



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *Campylobacter* spp
DESDE HECES DE BOVINOS DE LECHERIA DE PREDIOS DE LA REGIÓN
METROPOLITANA

CONSTANZA ANDREA AGUILAR IBARRA

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

PROFESOR GUÍA: Dra. LISETTE LAPIERRE ACEVEDO

Proyecto FONIS SA15I20094

SANTIAGO, CHILE

AÑO 2019



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *Campylobacter* spp
DESDE HECES DE BOVINOS DE LECHERIA DE PREDIOS DE LA REGIÓN
METROPOLITANA

CONSTANZA ANDREA AGUILAR IBARRA

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

Nota Final:

Profesor Guía: Lisette Lapierre A.
Profesor Corrector: Patricio Retamal M.
Profesor Corrector: Consuelo Borie P.

SANTIAGO, CHILE
2019

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
GENERALIDADES.....	6
CAMPILOBACTERIOSIS	7
EPIDEMIOLOGÍA.....	8
AISLAMIENTO DE <i>CAMPYLOBACTER</i>	10
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	11
HIPÓTESIS	12
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
MATERIALES Y MÉTODOS	12
1. MUESTRAS	12
2. AISLAMIENTO DE <i>Campylobacter</i> spp. DESDE HECES	13
3. IDENTIFICACIÓN DE LAS COLONIAS SOSPECHOSAS	14
4. EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS MEDIANTE LA TÉCNICA KIRBY BAUER.....	15
Método de difusión en placa Kirby-Bauer:	15
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	16
RESULTADOS	16
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIÓN	23
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
PLANIFICACIÓN	27
ANEXOS	28

RESUMEN

Campylobacter es una bacteria entérica zoonótica, Gram negativa con forma en espiral, cuyo principal reservorio son las aves, pero puede estar presente en el intestino de múltiples animales domésticos y silvestres.

Campylobacter causa una enfermedad llamada campilobacteriosis la cual es considerada una enfermedad transmitida por los alimentos o ETA, principal causa de diarrea en países desarrollados y segundo o tercero en países en vías de desarrollo. Los alimentos más importantes implicados en brotes de campilobacteriosis en el mundo son la carne de pollo y la leche. En Chile, *Campylobacter* es un organismo de vigilancia obligatorio pero su derivación a los servicios de salud es baja.

A pesar de que la campilobacteriosis es una enfermedad autolimitada, en algunos pacientes es necesario el uso de antibióticos. Principalmente se usan macrólidos o fluoroquinolonas y como alternativas gentamicina y tetraciclina, pero el uso inadecuado de antibióticos en Medicina Veterinaria y en medicina humana puede generar la aparición y propagación de bacterias resistentes, las cuales pueden hacer que los tratamientos no sean eficaces.

El objetivo de este estudio fue detectar cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, desde muestras de heces provenientes de bovinos de lecherías de la Región Metropolitana y además caracterizar los perfiles de susceptibilidad a los antimicrobianos de las cepas aisladas.

Este estudio analizó un total de 594 muestras de heces de bovinos en estado productivo, tomadas en 4 lecherías de la zona rural de la Región Metropolitana, cercanas a cursos de agua superficiales en donde anteriormente se aisló cepas de *Salmonella* spp. que fueron correlacionadas con brotes en humanos. Además, se realizaron pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos a las cepas aisladas, se analizaron los siguientes antibióticos: eritromicina, azitromicina, ciprofloxacino, gentamicina y tetraciclina.

Se obtuvieron un total de 20 cepas de *Campylobacter*, las que fueron aisladas mediante cultivo tradicional, posteriormente todas las cepas aisladas fueron sometidas a PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para determinar su especie siendo el 50% *Campylobacter coli*, 45 % *Campylobacter jejuni* y 5 % que correspondió a 1 cepa que no se pudo especiar. Respecto a la sensibilidad a los antibióticos se obtuvieron altos niveles de resistencia a eritromicina alcanzando un 60%, para azitromicina un 55% y un 35% para ciprofloxacino.

Palabras claves: *Campylobacter*, bovinos de lechería, heces, resistencia a antibióticos.

ABSTRACT

Campylobacter is an enteric zoonotic bacterium, Gram negative with spiral form, whose main reservoir is birds, but can be present in the intestines of multiple domestic and wild animals.

Campylobacter causes a disease called campilobacteriosis which is considered a foodborne illness, which is the main cause of diarrhea in developed countries and second or third in developing countries. The most important foods implicated in outbreaks of campilobacteriosis in the world are chicken meat and milk. In Chile *Campylobacter* is an organism of mandatory surveillance but its derivation to health services is low.

Although campilobacteriosis is a self-limiting disease, in some patients is necessary to use antibiotics. Macrolides or fluoroquinolones are mainly used and, as alternative, gentamicin and tetracycline, but the inappropriate use of antibiotics in veterinary medicine and in human medicine can generate the appearance and spread of resistant bacteria, which can make that the treatments are not effective.

The objective of this study is to detect *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains, from feces samples from dairy cattle of the Metropolitan Region as well as to characterize the profiles of susceptibility to antimicrobials of the isolated strains.

This study analyzed a total of 594 samples of cattle feces in the productive state, taken in 4 dairy farms of the rural area of the Metropolitan Region. These dairies are close to surface water courses where *Salmonella* spp. strains were previously found to be correlated with outbreaks in humans. In addition, antimicrobial susceptibility tests were performed on isolated strains, it was pointed out the following antibiotics: erythromycin, azithromycin, ciprofloxacin, gentamicin and tetracycline.

A total of 20 *Campylobacter* strains were isolated, by traditional culture, then, all them subjected PCR for species identification, being 50% *Campylobacter coli*, 45% *Campylobacter jejuni* and 5% (one strain) that was classified as *Campylobacter* spp. With respect to sensitivity to antibiotics high levels of resistance to erythromycin were obtained, reaching 60%, for azithromycin 55% and 35% for ciprofloxacin.

Key words: *Campylobacter*, dairy cattle, feces, resistance to antibiotics

INTRODUCCIÓN

El género *Campylobacter* corresponde a un grupo de bacterias entéricas, zoonóticas, presentes en los intestinos de animales domésticos y silvestres. Este género comprende bacterias Gram negativas con características particulares, como lo son su pequeño tamaño, su forma de espiral curvada y que se desarrollan en un ambiente de microaerofilia, son de crecimiento lento en comparación con otras bacterias entéricas y crecen a temperaturas entre 30 a 42° C.

