistencia antimicrobiana (OMS, 2012).

Sussmann y colaboradores sostienen que desde el punto de vista molecular y bioquímico existen básicamente tres mecanismos por los cuales una bacteria puede convertirse en resistente a un antibiótico: 1. Inactivación del antibiótico; 2. Alteración del sitio blanco de acción del antibiótico y; 3. Alteración de las barreras de permeabilidad bacteriana (Sussmann *et al*, s.f)

2.6.1 Resistencia de *Campylobacter* spp. aislados de pavos.

Luangtongkum y colaboradores realizaron una retrospectiva en el 2009 y señalan un aumento en la resistencia a los antimicrobianos de cepas de *Campylobacter* spp. aisladas de humanos en los Estados Unidos. En ella reportan una resistencia a Ciprofloxacino entre 19% y 47%, también se menciona una tendencia al aumento de la resistencia en países Europeos al mismo antibiótico. Es así que entre un 17% y un 99% de cepas de *Campylobacter* spp. aisladas de humanos y animales fueron resistentes a Ciprofloxacino en España, y se reporta la misma tendencia en otras regiones como África, Asia, Australia y Nueva Zelandia (Luangtongkum *et al*, 2009).

Belanger y Shryock reportan un 40% de cepas de *C. coli* aisladas de pavos y cerdos resistentes a macrólidos (Belanger y Shryock, 2007). Taylor y Courvalin, y Luangtongkum y colaboradores reportan una resistencia intrínseca de *Campylobacter* spp. a una variedad de antibióticos entre los que se encuentran: Vancomicina, Trimetoprim, Rifampicina, Bacitracina. Ello dado por la baja permeabilidad de *Campylobacter* spp. y a través su bomba de eflujo activa (Luangtongkum *et al*, 2009; Taylor y Courvalin, 1988).

El reporte del NARMS de los Estados Unidos en el 2011 indica que en la carne de pavo molida del total de aislamientos de *C. coli* y *C. jejuni*, no se encontraron cepas resistentes a aminoglicosidos (Gentamicina) ni fenicoles (Florfenicol). En cuanto a las quinolonas (Ciprofloxacino) un 43,2%, a macrólidos un 3,5%, a Tetraciclina un 77,9% y a lincosamidas (Clindamicina) un 1,2% del total de las muestras positivas en ese lapso resultaron resistentes (NARMS, 2011). Lutgen *et al.*, reporta que *C. coli* tiende a ser más resistente a la Eritromicina y Ciprofloxacino al compararlo con cepas de *C. jejuni*, probablemente asociado a una menor diversidad genética en *C. coli* (Lutgen *et al*, 2009).

2.7 PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE PAVO EN CHILE.

Debido a las externalidades positivas desde la perspectiva nutricional, la carne de pavo es cada vez más apetecida, pese a ello el crecimiento de su consumo ha sido lento. La tendencia de consumo y producción de pavo en Chile es al alza según la Asociación de Productores Avícolas de Chile (APA). Para el año 2012, la producción aumentó un 8,6% respecto al 2011, ubicándose Chile como el segundo mayor productor de pavo de Latinoamérica después de Brasil, Chile exporta a la Unión Europea, México, Estados Unidos, Japón, China, Perú y otros mercados un total de US \$80,1 millones anuales (APA, 2013).

El consumo anual de pavo aumentó un 1,9% en el 2012 con respecto al 2011, similar al 2,1% promedio de los últimos cinco años. Chile con un consumo per cápita anual de 3,9 kg encabeza el consumo de pavo en Latinoamérica (APA, 2013), lo que convierte al ave en una fuente de proteína importante en la población chilena.

2.8 CAMPILOBACTER SPP. AISLADOS DE PAVOS EN CHILE.

Los estudios de prevalencia de *Campylobacter* spp. a nivel mundial se han enfocado en cepas aisladas de pollo broiler, pocos estudios han contemplado el estudio en pavos, existen pocos antecedentes en la literatura, entre ellos. Fernández describe una prevalencia del 19,9% de *C. jejuni* y 17,1% de *C. coli*, con una prevalencia total de 37% (Fernández, 2011).

En cuanto a resistencia antimicrobiana en cepas aisladas de pavos Fernández señala que un 28% de las cepas de *C. jejuni* y un 53% de *C. coli* son resistentes a Levofloxacino, un

12% y 31% son resistentes a Ciprofloxacino y un 3% y 2% son resistentes a Ampicilina respectivamente (Fernández, 2011).

El Decreto Supremo 158 del 2004 de Chile, establece una vigilancia de *Campylobacter* spp., mas Fernández indica que está pendiente su implementación y no se establece la vigilancia a la resistencia de los antibióticos (Fernández, 2011). De igual manera la descripción de factores de virulencia en cepas aisladas de pavos es escasa a nivel mundial y nula a nivel Latinoamericano.

Con los antecedentes mencionados se postula que las cepas de *Campylobacter* spp. aisladas de deyecciones de pavos serían resistentes a los antibióticos que son empleados como tratamiento en humanos, además de poseer genes de virulencia asociados a adherencia y colonización, invasión, producción de toxinas y mimetismo a LPS.

3. HIPÓTESIS.

Las cepas de *Campylobacter* spp. aisladas de deyecciones de pavos son resistentes a los antibióticos de uso como tratamiento y poseen genes de virulencia.

4. OBJETIVO GENERAL.

Determinar el fenotipo de resistencia a los antimicrobianos y los genes asociados a los factores de virulencia en cepas de *Campylobacter* spp. aisladas de pavos de producción.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1.- Determinar el fenotipo de resistencia a antimicrobianos en cepas de *Campylobacter* spp. aisladas de pavos.
- 2.- Detectar los genes de virulencia asociados a adhesión, invasión y citotoxicidad encontrados en cepas de *Campylobacter* spp. aisladas de pavos.
- 3- Determinar las similitudes fenéticas de resistencia a antimicrobianos y genéticas entre genes de virulencia.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

Los análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio Centralizado de Investigaciones Veterinarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

6.1.1 Objetivo específico 1:

6.1.2 Aislamientos.

Los aislamientos de *Campylobacter* spp. fueron realizados por el Laboratorio de Enterobacterias del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, 105 aislamientos en total, provenientes de dos planteles de pavos. Estos aislamientos fueron conservados en glicerol al 25% en ultracongeladores a - 80° C.

6.1.3 Pruebas de Sensibilidad.

Las cepas fueron descongeladas, homogenizadas y sembradas en agar Trypticase soya + 5% de sangre ovina (TSS) con una tórula estéril e incubadas a 36 ± 1 C durante 48 horas en una atmósfera de microaerofilia entre 5% y 12% de CO₂ y 5% a 15% de O₂ residual creada por CampyPak®. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizó un traspaso a suero fisiológico estéril y se ajustó la concentración bacteriana a 2×10^8 UFC por mL.

Una vez ajustada la concentración se empleó el método Kirby-Bauer, cada suspensión fue sembrada en una placa Mueller Hinton + 5% de sangre ovina. Seguidamente se colocaron cuatro sensidiscos de Gentamicina, Eritromicina, Ciprofloxacina y Tetraciclina separados equidistantemente entre sí. Posteriormente se incubaron nuevamente por 48 horas a 36 ± 1 ° C con el mismo ambiente microaerofílico descrito anteriormente. Además se utilizó la cepa *C. jejuni* ATCC 33560 como control de calidad de los resultados de difusión de disco.

6.1.4 Análisis de resultados.

La lectura se llevó a cabo al medir el radio del halo de inhibición desde el centro del sensidisco. Ya con los resultados dados, fueron interpretados de acuerdo a tablas confeccionadas previamente por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008) y da como resultante cepas sensible y resistente.

Estas placas fueron refrigeradas a 4° C para la posterior extracción de su DNA que se necesitó en el análisis de genes de virulencia.

6.1.5 Análisis de perfiles.

Los aislamientos fueron catalogados como sensibles o resistentes y por el método de la media aritmética de grupo no ponderado (UPGMA) se creó un dendograma mediante el software Treecon® con un bootstrap de 1000. Se analizó la asociación entre especies y perfiles de resistencia por la prueba del Chi cuadrado de Pearson por medio del software Infostat®.

6.1.6 Objetivo específico 2:

6.1.7 Extracción del DNA.

A las 105 muestras ubicadas en las placas refrigeradas se les extrajo el DNA, en busca de los genes de virulencia señalados en el cuadro 1.

A partir de las colonias puras crecidas en placas se extrajo el DNA bacteriano para realizar un templado. Se colocaron 100 µL de agua libre de nucleasas en un tubo Eppendorf y una colonia de cada uno de los aislamientos de interés, que se expuso a 99° C por diez minutos en un termociclador. Luego se centrifugaron a 5000 g durante cinco minutos y se extrajo el sobrenadante para ser usado como templado y por último, se cuantificó el DNA por espectrofotometría.

6.1.8 Identificación de especies.

La identificación de *C. jejuni* o *C. coli* se llevó a cabo por medio de PCR, de los genes *hipO* (*C. jejuni*) y *glyA* (*C.coli*), según lo descrito por Wang y colaboradores (Wang *et al*, 2002).

6.1.9 Caracterización de los genes de virulencia presentes por PCR.

Se realizó un PCR para cada gen a ser identificado, los reactivos utilizados fueron: 200 μ M de deoxinucleotidos trifosfatos (dNTPs), 20 mM de $MgCl^2$, 2,5 μ L de buffer 10X, 1,25 U de Taq polimerasa, 2,5 μ L de DNA templado y 0,5 μ M de cada uno de los primers (ver Cuadro 1), se ajustó el volumen final a 25 μ L con agua calidad biología molecular.

La amplificación consistió en un ciclo único de denaturación a 95° C por 6 minutos, continua con 30 ciclos de denaturación a 95° C por 30 segundos, el alineamiento para cada gen es: *flaA* 53° C, *cadF* 45° C, *racR* 45° C, *ciaB* 42° C, *pldA* 45° C, *cdtA* 49° C, *cdtC* 47° C y *wlaN* 46° C por 30 segundos. Se realizó una extensión a 72° C por 30 segundos y termina con un ciclo de extensión a 72° C por 5 minutos (Talukder *et al*, 2008).

Los productos de cada PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2%, a 100 V por 40 minutos, se empleó buffer Tris, acetato, EDTA (TAE 1X) y marcador de peso molecular de 100 pb y como cepas control positivo se utilizaron cepas que tenga el gen según previa secuenciación y se realizó un control de reactivos. Para poder observar los resultados de la electroforesis, el gel fue teñido con red gel®, y colocado bajo una fuente de luz UV, visualizados y capturados mediante de un equipo fotográfico.

6.1.10 Análisis de resultados.

Se elaboró un dendograma por UPGMA de la relación genética por medio del software Treecon® con un Bootstrap de 1000. Se analizó la asociación entre especies y la presentación de genes de virulencia por la prueba del Chi cuadrado de Pearson mediante del software Infostat®.

7. RESULTADOS

De las 105 cepas de *Campylobacter* spp. aisladas 61 de ellas resultaron *C. jejuni* (58,1%), 23 *C. coli* (21,9%) y en 21 no se pudo determinar la especie (20%) (Tabla 1).

En cuanto a la resistencia antimicrobiana las cepas presentaron una mayor resistencia a Ciprofloxacino (72,4%), seguido por Tetraciclina (40%), mientras que ninguno de los aislamientos resultó resistente a Eritromicina, ni a Gentamicina. La resistencia a estos antibióticos presenta una asociación con uno de los planteles de pavos ($p < 0,0001$), el cual presentó mayores niveles de resistencia (Tabla 3).

C. coli fue la especie más resistente a Ciprofloxacino y en *C. jejuni* se obtuvo el porcentaje mayor de multiresistencia. Estos resultados presentan una asociación $p < 0,0001$ y las especies indeterminadas presentan valores intermedios de resistencia (Tabla 1), no se encontró asociación entre las especies y el plantel de procedencia.

La multiresistencia presenta solamente el perfil Ciprofloxacino y Tetraciclina debido a que no hubo resistencia a Eritromicina ni Gentamicina. La prevalencia de multiresistencia de *C. jejuni* resultó mayor, seguido por las especies indeterminadas y *C. coli* como la de menor prevalencia de multiresistencia (Tabla 2).

La resistencia a Tetraciclina se encontró en 41 de 42 cepas multiresistentes. Existe una asociación significativa de multiresistencia con *C. jejuni* $p < 0,0001$ (Tabla 2). Del total de casos hubo un único aislamiento de *C. jejuni* resistente exclusivamente a Tetraciclina.

Los análisis fenotípicos de resistencia antimicrobiana de las 105 cepas analizadas formaron solamente cuatro combinaciones diferentes, debido a que todos los aislamientos fueron sensibles a Gentamicina y Eritromicina (Figura 1).