Campylobacter spp son bacterias de distribución mundial, que se transmiten al ser humano frecuentemente por consumo de alimentos y aguas contaminadas. El reservorio principal son las aves, pero se pueden encontrar en muchos otros animales como bovinos, cerdos, ovejas entre otros. Son consideradas la principal causa de diarrea en personas en los países desarrollados y la segunda o tercera en los países en vías de desarrollo. Las especies que producen más frecuentemente la enfermedad en el ser humano, llamada campilobacteriosis, son las especies *C. jejuni* subespecie *jejuni* y *C. coli*.

En Chile *Campylobacter* es una bacteria de vigilancia obligatoria en humanos por laboratorios establecidos de acuerdo con el Decreto Supremo N°158 y su identificación y caracterización es importante para el adecuado estudio epidemiológico de los brotes y para evaluar las medidas de prevención. En Medicina Veterinaria no se realiza vigilancia de este patógeno y existen pocos estudios en nuestro país al respecto.

La campilobacteriosis es una enfermedad entérica caracterizada por diarrea que va desde mucosa hasta sanguinolenta, autolimitada, pero existen factores de riesgo que justifican el uso de antibióticos en algunos casos. *Campylobacter* actualmente presenta resistencia a varios antibióticos, entre ellos algunos utilizados como tratamiento en humanos, siendo una situación de especial preocupación por sus repercusiones presentes y futuras sobre la salud pública.

Los animales de granja son reservorios de *Campylobacter* patógenos y pueden contaminar con sus heces los alimentos, las aguas y suelos y el medioambiente en general, transmitiéndose al hombre. El objetivo de esta memoria fue conocer si existe portación de estas bacterias en bovinos de lechería, de predios de la Región Metropolitana y si estas cepas presentan resistencia a antibióticos usados en la clínica humana.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

GENERALIDADES

Los microorganismos del género *Campylobacter* son bacilos Gram-negativos con forma de coma o espiral curvada (Orihuel *et al.*, 2015) de tamaño pequeño (0.3-0.6 μm de diámetro, 0.5-5 μm de ancho), no esporulados, que presentan un flagelo no envainado único en uno o en dos de sus extremos y se mueven característicamente en forma rápida y a modo de sacacorchos (Tresierra, 2013).

Casi todas las especies de este género son sensibles al oxígeno y sólo pueden desarrollarse en condiciones de reducción de oxígeno, habitualmente en atmósfera microaerófila (5-10% de oxígeno). Todas las especies son capaces de desarrollarse a una temperatura de 37 C°, pero *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* son termotolerantes y, por lo tanto, tienen una temperatura óptima de crecimiento de 42° C. (Tresierra, 2013). Su velocidad de crecimiento es más lenta que la de la microbiota normal entérica, por lo que para su aislamiento desde material fecal se requieren medios selectivos que inhiban esta microbiota (Arturo y Silva, 2007).

Las primeras especies de este género fueron identificadas hace más de 90 años en animales, pero no fue sino hasta 1970 cuando se reconoció como patógeno humano, inicialmente incluido dentro del género *Vibrio*, sin embargo, debido a diferencias fundamentales con relación a la constitución de ADN y debido a su incapacidad de fermentar los hidratos de carbono, fueron agrupados en un nuevo género bacteriano denominado *Campylobacter* (Arturo y Silva, 2007). Actualmente, el género *Campylobacter* comprende 26 especies y seis subespecies (OMS, 2016 a).

Las propiedades específicas implicadas en la adhesión, colonización, invasión, y la producción de una citotoxina son necesarias en el proceso de infección y para producir la enfermedad (Talukder *et al.*, 2008). El mecanismo más relevante de patogenicidad de *Campylobacter* es la invasión de la mucosa intestinal, esta se observa a nivel tanto, de intestino delgado como de colon y genera una enterocolitis inespecífica (Talukder *et al.*, 2008).

La infección por *Campylobacter*, llamada campilobacteriosis, constituye una zoonosis de distribución mundial. Algunas especies del género son capaces de causar esta enfermedad que es definida como una enfermedad transmitida por alimentos (ETA) en los seres

humanos (Tresierra, 2013). Los animales y sus productos alimenticios han sido identificados como la principal fuente de infección humana en brotes de campilobacteriosis siendo las aves su principal reservorio (Tresierra, 2013). El agua o el hielo contaminados son también una fuente de infección. Algunos casos ocurren tras el contacto con agua contaminada durante actividades recreativas. En general se dice que la carne de pollo mal cocinada es una fuente importante de transmisión del patógeno, pero también se señala el consumo de leche no pasteurizada como un mecanismo importante de transmisión al hombre (OMS, 2016 a).

CAMPILOBACTERIOSIS

Campilobacteriosis es el nombre que reciben un grupo de infecciones causadas por bacterias del género *Campylobacter* (Tresierra, 2013). Es considerada una causa importante de gastroenteritis bacteriana humana y puede ser responsable de hasta 400 a 500 millones de casos cada año en todo el mundo (Talukder *et al.*, 2008).

La campilobacteriosis en el ser humano cursa con enterocolitis aguda que se manifiesta con malestar, fiebre, dolores abdominales severos que pueden durar 7 días o más con una diarrea acuosa que puede derivar en sanguinolenta. El periodo de incubación de esta enfermedad oscila entre 1 y 11 días (AESAN, 2012).

Las infecciones invasivas ocurren en <1% de los pacientes con enteritis por *Campylobacter* spp. La mortalidad debida a las infecciones por *Campylobacter* spp., es de 0,05 personas por cada 1.000 afectados (AESAN, 2012). En raras ocasiones pueden aparecer complicaciones como síndrome de Guillain–Barré, artritis reactiva y aborto (AESAN, 2012).

Los mecanismos de virulencia que más se han relacionado con la patogenia de esta enfermedad son la motilidad por la presencia de flagelos y la capacidad de adherencia e invasión en las células epiteliales intestinales (Quetz *et al.*, 2012).

Las especies de *Campylobacter* spp. termofílicas (cuyo desarrollo óptimo tiene lugar a temperaturas entre 41 y 42° C) entre las que se encuentran *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* y *C. helveticus*, son consideradas como el origen más frecuente de gastroenteritis en el hombre (Orihuel *et al.*, 2015) siendo más del 80% de los casos causados por *C. jejuni* y en torno al 10% por *C. coli* (OIE, 2008).

Como ya se dijo, la campilobacteriosis es una enfermedad autolimitada que no requiere tratamiento con antimicrobianos. En casos graves de campilobacteriosis o en personas de riesgo como inmunodeprimidos o pacientes de edades extremas, se utilizan antibióticos como los macrólidos, especialmente eritromicina y también se utilizan fluoroquinolonas como el ciprofloxacino, siendo estos fármacos considerados de primera línea a la hora de aplicar el tratamiento clínico en pacientes humanos (Rivera *et al.*, 2011). Otros antibióticos de que se ocupan como tercera o cuarta opción son la tetraciclina y la gentamicina (Luangtongkum *et al.*, 2009). Últimamente la azitromicina está siendo estudiada y usada como una terapia válida para el tratamiento de Campilobacteriosis debido a la aparición de cepas resistentes a los antibióticos de elección, especialmente a eritromicina (Linde *et al.*, 2016; Bauerfeind *et al.*, 2017)

EPIDEMIOLOGÍA

Como se señaló el principal reservorio de *Campylobacter* spp. son las aves, pero además se encuentra presente en el ganado bovino, ovino, porcino, roedores, perros y gatos, así como otros mamíferos y aves silvestres (AESAN, 2012).

Campylobacter también es uno de los agentes etiológicos de la denominada “enfermedad del viajero” junto con *E. coli* enterotoxigénica, *Salmonella* y *Shigella*; esta enfermedad afecta generalmente a ciudadanos de países industrializados que viajan a zonas tropicales o subtropicales del planeta. En América Latina se ha estimado que *C. jejuni* provoca entre el 1 al 5 % de los casos de diarrea del viajero, en África y Asia este porcentaje es mayor pudiendo llegar al 39% (Orihuel *et al.*, 2015).

Según datos de la Unión Europea la incidencia de campilobacteriosis ha mostrado una tendencia al alza, con una cifra de 43,9 casos cada 100.000 habitantes en el año 2008 y 48,6 casos cada 100.000 habitantes en el año 2010 llegando a registrarse un total de 220.209 casos en el año 2011 (Orihuel *et al.*, 2015).

En España se registraron un total de 6.340 de casos de campilobacteriosis el año 2010 y a pesar de que *Campylobacter* en la mayoría de los casos no causa una enfermedad grave, la extensión de los problemas sanitarios que ocasiona afecta a nivel mundial a un total de 400 y 500 millones de personas (Orihuel *et al.*, 2015).

En Estados Unidos *Campylobacter* es descrita como una de las principales causas de enfermedades diarreicas según el “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC), donde se indica que se diagnostican 14 casos por cada 100.000 habitantes al año, pero *Campylobacter* podría afectar a más de 1,3 millones de personas al año debido a que no todos los casos son diagnosticados (Orihuel *et al.*, 2015).

El Centers for Disease Control and Prevention (CDC) reporta algunos brotes de campilobacteriosis entre los que se encuentran uno el año 2012 en el estado de Nevada en el cual afectó a 22 personas que participaron en una carrera de obstáculos de larga distancia en una hacienda ganadera, estas personas habrían consumido agua superficial inadvertidamente durante la carrera. También reporta el año 2014 en el estado de Utah que afectó alrededor de 99 personas por el consumo de leche cruda, ese mismo año en el estado de Oregón un brote afectó a un grupo de personas que consumieron pate de hígado de pollo en dos diferentes restorán de la ciudad.

Estas bacterias han sido aisladas como agentes enteropatógenos en prácticamente todos los países del continente sudamericano, en los cuales *Campylobacter* aparece como causa importante de cuadros diarreicos, predominantemente en niños entre dos a cinco años, disminuyendo su frecuencia a medida que los niños aumentan en edad (Fernández, 2011).

En los países desarrollados provoca más casos de diarrea que *Salmonella* transmitida por los alimentos (Orihuel *et al.*, 2015). Una diferencia es el hallazgo frecuente de portadores sanos en países sudamericanos, en contraposición, en países industrializados, donde el estado de portador sano es raro y de muy baja presentación (Fernández, 2011).

En América Latina a pesar de que *C. jejuni* sigue siendo la especie más aislada el porcentaje de aislamiento de *C. coli* ha ido en aumento alcanzando un 25% (Orihuel *et al.*, 2015). Un estudio realizado en Chile en niños (0-14 años) con síndrome diarreico agudo, dio como resultado una prevalencia de 2,1 % en donde el 100% de estas pertenecieron a la especie *C. jejuni* (Rivera *et al.*, 2011).

En Chile, la notificación y derivación de *Campylobacter* spp. hacia los laboratorios de referencia, es baja, debido principalmente a que la mayoría de los laboratorios no estudian este agente por la falta de implementación de técnicas de diagnóstico. Esto a pesar de que desde el año 1983, *Campylobacter* spp. es agente de vigilancia de laboratorio según lo establece el reglamento sobre notificación de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria N.º 158 (ISP,2014). El resultado de la vigilancia de *Campylobacter* en Chile,

mostró que en el periodo entre enero 2005 y agosto 2013 se confirmaron un total de 462 cepas de *Campylobacter* desde aislados clínicos, identificadas a nivel de especie mediante pruebas bioquímicas y espectrometría de masas, y también hubo 267 muestras que resultaron sugerentes de *Campylobacter* spp mediante verificación de frotis de deposiciones mediante tinción violeta-bicarbonato. Además, se observó en las cepas confirmadas un predominio en el grupo etario de uno a nueve años con un 30,7% de las cepas confirmadas, teniendo una mayor frecuencia en el grupo de uno a cuatro años de edad. Las cepas confirmadas de *Campylobacter* fueron principalmente *C. jejuni* (79,2%) seguido por *C. coli* (15,2%) y *C. fetus* (4,3%) (ISP, 2014).

AISLAMIENTO DE CAMPYLOBACTER

Campylobacter es sensible a las condiciones ambientales, incluyendo deshidratación, oxígeno atmosférico, luz solar y temperatura elevada por lo que, para el aislamiento de este patógeno específicamente desde heces, han de tomarse muestras recientes e impedir que se sequen; las muestras deben ser procesadas tan pronto como lleguen al laboratorio no tardando más de tres días después de ser recolectadas (OIE, 2008).

Por lo anterior se aconseja tomar muestras frescas y ocupar medios de transporte (como Cary Blair, Amies o Stuart), procesar las muestras tan rápido sea posible y evitar temperaturas superiores a 20°C y menores a 0° C mientras la muestra sea transportada, para su almacenamiento se aconsejan temperaturas de 4° C (OIE, 2008).

No se necesita pretratamiento para el aislamiento de *Campylobacter* desde heces, y para su aislamiento se recomienda utilizar un medio selectivo como agar modificado con carbón vegetal, cefoperazona y deoxicolate (mCCDA). Se puede incubar a 37 o 42° C por 48 horas con una atmósfera microaerobia de 5–10% de oxígeno, 5–10% de dióxido de carbono para un crecimiento óptimo, también se necesita suplementar el agar mCCDA con antibióticos selectivos para impedir el crecimiento de otras bacterias contaminantes (OIE,2008).

El enriquecimiento de las muestras no se lleva a cabo rutinariamente, todos los agares selectivos permiten el crecimiento tanto de *C. jejuni* como de *C. coli* pero no existe ningún medio disponible que permita el crecimiento de *C. jejuni* e inhiba el de *C. coli* o viceversa (OIE, 2008).