Respecto a la prevalencia de los genes de virulencia, ella tiende a ser mayor en *C. jejuni* ($p < 0,0035$) con respecto a *C. coli* y a las cepas de especie indeterminada, a excepción de *cadF* que tiene una asociación similar en *C. jejuni* y *C. coli* $p < 0,005$ y *wlaN* que no posee asociación con las especie de *Campylobacter* (Tabla 4).

Los ocho genes (Figuras de 3 a 9) analizados en las 105 cepas formaron 50 combinaciones diferentes. La más frecuente fue la ausencia absoluta de genes de virulencia en 10 cepas (4 *C. coli* y 6 Indeterminadas), las demás combinaciones se encuentran entre una y seis veces, lo que expresa una alta variabilidad en los virulotipos de las cepas probadas (Figura 2).

8. DISCUSIÓN.

La evolución de la resistencia antimicrobiana en las cepas de *Campylobacter* spp tiene la misma tendencia de incremento en la resistencia que otras especies bacterianas. El-Adawy y colaboradores indican que en el caso de *Campylobacter* spp. aislado de pavos la resistencia de los aislamientos se ha incrementado de forma dramática en Alemania, ya que se encontró un 69,7% de resistencia a Ciprofloxacino y un 55, 3% a Tetraciclina (El-Adawy *et al*, 2012).

Fernández indica un antecedente en Chile de una resistencia a Ciprofloxacino en *C. jejuni* del 12% y en *C. coli* de un 16% en el año 2011, valores inferiores a los obtenidos en este estudio (Tabla 1).

Witte sostiene que la emergencia y diseminación de la resistencia a los antimicrobianos se genera por dos factores principales: a. La presión selectiva por el uso de un agente antimicrobiano y; b. Los genes de resistencia transferibles (Witte, 1999). El que *Campylobacter* adquiere resistencia por dos mecanismos: 1. Mediante mutación o; 2. Por transferencia de genes de resistencia que se movilizan de forma horizontal y cuyo proceso ha sido descrito de tres formas: transformación, conjugación y transducción (Luangtongkum *et al*, 2009).

El desarrollo principal de resistencia a Ciprofloxacino se debería a una única mutación simple en uno de tres puntos diferentes del gen de *gyrA*, específicamente en la región determinante de resistencia a las quinolonas (QRDR), que genera como resultado resistencia a los antibióticos de la familia de las fluoroquinolonas. Además la bomba de eflujo de multidrogas ayuda a reducir la concentración del fármaco que ingresa en las células de *Campylobacter* (Luangtongkum *et al*, 2009). McDermott y colaboradores en el 2002, encontraron que *C. jejuni* no era eliminado del tracto intestinal de pollos, pero si seleccionaba la producción de mutantes resistentes al ser tratados con fluoroquinolonas (McDermott *et al*, 2002). Luangtongkum y colaboradores señalan que todas las determinantes de resistencia a fluoquinolonas conocidas son codificadas cromosomalmente y mediadas por plásmidos (Luangtongkum *et al*, 2009).

Los porcentajes de resistencia encontrados a Ciprofloxacino (Tabla 1), son mayores a los descritos por Fernández en el año 2011. También se encontró una asociación significativa de mayor prevalencia de resistencia a Ciprofloxacino en *C. coli* ($p < 0,0001$) al compararlo con *C. jejuni* y con las cepas indeterminadas (Tabla 1). Estos datos concuerdan con lo

reportado por Lutgen y colaboradores, donde describe una mayor resistencia de *C. coli* a las flouoroquinolonas al compararlo con *C. jejuni* (Lutgen *et al*, 2009).

El tratamiento de las aves con Enrofloxacino durante alguna de sus etapas de cría, desarrollo o finalización por enfermedad o prevención, típicas de las producciones de pavos, favorecerían la presión de selección de cepas con resistencia a este agente, y se señalan como los factores a los que se asocia la alta prevalencia de resistencia a Ciprofloxacino obtenidos en este estudio, esto es concordante con lo señalado en diversos investigaciones *in vivo* en aves (Farnell *et al*, 2005; Luo *et al*, 2003; McDermott *et al*, 2002). La prevalencia de resistencia varía según el plantel (Tabla 3) debido a manejos propios en la utilización de antimicrobianos.

La resistencia a tetraciclinas se relaciona principalmente al cambio conformacional inducido por el gen de resistencia *tet (O)* una vez unida la molécula de Tetraciclina al ribosoma bacteriano (Payot *et al.*, 2006; Luangtongkum *et al*, 2009). Luangtongkum y colaboradores indican que esta resistencia conferida por *tet (O)* es altamente prevalente en *Campylobacter* a nivel mundial, tanto en sistemas de producción convencional como orgánicos (Luangtongkum *et al*, 2009), a su vez Cui y colaboradores reportan una alta prevalencia de *Campylobacter* resistentes a este fármaco en pollo orgánico (Cui *et al*, 2005).

Luangtongkum y colaboradores sostienen que en sistemas orgánicos de los Estados Unidos parece poco probable la selección exposición previa al antibiótico, en su lugar existe una posible co-evolución de *Campylobacter* que contiene plásmidos con el gen *tet (O)* (Luangtongkum *et al*, 2009), en *Campylobacter* este gen sería transmitido por conjugación. Paralelamente se ha reportado transferencia de genes de resistencia interespecies e intergénero, involucrando a *Campylobacter* y existe evidencia de la transferencia del plásmido conteniendo *tet(O)* entre cepas de *C. jejuni* en el tracto intestinal de pollos, ambas transferencias por conjugación (Luangtongkum *et al*, 2009; Pratt y Koroliv, 2005; Avrain *et al*, 2004). Así se explicaría la resistencia a Tetraciclina encontrada en este estudio, sin descartar la utilización del antimicrobiano en los sistemas productivos, lo que daría como resultado la alta prevalencia del plantel 2 (Tabla 3).

El único perfil de multiresistencia presente en este estudio es Ciprofloxacino / Tetraciclina, asociado a *C. jejuni* ($p < 0,0001$), pese a que también está presente en algunas cepas indeterminadas y en algunas de *C. coli* (Tabla 2). No se encontró resistencia a Eritromicina ni a Gentamicina en ninguna cepa analizada, probablemente debido a que

estos agentes no son empleados con frecuencia en los sistemas de producción de pavos chilenos a excepción de casos específicos de enfermedad respiratoria crónica o sinovitis, en los que se usa el macrólido Tilosina como tratamiento que podría dar como resultado una resistencia cruzada con la Eritromicina. Sin embargo esta situación no se presentó en las cepas aisladas en este estudio. Luangtongkum y colaboradores indican que la resistencia a macrólidos requiere de diferentes mutaciones que determinarán el grado de resistencia de la bacteria y la reducción de la presión de selección por exposición al antibiótico, reduce rápidamente la prevalencia de la resistencia de los macrólidos (Luangtongkum *et al*, 2009).