Entre los agares selectivos existen medios que contienen sangre y medios que contienen carbón, estos componentes sirven para eliminar los derivados tóxicos del oxígeno. Generalmente *C. jejuni* y *C. coli* manifiestan un crecimiento sobre medios sólidos en 24–48 horas a 42° C pero se recomiendan 48 horas de incubación para un diagnóstico rutinario (OIE, 2008).

En agares con sangre, las colonias típicas de *Campylobacter* son de color rosa pálido, redondas, convexas, lisas y brillantes, con un borde regular. En los medios basados en carbón vegetal, como mCCDA, las colonias típicas son grisáceas, planas y húmedas, con tendencia a extenderse, y muchas tienen un brillo metálico (OIE, 2008).

Para identificar entre especies de *Campylobacter* existen pruebas bioquímicas como son la hidrólisis de hipurato o la hidrólisis de acetato de indoxil, pero estas pruebas se pueden complementar o incluso sustituirse con métodos moleculares como la identificación de especie mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (OIE, 2008).

RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

La resistencia a los antimicrobianos constituye una amenaza creciente para la salud pública mundial que requiere la adopción de medidas por parte de todos los sectores gubernamentales y de la sociedad en general (OMS, 2016 b).

El incremento de números de cepas de *Campylobacter* resistentes a varios antibióticos, es una cuestión de especial preocupación por sus repercusiones sobre la salud pública (Orihuel *et al.*, 2015). Es por esto que, el estudio de la susceptibilidad de *Campylobacter* a diferentes antimicrobianos ha sido motivo de interés de investigadores de varios países (Fernández, 2011). Los estudios realizados han puesto en evidencia la aparición de cepas de origen humano y animal, resistentes a los antibióticos de elección para el tratamiento como: eritromicina, tetraciclina y a quinolonas, encontrándose que la resistencia a estas últimas ha sido explosiva, alcanzando tasas superiores al 60% (Fernández, 2011).

Se ha reportado un rápido incremento de cepas de *Campylobacter* spp., resistentes a los antimicrobianos. Antes de 1992, la resistencia a las fluoroquinolonas era poco observada en Estados Unidos y Canadá, pero un estudio reporta que entre el 13-15% de las cepas aisladas desde humanos son resistentes a ciprofloxacino (Siddhartha *et al.*, 2010).

Un estudio muestra que en Chile la resistencia a eritromicina de *Campylobacter* puede ir entre 5,6 a 58,6%, la resistencia a quinolonas va entre 5,3 al 50 %, la resistencia a ampicilina va entre 4,6 y 25% y la resistencia a tetraciclinas va entre 1,8 a 15% (Fernández, 2011).

HIPÓTESIS

Existe portación fecal de *Campylobacter* spp. resistente a antibióticos en bovinos de lecherías de la Región Metropolitana.

OBJETIVO GENERAL

- Detectar y caracterizar cepas de *Campylobacter* spp. de muestras de heces provenientes de bovinos de lecherías de la Región Metropolitana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar cepas de *Campylobacter jejuni / coli*, desde muestras de heces de bovinos de lecherías ubicadas en la Región Metropolitana.
- Caracterizar los perfiles de susceptibilidad a los antimicrobianos de cepas de *Campylobacter* aisladas desde bovinos de lecherías de la Región Metropolitana.
- Asociar la resistencia a antibióticos de *Campylobacter* según especie aislada y con el lugar de muestreo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta memoria de título se realizó en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, y está enmarcada en el proyecto FONIS SA15I20094.

1. MUESTRAS

Las muestras fueron tomadas en 4 puntos de la Región Metropolitana, los puntos fueron definidos en base al proyecto FONIS SA12/2259 (año 2015-2016), en el cual se aislaron cepas de *Salmonella* spp. que pudieron ser ligadas a brotes en humanos mediante la técnica de electroforesis en campo pulsado PFGE. Los puntos son mostrados en la **Figura**

N°1. Estos puntos de muestreos son de características rurales y se encuentran cercanos a cursos de agua superficiales estudiadas en el proyecto FONIS anteriormente mencionado.

Se tomaron alrededor de 50 muestras por cada punto, desde heces frescas de bovinos de lecherías que estén en estado productivo. Las muestras fueron tomadas con tómulas con medio de transporte Cary Blair y posteriormente fueron transportadas en refrigeración al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinaria y Pecuarias de la Universidad de Chile, dentro del mismo día. Inmediatamente al llegar al laboratorio, las muestras fueron procesadas para realizar el aislamiento de *Campylobacter* spp.. Para ello, las muestras fueron suspendidas en tubos con 4 mL de suero fisiológico (Cloruro de Sodio al 0,9%), y generalizadas. Luego desde este tubo, se tomaron con micropipeta 1 mL el que fue depositado en el medio selectivo utilizado para el aislamiento de *Campylobacter*.

2. AISLAMIENTO DE *Campylobacter* spp. DESDE HECES

Las muestras fueron sembradas en agar mCCDA (Desoxicolato-Cefoperazona-Carbón modificado), agregándole un suplemento de antibióticos (CCDA selective supplement), desde el tubo con la muestra disuelta en suero fisiológico se siembra con un asa estéril en la placa dentro de un gabinete de bioseguridad. Se sembraron dos muestras por placas las cuales fueron identificadas con el mismo código que los tubos correspondientes. Posteriormente, las placas fueron puestas en una jarra de anaerobiosis en la cual se crea un ambiente de microaerofilia a través del uso de sobres generadores de microaerofilia (GENbox).

La jarra se incubó en estufa de cultivo a 37° C por 48 horas, pasado este tiempo las placas fueron revisadas para observar la presencia de colonias grises, húmedas, redondeadas o difusas las cuales son sospechosas de pertenecer al género *Campylobacter* spp.

Las placas que contenían colonias sospechosas fueron resembradas, se tomaron de dos a cinco colonias sospechosas por muestra, y se sembraron en placas de agar Trypticase Soya con 5% de sangre, e incubadas a 42° C por 48 horas en un ambiente de microaerofilia como se señaló anteriormente.

3. IDENTIFICACIÓN DE LAS COLONIAS SOSPECHOSAS

Luego de ser incubadas por 48 horas, las placas de agar sangre fueron revisadas nuevamente para observar crecimiento de colonias sospechosas. Cuando se encontró crecimiento de colonias con las características compatibles con las del género *Campylobacter*, (colonias de color rosa pálido, redondo, convexo, liso y brillante, con un borde regular), se realizó a las colonias sospechosas una tinción Gram y se observó al microscopio morfología concordante con *Campylobacter* sp (bacilo corto espirilado y Gram negativo con forma de “alas de gaviota”). Las muestras que se observaron con esta morfología se les realizó la técnica de la polimerasa en cadena (PCR) para su identificación de género y confirmación de especie.

PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GÉNERO Y ESPECIE

La extracción de ADN desde la cepa se realizó mediante calor. Para esto se pusieron tres a cinco colonias en 100 µL de H₂O estéril libre de nucleasas y este tubo fue sometido a temperatura de 99C° por 10 minutos en el termociclador marca MultiGene®.

Una vez extraído el ADN de las muestras se procedió a realizar el PCR con los reactivos señalados en la Tabla 1 (Anexo). Las muestras fueron procesadas en las condiciones descritas en la Tabla 2 (Anexo). Se realizaron 2 PCRs, el primer PCR es para identificar el género *Campylobacter* y utiliza los partidores para amplificar el 16S del RNA. Partidor 1 F- GGATGACACTTTTCGGAGC- y el Partidor 2 R- CATTGTAGCACGTGTGTC- (Inglis y Kalischuk, 2003).

Posteriormente las muestras positivas al género *Campylobacter* fueron procesadas para realizar la electroforesis, esta se hizo en agarosa al 1% y se le aplicó 100mlv por 40 minutos en tampón TAE 1X. Se utilizó marcador de peso molecular de 100 bp. La agarosa fue sumergida en 150 ml de TAE con 15 µl de bromuro de etidio por 20 minutos. Luego de este tiempo se realizó la visualización del gel mediante luz UV. El tamaño esperado para dar como positivo al género *Campylobacter* es de 816 pb. Se utilizó como control la cepa ATCC *C. jejuni* 33560 (Inglis y Kalischuk, 2003).

Las muestras positivas al PCR de género, se les realizó un segundo PCR para confirmar la especie. En este caso se utilizaron los partidores 1 Hip O1- AGCTAGCTTCGCATAATAACTTG- y el partidor 2 Hip O2 -GAAGAGGGTTTGGGTGGT-

para la especie *C. jejuni*. Las condiciones son las descritas en la Tabla 3 (Anexo). La electroforesis se realizó como se indicó anteriormente y lo esperado si pertenece a la especie *C. jejuni* es una visualización de una banda de un tamaño de 735 pb. Se utilizó como control positivo la cepa ATCC *C. jejuni* 33560 y un control negativo sin adición de ADN (Linton *et al.*, 1997). Para la especie *C. coli* se utilizaron los partidores 1 CC1 -GGTATGATTTCTACAAAGCGAG- y partidador 2 CC2 -ATAAAAAGACTATCGTTCGCGT- bajo las condiciones descrita en la Tabla 4 (Anexo). La banda positiva para este gen en la electroforesis es de un tamaño de 500 pb (Linton *et al.*, 1997). La electroforesis se realizó en las mismas condiciones descritas anteriormente. En todos los casos se utilizó como control positivo la cepa ATCC 43478 *C. coli* y un control negativo sin adición de ADN.

Si algunas de las muestras fueron positivas al PCR de género y negativas a los dos PCR de especies, se clasificaron como *Campylobacter* spp.

4. EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS MEDIANTE LA TÉCNICA KIRBY BAUER

Una vez que fue realizada la identificación de especie se realizó una caracterización fenotípica de la susceptibilidad a antibióticos a los siguientes antibióticos: eritromicina, tetraciclina, gentamicina, ciprofloxacino y azitromicina debido a que como se mencionó anteriormente se ocupan en la terapia antibiótica de campilobacteriosis en humanos.

Método de difusión en placa Kirby-Bauer:

a) Preparación de las placas: Para esto se utilizó agar Müller-Hinton, que se preparó según instrucciones señaladas por el fabricante. Las placas deben tener un espesor mínimo de 4mm, para esto una vez preparado el agar se dispensan 20 ml del agar por cada placa Petri evitando la formación de burbujas y se dejaron reposar.

Se tomaron colonias desde las placas de agar sangre y se suspendieron en tubos de suero fisiológico, hasta obtener una densidad óptica de 0,25 evaluada en un espectrofotómetro, esto corresponde a una suspensión bacteriana con un total de $1,5 \times 10^8$ UFC por ml (0,5 de Mc Farland). La curva de unidades formadoras de colonias (UFC) versus densidad óptica fue realizada previamente en el laboratorio.

b) Aplicación de los sensidiscos: cada suspensión bacteriana ya ajustada a la concentración antes señalada se sembró en las placas Müller-Hilnton de manera uniforme por medio de

una tórula estéril. Posteriormente se colocaron en las placas ya sembradas los sensidiscos de cada antibiótico en estudio en forma equidistante, después de esto las placas fueron cultivadas a 37° C por 48 horas en condiciones de microaerofilia, utilizando una jarra de anaerobiosis con sobres generadores de microaerofilia (GENbox).

A las 48 horas de incubación se midieron los halos de inhibición del crecimiento de los distintos antibióticos con un pie de metro. Los resultados son expresados en milímetros y se interpretaron para poder clasificar las cepas como Sensible (S) o Resistente (R) según los rangos descritos en la Tabla 5 que señala los rangos para cada antibiótico (Luangtongkum *et al.*, 2007; EUCAS, 2012). Como control del proceso se utilizó la cepa *E. coli* 25922.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se realizó una prueba de asociación estadística X^2 para ver si existía una relación entre la especie de *Campylobacter* y la resistencia a los diferentes antibióticos en estudios

La hipótesis nula propuesta es que no existe relación entre la especie de *Campylobacter* y su resistencia a los antibióticos, los grados de libertad fueron 4 y un margen de error del 0,05.

También se hizo la prueba de asociación estadística X^2 para conocer si existía una relación entre los diferentes puntos de muestreo y la resistencia a los diferentes antibióticos en estudios

La hipótesis nula propuesta es que no existe relación entre los diferentes puntos de muestreo y su resistencia a los antibióticos, los grados de libertad fueron 8 y un margen de error del 0,05.

RESULTADOS

Las muestras fueron tomadas en cuatro lecherías de sectores rurales de la Región Metropolitana, desde donde se analizaron un total de 594 muestras. Se confirmaron 20 cepas de *Campylobacter*, obteniendo así una prevalencia de del 3,37%.