Al realizar un análisis fenético de resistencia antimicrobiana se observan cuatro clusters: el primero fue el perfil de multiresistencia con 41 cepas, donde predominó *C. jejuni* con 32 cepas, proveniente en su mayoría del plantel 2. El segundo cluster fue una única cepa de *C. jejuni* resistente a Tetraciclina proveniente del plantel 2. El tercer cluster fue formado por 35 cepas resistentes a Ciprofloxacino, donde imperó *C. coli* (18), 10 indeterminadas y 7 *C. jejuni*, dos terceras partes del plantel 2 y un tercio del plantel 1. En el cuarto cluster se obtuvo 28 cepas sensibles a todos los antibióticos donde destacó *C. jejuni* con 21 cepas, aunque una tercera parte del total de las cepas indeterminadas formaran parte de este cluster, en su mayoría provenientes del plantel 1 (Figura 1).

La presencia de genes de virulencia abren la posibilidad de que las cepas aisladas sean más patógenas que las que no poseen una gran cantidad de genes. La prevalencia de los genes de virulencia en *C. jejuni* (Tabla 3) de este estudio es variable al compararlo con los hallazgos de Rizal y colaboradores en India en el año 2010, aislados de intestinos de pollos y con los de Datta y colaboradores en Japón en el año 2003, aislados de heces de pollos. La prevalencia reportada por estos estudios fue *cadF* 88,53% y 100%, *racR* 18,33% y 90,5%, *flaA* 60% y 100%, *ciaB* 100% (Datta *et al*, 2003) *pldA* 26,66% y 100%, *cdtA* 13,33% y 100%, *cdtC* 25% y 100%, *wlaN* 7,7% obtenido por Datta y colaboradores, que demuestra una alta variabilidad en la presentación de los genes en esta especie de *Campylobacter* en tres realidades diferentes y al comparar la prevalencia con aislamientos realizados de pollos debido a la ausencia de información en pavos (Rizal *et al*, 2010; Datta *et al*, 2003).

La alta prevalencia de *cadF* en *C. jejuni* y *C. coli*, y las prevalencias de *racR*, *flaA*, *pldA*, *cdtA* y *cdtC* en cepas de *C. jejuni* en este estudio (Tabla 4), podrían estar relacionadas con el potencial patógeno de esos aislamientos debido a que estos genes han sido

relacionados con las capacidades de adherencia y colonización, invasión y producción de citotoxinas de las cepas, características indispensables para que se presente la enfermedad en humanos.

El análisis genético que empleó solamente las cepas de *C. jejuni* y *C. coli*, y se eliminaron las cepas indeterminadas que actuarían como variables confusoras dio como resultado siete clusters, donde se usó un punto de corte de 50% seleccionado por su cercanía al promedio de prevalencia de los genes en estas cepas. No se encontró asociación entre los genes y la procedencia de las cepas a excepción de *ciaB* ($p < 0,047$) y *pldA* ($p < 0,013$). Es evidente una alta variabilidad de presencia de genes, aunque los perfiles agrupan mayoritariamente cepas de la misma especie debido a las asociaciones existentes entre especie y presencia de genes de virulencia (Figura 2).

Con los resultados obtenidos se acepta la hipótesis de que las cepas de *Campylobacter* spp. aisladas de deyecciones de pavos son resistentes a los antibióticos de uso como tratamiento en pacientes humanos y además, se demuestra que estas cepas poseen genes de virulencia, lo que da a entender que existe un potencial patógeno en ellas, lo que demuestra la importancia de implementar sistemas de vigilancia con el fin de resguardar la salud pública.

9. BIBLIOGRAFÍA

- **ADVISORY COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD ACMSF.** 2010. Foodborne Outbreaks of *Campylobacter* Associated with Consumption of Chicken Liver pate/parfait. UK [en línea] <<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/committee/acm996pate.pdf>>, [Consultado 18 junio 2013].
- **ALLOS, B.** 2012. Infection with less common *Campylobacter* species and related bacteria. EEUU [en línea] <<http://www.uptodate.com/contents/infection-with-less-common-campylobacter-species-and-related-bacteria>>, [Consultado 2 julio 2013].
- **APA.** 2013. Sector avícola/Análisis sectorial. Santiago, Chile [en línea] <http://www.apa.cl/index/plantilla1.asp?id_seccion=2&id_subsecciones=8>, [Consultado 14 Octubre 2013].
- **AVRAIN, L.; VEROZY-ROZAND, C.; KEMPF, I.** 2004. Evidence for natural horizontal transfer of *tet(O)* gene between *Campylobacter jejuni* strains in chickens. J Appl Microbiol. 97(1):134-140.
- **BELANGER, A.; SHRYOCK, T.** 2007. Macrolide-resistant *Campylobacter* the meat of the matter. J Antimicrob Chemother. 60(4):715-723.
- **BRÁS, A.; CHATTERJEE, S.; KETLEY, J.** 1999. A novel *Campylobacter jejuni* Two Component regulatory System Important for Temperature-Dependent Growth and Colonization. Portugal [en línea] <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC93792/>>, [Consultado 2 Agosto 2013].
- **BUTZLER, J.** 2004. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. Clin Microbiol Infect. 10:868-876.
- **CERVANTES, E.; CRAVIOTO, A.** 2007. *Campylobacter* y enfermedades asociadas. Rev Fac Med UNAM. 50 (1): 31-35.
- **CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE.** 2008. Zone Diameter Interpretive Standards and Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Breakpoints for Veterinary Pathogens En Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals: Approves standard. CLSI document M31-A2. (3ra ed), Wayne, Estados Unidos. 65-72 p.

- **COLE, K.; DONOGHUE, A.; BLORE, P.; DONOGHUE, D.** 2004. Isolation and prevalence of *Campylobacter* in the reproductive tracts and semen of commercial turkeys. *Avian Dis.* 48:625-630.
- **CRUSHELL, E.; HARTY, S.; SHARIF, F.; BOURKE, B.** 2004. Enteric *Campylobacter*. Purging its Secrets?. *Pediatric Research.* 55(1):3-12.
- **CUI, S.; GE, B.; ZHENG, J.; MENG, J.** 2005. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* serovars in organic chickens from Maryland retail stores. *Appl Environ Microbiol.* 71(7):4108-4111.
- **DATTA, S.; NIWA, H.; ITOH, K.** 2003. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. *J Med Microbiology.* 52:345-348.
- **EL-ADAWY, H.; HOTZEL, H.; DÜPRE, S.; TOMASO, H.; NEUBAUER, H.; HAFEZ, H.** 2012. Determination of antimicrobial sensitivities of *Campylobacter jejuni* isolated from commercial turkey farms in Germany. *Avian Dis.*56(4):685-92.
- **EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY AND EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL.** 2011. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *EFSA J.* 9:2090.
- **EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY AND EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL.** 2007. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. *EFSA J.* 130.
- **FARNELL, M.; DONOGHUE, A.; COLE, K.; REYES-HERRERA, I.; BLORE, P.; DONOGHUE, D.** 2005. *Campylobacter* susceptibility to ciprofloxacin and corresponding fluoroquinolone concentrations within the gastrointestinal tracts of chickens. *J Appl Microbiol.* 99(5):1043-1050.
- **FERNÁNDEZ, H.** 2011. *Campylobacter*. Un patógeno transmitido por alimentos. Santiago, Chile [diapositivas] [diapositivas en línea] <<https://www.google.cl/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CC0QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.sag.gob.cl%2FOpenDocs%2Fasp%2FpagVerRegistro.asp%3FargInstanciaId%3D50%26argRegistroId%3D6972&ei=Bkv9UaaCGJDwigL-voDYDg&usq=AFQjCNG63TH6lQb79eh-5HPNpMv4ayd08g&sig2=b9c6tgsNeKBeMngRCybAgg&bvm=bv.50165853.d.cGE>>, [Consultado 2 Agosto 2013].
- **GARCÍA, P.; VALENZUELA, N.; RODRÍGUEZ, V.; LEÓN, E.; FERNÁNDEZ, H.** 2009. Susceptibilidad antimicrobiana de *Campylobacter jejuni* aislado de coprocultivos en Santiago de Chile. *Rev Chil Infect.* 26(6):511-514.

- **HERMANS, D.; VAN DEUN, K.; MARTEL, A.; VAN IMMERSEEL, F.; MESSENS, W.; HEYNDRIKX, M.; HAESBROUCK, F.; PASMANS, F.** 2011. Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. Ghent, Bélgica [en línea] <<http://www.veterinaryresearch.org/content/42/1/82>>, [Consultado 2 Agosto 2013].
- **HERMANS, D.; PASMANS, F.; MESSENS, W.; MARTEL, A.; VAN IMMERSEEL, F.; RASSCHAERT, G.; HEYNDRIKX, M.; VAN DEUN, K.; HAESBROUCK, F.** 2012. Poultry as a Host for the Zoonotic Pathogen *Campylobacter jejuni*. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 12(2): 89-98.
- **JAGANNATHAN, A.; PENN, C.** 2005. "Motility" in *Campylobacter*. Molecular and Cellular Biology. Norfolk Horizon Bioscience. 331-347.
- **JAIN, D.; PRASAD, K.; SINHA, S.; HUSAIN, N.** 2008. Differences in virulence attributes between cytolethal distending toxin positive and negative *Campylobacter jejuni* strains. J. Med Microbiol. 57: 267-272.
- **KONKEL, M.; KIM B.; RIVERA-AMILL V., GARVIS S.** 1999. Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* cultured mammalian cell. Mol Microbiol. 32: 691-701.
- **KRAUSE, S.; BARCENA, M.; PANSEGRAU, W.; LURZ, R.; CARAZO, J.; LANKA, E.** 2000. Sequence-related protein export NTPases encoded by the conjugative transfer region of RP4 and by the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* share similar hexameric structures. Proc Natl. Acad. Sci. USA 97:3067-3072.
- **LEVIN, R.** 2007. *Campylobacter jejuni*: A review of its Characteristics, Pathogenicity, Ecology, Distribution, Subspecies Characterization and Molecular Methods of Detection. Food Biotechnology. 21:271-347.
- **LUTGEN, E.; MCEVOY, J.; SHERWOOD J.; LOGUE C.** 2009. Antimicrobial resistance profiling and molecular subtyping of *Campylobacter spp.* from processed turkey. BMC Microbiology. 9:203.
- **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.
- **LUO, N.; SAHIN, O.; LIN, J.; MICHEL, L.; ZHANG, Q.** 2003. *In vivo* selection of *Campylobacter* isolates with high levels of fluoroquinolone resistance associated with *gyrA* mutations and the function of the CmeABC efflux pump. Antimicrob Agents Chemother. 47(1):390-394.
- **MAURTUA-NEUMANN, P.; OBERHELMAN, R.** 2013. *Campylobacter* infections en Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases. Magill A., Ryan E., Hill D., 9th ed, Sanders, Elsevier, China. 468-470 p.

- **MCDERMOTT, P.; BODEIS, S.; ENGLISH, L.; WHITE, D.; WALKER, R.; ZHAO, S.; SIMJEE, S.; WAGNER, D.** 2002. Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* evolves rapidly in chickens treated with fluoroquinolone. *J. Infect. Dis.* 185: 837-840.
- **MONTEVILLE, M.; YOON, J.; KONKEL M,** .2003. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. *Microbiol.* 149:153-165.
- **MOORE, J.; CORCORAN, D.; DOOLEY, J.; FANNING, S.; LUCEY, B.; MATSUDA, M.; MCDOWELL, D.; MÉGRAUD, F.; MILLAR, C.; O'MAHONY, R.; O'RIORDAN, L.; O'ROURKE, M.; RAO, J.; ROONEY, P.; SAILS, A.; WHYTE, P.** 2005. *Campylobacter*. *Vet. Res.* 36:352-382.
- **NATIONAL ANTIMICROBIAL RESISTANCE MONITORING SYSTEM, NARMS.** 2011. Retail meat annual report 2011. EEUU [en línea] <<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/UCM334834.pdf>>, [Consultado 2 agosto 2013].
- **OLAH, P.; LOGUE, C.; SHERWOOD, J.; ELIJAH, M.; DOCKTER, M.** 2003. The incidence of *Campylobacter spp.* on processed turkey from processing plants in the Midwestern United States. *J Appl Microbiol.* 95:234-241.
- **ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** 2012. Resistencia a los antimicrobianos (RAM). Ginebra, Suiza [en línea] <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>>, [Consultado 14 setiembre 2013].
- **PAYOT, S.; BOLLA, J.; CORCORAN, D.; FANNING, S.; MEGRAUD, F.; ZHANG, Q.** 2006. Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter spp.* *Microbes Infect.* 8:1967-1971.
- **PRATT, A.; KOROLIK, V.** 2005. Tetracycline resistance of Australian *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *J Antimicrob Chemother.* 55(4):452-460.
- **RIZAL, A.; KUMAR, A.; VIDYARTHI, A.** 2010. Prevalence of pathogenic genes in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry and human. *J Food Safe.* 12:29-34.
- **SUSSMANN, O.; MATTOS, L.; RESTREPO, A.** s.f. Resistencia bacteriana. Bogotá, Colombia [en línea] <<http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v43n1/0026%20Resistencia.PDF>>, [Consultado 5 julio 2013].
- **TALUKDER, K.; ASLAM, M.; ISLAM, Z.; AZMI, I.; DUTTAD, D.** 2008. Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter*