La cantidad de muestras tomadas en los distintos puntos de muestreo y la prevalencia encontrada en cada uno de ellos se encuentran descritos en la **tabla N° 6**, los sectores de

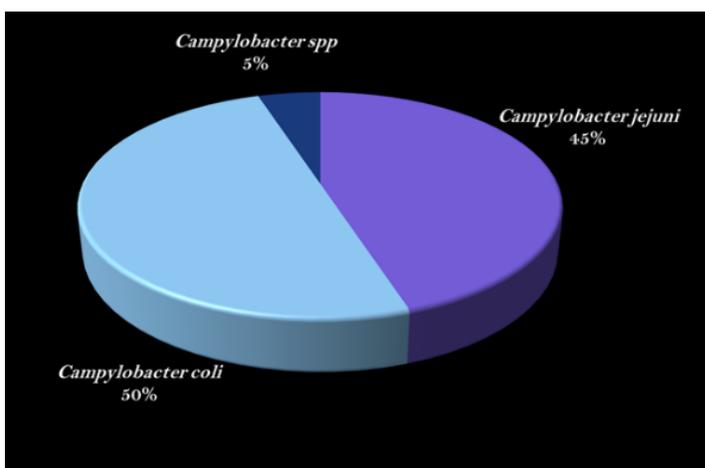
muestreo fueron, Lonquén, María Pinto, Melipilla y Peñaflo, en esta tabla también se muestra que el punto que tuvo mayor prevalencia de aislamiento fue el del sector de Melipilla

TABLA N°6: NUMERO DE MUESTRAS TOMADAS Y PREVALENCIA DE AISLACION ENCONTRADA

	N° de Muestras Tomadas	N° de Muestras Confirmadas	Prevalencia
Lonquen (Lugar I)	306	9	2,94 %
Peñaflo (Lugar II)	210	8	3,81 %
María Pinto (Lugar III)	28	0	0
Melipilla (Lugar IV)	50	3	6 %
Total	594	20	3,37

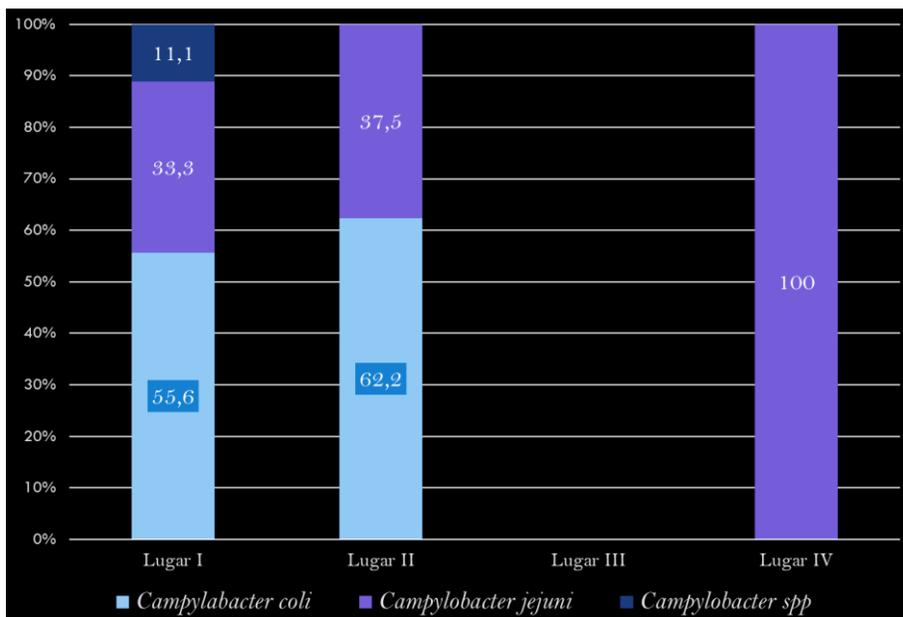
En la **figura N°2** se observa un gráfico circular que determina el porcentaje de cepas de *Campylobacter* de cada especie. Los resultados muestran que, del total de cepas aisladas, el 50% correspondieron a *Campylobacter coli*, el 45% a *Campylobacter jejuni* y un 5% fue clasificada como *Campylobacter spp.*

FIGURA N°2: PORCENTAJE DE LAS DIFERENTES ESPECIES ENCONTRADAS



En la **figura N°3** se observa que solo en el punto de muestreo del sector de Lonquén se aisló *Campylobacter* spp y que en el sector de Mellipilla solo se aislaron cepas de la especie *Campylobacter jejuni*.

FIGURA N°3: PORCENTAJE DE ESPECIES DE *CAMPYLOBACTER* EN LOS DIFERENTES PUNTOS DE MUESTREOS.



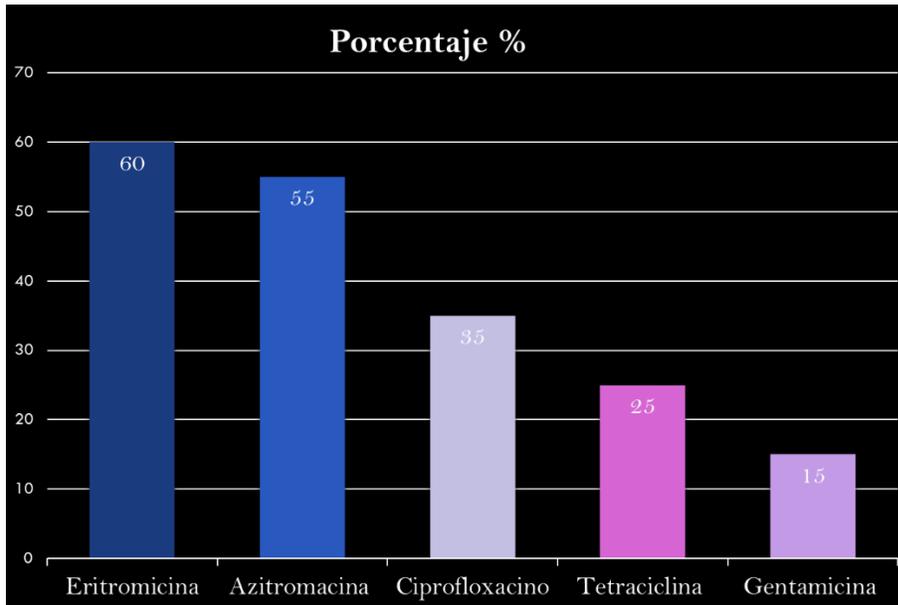
Del total de las cepas aisladas el 30% fue clasificada como sensible a todos los antibióticos en estudio y el 70% fue resistente al menos a un antibiótico en estudio (**tabla N°7**). Además, en esta misma tabla, se observan los porcentajes de resistencia a al menos un antibiótico de las especies de *Campylobacter* estudiadas.