jejuni isolates from diarrheal patients in Bangladesh. J. Clin Microbiol. 46 (4): 1485-1488.

- **TAYLOR, D.; COURVALIN, P.** 1988. Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter* species. Antimicrob Agents Chemother: 1107-1112.
- **TEIXEIRA, P.; SILVA, J.; LEITE, D.; FERNANDES, M.; MENA, C.; GIBBS, P.** 2011. *Campylobacter spp.* as a foodborne pathogen: a review. Frontiers in Microbiology. 2:1-12.
- **WANG, G.; CLARK, C.; TAYLOR, T.; PUCKNELL, C.; BARTON, C.; PRICE L.** 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.
- **WITTE, W.** 1999. Uso de antibióticos en la producción animal y desarrollo de la resistencia en las infecciones humanas. Enf Infec y Microbiol. 19 (2): 83-86.
- **ZHAO, C.; GE, B.; DE VILLENA, J.; SUDLER, R.; YEH, E.; ZHAO, S.; WHITE, D.; WAGNER, D.; MENG, J.** 2001. Prevalence of *Campylobacter spp*, *Escherichia coli* and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the greater Washington D.C area. Appl Environ Microbiol. 67:5431-5436.
- **ZHANG, Q.** 2008. Campylobacteriosis En Diseases of Poultry Saif Y.; Fadly A.; Glisson J.; McDougald L.; Nolan L.; Swayne. (12va ed), Iowa, Estados Unidos. 675-689 p.
- **ZIPRIN, R.; YOUNG, C.; BYRD, J.; STANKER, L.; HUME, M.; GRAY, S.; KIM, B.; KONKEL, M.** 2001. Role of *Campylobacter jejuni* potential virulence genes in cecal colonization. Avian Diseases. 45:549-557.

10. MATERIAL COMPLEMENTARIO

Factor	Gen	Primers	Secuencia 5'-3'	T° Alineamiento	Peso (pb)
Adherencia y colonización	<i>cadF</i>	<i>cadF-F2B</i>	TTGAAGGTAATTTAGATATG	45	400
		<i>cadF-R1B</i>	CTAATACCTAAAGTTGAAAC		
	<i>racR</i>	<i>racR-25</i>	GATGATCCTGACTTTG	45	584
		<i>racR-593</i>	TCTCCTATTTTACCC		
	<i>flaA</i>	<i>FlaA 664</i>	AATAAAAATGCTCATAAAAACAGGTG	53	855
		<i>FlaA 1494</i>	TACCGAACCAATGTCTGCTCTGATT		
Invasión	<i>ciaB</i>	<i>ciaB-403</i>	TTTTATCAGTCCTTA	42	986
		<i>ciaB-1373</i>	TTTCGGTATCATTAGC		
	<i>pldA</i>	<i>pldA-84</i>	AAGCTTATGCGTTTTT	45	913
		<i>pldA-981</i>	TATAAGGCTTTCTCCA		
Producción de toxinas CDT	<i>cdtA</i>	<i>DS-18</i>	CCTTGTGATGCAAGCAATC	49	370
		<i>DS-18</i>	ACACTCCATTTGCTTTCTG		
	<i>cdtC</i>	<i>cdtC-192</i>	CGATGAGTTAAAACAAAAAGATA	47	182
		<i>cdtC-351</i>	TTGGCATTATAGAAAATACAGTT		
Mimetismo LPS	<i>wlaN</i>	<i>wlaN-DL 39</i>	TTAAGAGCAAGATATGAAGGTG	46	672
		<i>wlaN DL 41</i>	CCATTTGAATTGATATTTTTG		

Cuadro 1: Genes analizados, partidores, secuencia, temperatura de alineamiento y el peso pares de bases del amplificado modificado de Talukder *et al*, 2008.

Tabla 1: Número y porcentaje de aislamientos resistentes a los antibióticos probados por especie de *Campylobacter*.

	Indeterminadas (n=21) (20%)	<i>C. coli</i> (n=23) (21,9%)	<i>C. jejuni</i> (n=61) (58,1%)	Total (n=105)
Ciprofloxacino	14 (56%)	23 ¹ (100%)	39 (67,2%)	76 (72,4%)
Tetraciclina	4 (16%)	5 (21,7%)	33 (56,9%)	42 (40%)
Eritromicina	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Gentamicina	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Asociación entre especies y resistencia a antimicrobianos: ¹ p < 0,0001

Tabla 2: Número y porcentaje de aislamientos multiresistentes a los antibióticos probados según especie de *Campylobacter*.

	Indeterminadas (n=21)	<i>C. coli</i> (n=23)	<i>C. jejuni</i> (n=61)	Total (n=105)
Multiresistentes (Ciprofloxacino y Tetraciclina)	4	5	32 ¹	41
	19,0%	21,7%	52,5%	39%

Asociación entre especie y perfil de resistencia: ¹ p < 0,0001

Tabla 3: Número y porcentaje de resistencia según plantel.

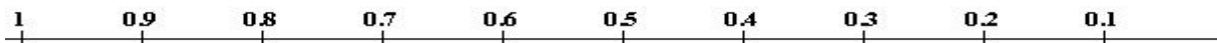
Procedencia /Resistencia	Ciprofloxacino n=76	Tetraciclina n=42	Multiresistentes n=41
Plantel 1 n=50	25 50%	2 4%	2 4%
Plantel 2 n=55	51 ¹ 93%	40 ¹ 73%	39 ¹ 71%

Asociación entre resistencia y procedencia: ¹ p < 0,0001.

Tabla 4: Número, porcentaje y prevalencia total de genes de virulencia según especie de *Campylobacter*.

	<i>cadF</i>	<i>racR</i>	<i>flaA</i>	<i>ciaB</i>	<i>pldA</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtC</i>	<i>WlaN</i>
<i>C. jejuni</i> (n=61)	45 ¹ 73,77%	40 ² 65,57%	41 ³ 67,21%	24 ⁴ 39,34%	34 ² 55,74%	48 ⁵ 78,69%	48 ² 78,69%	14 22,95%
<i>C. coli</i> (n=23)	17 ¹ 73,91%	4 17,39%	10 43,48%	2 8,70%	1 4,35%	12 52,17%	7 30,43%	3 13,04%
Indeterminadas (n=21)	6 28,57%	4 19,05%	5 23,81%	0 0,00%	3 14,29%	9 42,86%	9 42,86%	5 23,81%
Prevalencia total (n=105)	68 64,8%	48 45,7%	56 53,3%	26 24,8%	38 36,2%	69 65,7%	64 61%	22 21%

Asociación entre gen y especie: ¹ p < 0,0005; ² p < 0,0001; ³ p < 0,0015; ⁴ p < 0,0002; ⁵ p < 0,0035



C: Ciprofloxacino
 T: Tetraciclina
 S: sensibles

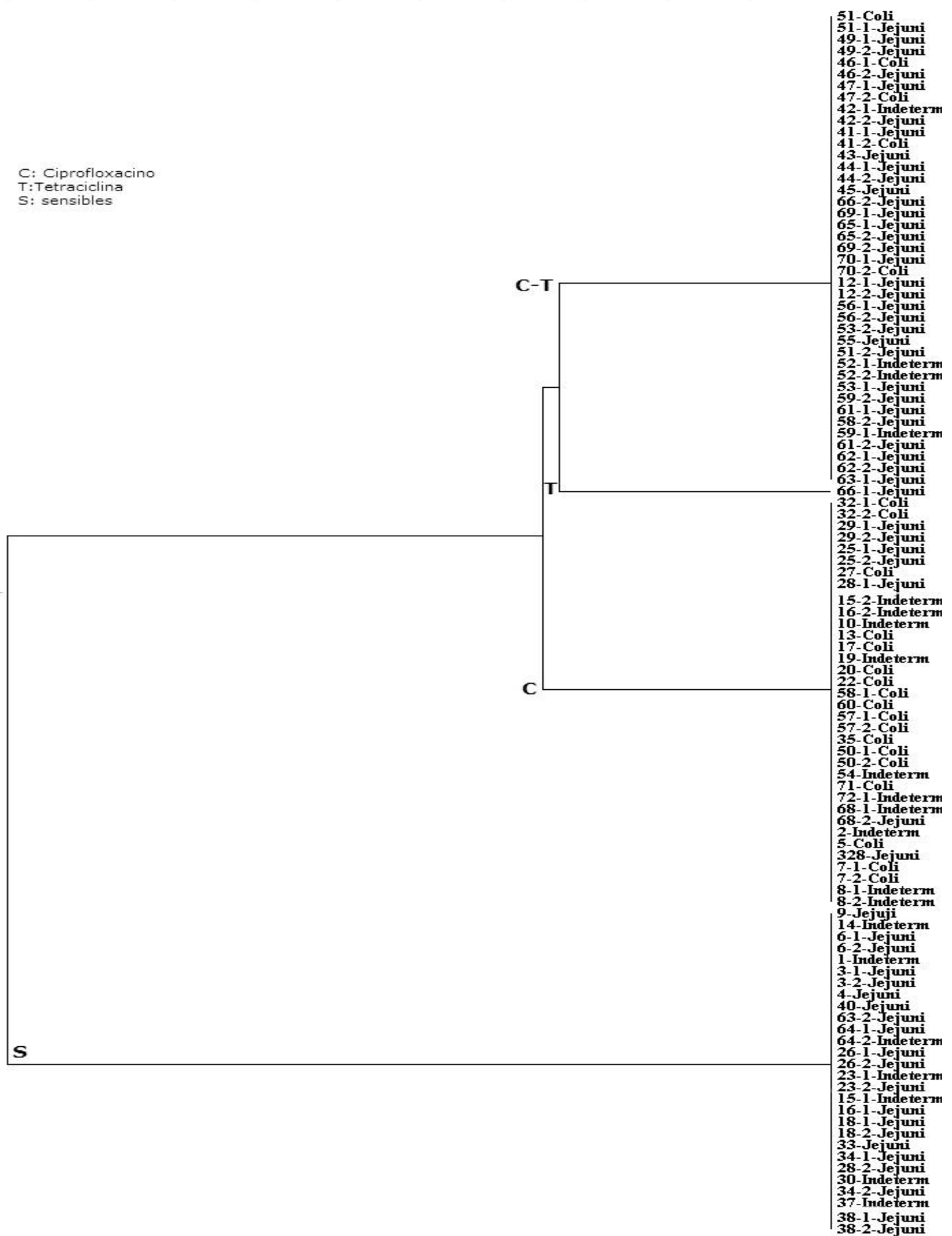


Figura 1: Dendrograma de perfiles de resistencia de cepas de *C. jejuni*, *C. coli* e indeterminadas (spp), aisladas de pavos