TABLA N°7: PORCENTAJE DE RESISTENCIA A AL MENOS UN ANTIBIÓTICO DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE *CAMPYLOBACTER*

		N°	%
<i>C. coli</i>	R	7	70
	S	3	30
<i>C. Jejuni</i>	R	6	66,7
	S	3	33,3
<i>C. Spp</i>	R	1	100
	S	0	0

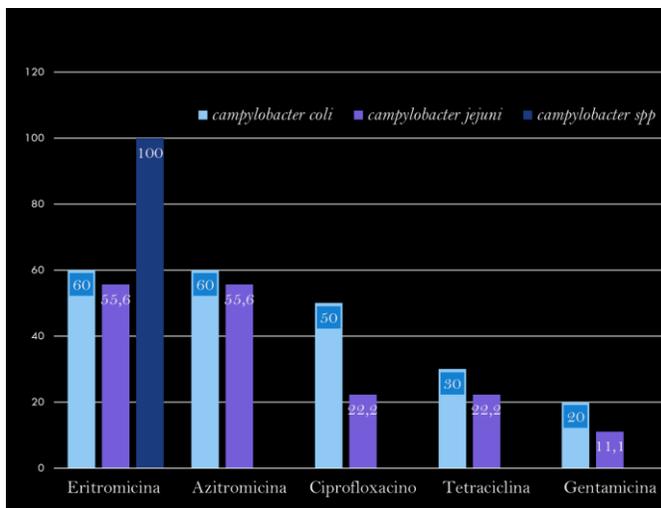
La **figura N°4** representa los porcentajes de resistencia encontrado a los diferentes antibióticos en estudio. Los mayores porcentajes de resistencia fueron a los antibióticos eritromicina, azitromicina y ciprofloxacino con un 60, 55 y 35 % respectivamente.

FIGURA N°4: PORCENTAJE DE CEPAS DE *CAMPYLOBACTER* RESISTENTE A LOS ANTIBIÓTICOS EN ESTUDIO



La **figura N°5** muestra los porcentajes de resistencia a los diferentes antibióticos en estudio, pero diferenciado por especie de *Campylobacter* encontradas. En este grafico se puede apreciar que *Campylobacter coli* muestra un porcentaje superior de resistencia al antibiótico ciprofloxacino.

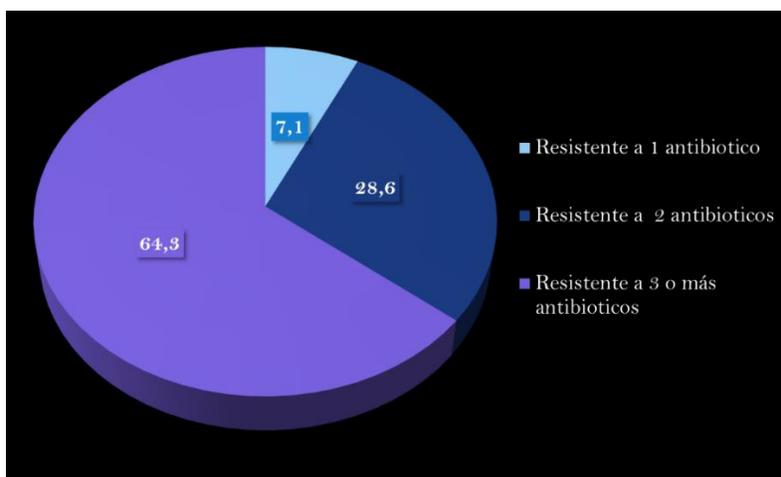
FIGURA N°5: PORCENTAJE DE RECISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS EN ESTUDIO SEGÚN ESPECIE DE *CAMPYLOBACTER*.



La **figura N°6** es un gráfico que muestra un alto porcentaje de multi-resistencia ya que, del total de cepas resistentes, un 64,3 % fue resistente a 3 o más antibióticos.

Finalmente, los resultados de los análisis estadísticos realizados mostraron que no existe relación entre la especie de *Campylobacter* y su resistencia a los antibióticos, ni relación entre los diferentes puntos de muestreo y la resistencia a los antibióticos.

FIGURA N°6: PORCENTAJE DE LAS CEPAS RESISTENTES Y MULTIRECISTENTES



DISCUSIÓN

Campylobacter spp. se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, el reservorio natural es una gran variedad de animales domésticos y de vida silvestre, pero su principal reservorio son las aves de corral.

La campilobacteriosis es una enfermedad transmitida por los alimentos (ETA) que en Chile y el mundo es considerada una importante causa de gastroenteritis en el humano, y el principal alimento que la transmite al ser humano, es la carne de pollo. Sin embargo, otro alimento importante en la transmisión de este patógeno es el consumo de leche de bovino cruda (OMS, 2016 a). Además, los bovinos juegan un papel en la diseminación de esta bacteria en el ambiente y su mantención en el ciclo epidemiológico.

Campylobacter no es una bacteria que en nuestro país se estudie en todos los laboratorios de microbiología de los sistemas de salud públicos y privados, por falta de implementación de técnicas de diagnóstico. Puede ser por esto que la derivación a laboratorio de

Campylobacter en Chile es baja, esto a pesar de que es un agente de vigilancia obligatoria en humanos por laboratorios establecidos de acuerdo con el Decreto Supremo N°158.

En Medicina Veterinaria no se realiza vigilancia de este patógeno y no hay muchos estudios de prevalencia y resistencia a los antibióticos en muchos animales que no sean aves de corral, por lo que se necesitan mayores estudios y una vigilancia más activa que nos reflejen del verdadero problema que representa en Chile esta bacteria.

Los cuatro puntos geográficos en donde se tomaron las muestras eran lecherías en el sector rural de la Región Metropolitana y que están cercanos a cursos de agua superficiales. Estas aguas, por lo tanto, pueden contaminarse debido a las heces de los bovinos o ya venir contaminadas e infectar a los bovinos de estos predios y así seguir este ciclo epidemiológico.

Campylobacter es una bacteria que es difícil de aislar, ya que necesita condiciones especiales para su aislamiento, como un medio de cultivo que contenga nutrientes especiales además de una atmosfera adecuada para su desarrollo y su mayor tiempo de crecimiento.

En este estudio la prevalencia de *Campylobacter* en bovinos de lechería fue de un 3,37% siendo esto menor a lo que se esperaba, debido a que en la literatura se describe que en Chile la prevalencia de este patógeno en bovinos fluctúa entre un 14,2% y un 22,5% (Fernández, 2011; Lapierre, 2016) aunque uno corresponde a bovinos destinados a la producción de carne y el otro no especifica el tipo de bovino muestreado.

Las bajas prevalencias obtenidas en este estudio se pueden deber a que las muestras fueron tomadas desde el ambiente y no directamente del animal, además, las muestras fueron algunas tomadas con torulas y otras con bolsas estériles donde la cantidad de muestra era mayor, y con estas últimas fue con la que se obtuvieron mejores resultados.

Los animales muestreados en este estudio fueron bovinos que ya estaban en producción lechera, es decir, animales adultos de varios años de edad, y se debe tener en cuenta que, al igual en humanos, *Campylobacter* tiene una mayor prevalencia en las primeras etapas de vida de los animales.