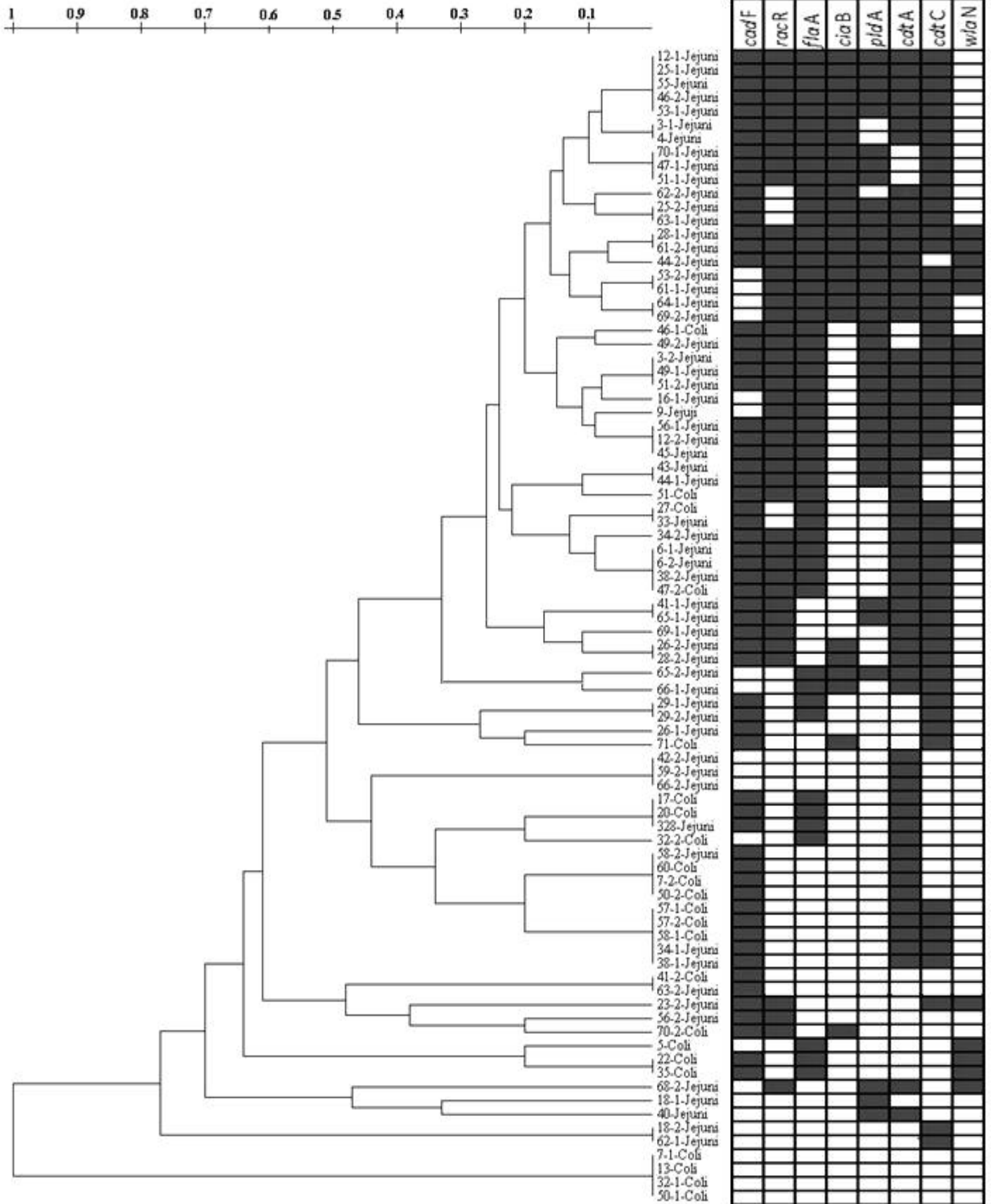


Figura 2: Dendrograma de genes de virulencias de cepas de *C. jejuni* y *C. coli* y virulotipos de aislamientos desde pavo.

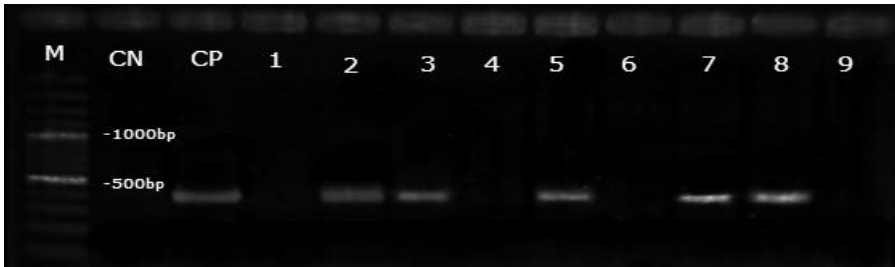


Figura 3: Electroforesis de productos de PCR, detección de *cadF* de 400bp. M: marcador 100bp, CN: control negativo, CP: control positivo, 1-9 muestras probadas.

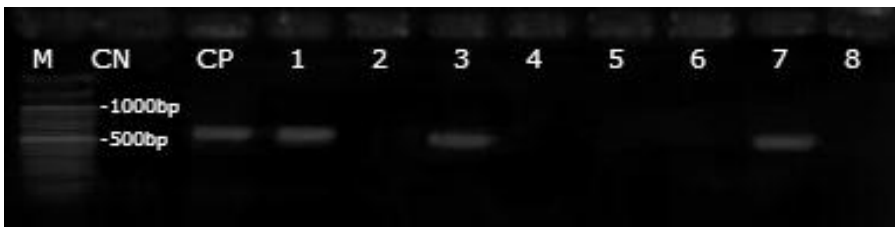


Figura 4: Electroforesis de productos de PCR, detección de *racR* de 584bp. M: marcador 100bp, CN: control negativo, CP: control positivo, 1-8 muestras probadas.



Figura 5: Electroforesis de productos de PCR, detección de *flaA* de 855bp. M: marcador 100bp, CN: control negativo, CP: control positivo, 1-9 muestras probadas.



Figura 6: Electroforesis de productos de PCR, detección de *ciaB* de 986bp. M: marcador 100bp, CN: control negativo, CP: control positivo, 1-9 muestras probadas.

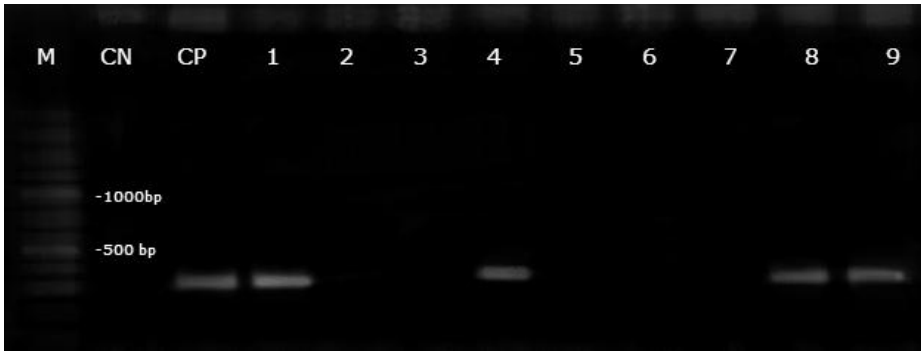


Figura 7: Electroforesis de productos de PCR, detección de *cdtA* de 370bp. M: marcador 100bp, CN: control negativo, CP: control positivo, 1-9 muestras probadas.



Figura 8: Electroforesis de productos de PCR, detección de *cdtC* de 182bp. M: marcador 100bp, CN: control negativo, CP: control positivo, 1-9 muestras probadas.



Figura 9: Electroforesis de productos de PCR, detección de *wlaN* de 672bp. M: marcador 100bp, CN: control negativo, CP: control positivo, 1-8 muestras probadas.