Por otro lado, se utilizó para el aislamiento de *Campylobacter* el protocolo sugerido por la OIE en su manual de animales terrestres. Existen otros protocolos usados para muestras desde humanos como por ejemplo en las que se utilizan filtros de 0.45 µm antes de sembrar las placas de mCCDA que han demostrado que puede mejorar el aislamiento de

Campylobacter ya que puede disminuir el crecimiento de organismos contaminantes y que dificultan un buen aislamiento de cepas como *Campylobacter*. Sería interesante comparar estos dos protocolos para conocer si alguno de ellos presenta mejores porcentajes de aislamiento de esta bacteria.

A pesar de que la campilobacteriosis es una enfermedad autolimitada, se pueden presentar algunas complicaciones en donde sea necesario el uso de antibióticos, o también estos pueden ser necesarios de usar en pacientes de riesgo como niños o ancianos. La resistencia a los antibióticos puede provocar fallos en la terapia, encareciendo esta o llevando incluso a la muerte del paciente, por la falla en el tratamiento y la falta de opciones, por lo que esta bacteria se puede convertir en un problema de salud pública.

Los datos de resistencia a los antibióticos de *Campylobacter* son mayormente realizados en aves de corral como pavos y pollos, pero en este estudio se encontró en bovinos una alta resistencia y multi-resistencia a los antibióticos en estudio, y debido a que los antibióticos estudiados son los de primera elección para el tratamiento de campilobacteriosis en humanos, esta situación es preocupante. Por otro lado, estas bacterias se encontraron en las heces de los animales lo que implica la contaminación medioambiental con bacterias resistentes que pueden diseminarse a diferentes ambientes.

Los antibióticos estudiados no son de uso común en la producción de bovinos de lechería, esto puede ser debido a su mayor costo o ritmo de uso poco práctico en la producción animal, también puede ser por su periodo de resguardo más extenso como la tetraciclina cuyo periodo de resguardo parte en 14 días. Además, algunos de los antibióticos estudiados como eritromicina y gentamicina no tienen registro del SAG (Servicio Agrícola y Ganadero) para su uso de manera sistémica en bovinos cuya leche sea destinada al consumo humano, aunque si está registrado su uso de manera tópica. Antibióticos como azitromicina y ciprofloxacino no se usan en bovinos, pero si se usan antibióticos de la misma familia (macrólidos y fluoroquinolonas).

A pesar de lo anteriormente mencionado los niveles de resistencia a los antibióticos en estudio fueron altos, por lo que podemos sospechar que exista una resistencia cruzada con otros antibióticos o resistencia obtenida desde el medio ambiente.

Las cepas de *Campylobacter* aisladas en este estudio fueron veinte y solo una fue clasificada como spp, por lo que la resistencia a los antibióticos que muestra esta cepa no es estadísticamente representativa.

CONCLUSIÓN

- Se obtuvo una prevalencia de aislamiento de *Campylobacter* del 3,37%.
- El sector de Melipilla fue el que tuvo la mayor prevalencia con un 6%.
- El sector de María Pinto no se aisló ninguna cepa de *Campylobacter* spp.
- Se obtuvieron altos porcentajes de resistencia a eritromicina, azitromicina y ciprofloxacino con un 60, 55 y 35% respectivamente.
- El 64,3% de las cepas resistentes fue resistente a 3 o más antibióticos
- No existe relación entre la especie de *Campylobacter* y su resistencia a los antibióticos ni relación entre los diferentes puntos de muestreo y la resistencia a los antibióticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AESAN. 2012. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición con relación a las medidas de control para reducir la presencia de *Campylobacter spp.* en carnes de aves (pollos). Revista del comité científico 16: 21-55. [En línea].

<http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/CAMPYLOBACTER.pdf>. [Consulta: 11-10-2018].

ARTURO, V.; SILVA, F. 2007. Estudio para la implementación del análisis de *Campylobacter spp* según la metodología USDA/FSIS MLG capítulo 6 1998 en el laboratorio labser en Chile. Título de Microbiología industrial. Rancagua, Chile. Pontificia Universidad Javeriana. Fac. De Ciencias. 62 p. <http://www.ovinos-caprinos.com/SANIDAD/105%20-%20Implementacion%20del%20Anlisis%20de%20Capilobacter%20SPP.pdf>

BAUERFEIND, R.; VON GRAEVENITZ, A.; KIMMIG, P.; GERS SCHIEFER, H.; SCHWARZ, T.; SLENCZKA, W.; ZAHNER, H. 2017. Zoonoses Infectious Diseases transmissible from Animals to Humans. (4^oa. ed). ASM Press. 532p

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2017. Reports of Selected *Campylobacter* Outbreak Investigations [En línea]. <<https://www.cdc.gov/campylobacter/outbreaks/outbreaks.html>>. [Consulta: 11-10-2018].

EUCAS. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2017. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Versión 7.1. 95 p.

FERNÁNDEZ, H. 2011. *Campylobacter* y campylobacteriosis: una mirada desde América del sur. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 28(1): 121-127.

INGLIS, D.; KALISCHUK, L. 2003. Use of PCR for Direct Detection of *Campylobacter* Species in Bovine Feces. Appl Environ Microbiol 69(6): 3435–3447

ISP. INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA. 2014. Vigilancia de laboratorio de *Campylobacter* spp. Chile, 2005 – 2013. Boletín Instituto Salud Publica. 4(1):1-17.

LAPIERRE, L.; GATICA, M.; RIQUELME, V.; VERGARA, V.; YAÑEZ, J.; SAN MARTÍN, B.; SÁENZ, L.; VIDAL, M.; MARTÍNEZ, M.; ARAYA, P.; FLORES, R.; DUERY, O.; VIDAL, R. 2016. Characterization of Antimicrobial Susceptibility and Its Association with Virulence Genes Related to Adherence, Invasion, and Cytotoxicity in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolates from Animals, Meat, and Humans. MICROBIAL DRUG RESISTANCE. 22(05) 432-444.

LINDE, H.; FRAHM, K.; BODILSEN, J.; EJLERTSEN, T.; NIELSEN, H. 2016. Azithromycin vs. Placebo for the Clinical Outcome in *Campylobacter concisus* Diarrhoea in Adults: A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Clinical Trial. PLoS One. 11(11).

LINTON, A.; LAWSON, R.; STANLEY, O.; STANLEY, J. 1997. PCR Detection, Identification to Species Level, and Fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Direct from Diarrheic Samples. J Clin Microbiol 35(10): 2568–72

LUANGTONGKUM, T.; MORISHITA, T.; EL-TAYEB, A.; ISON, A.; ZHANG, Q. 2007. Comparison of Antimicrobial Susceptibility Testing of *Campylobacter* spp. by the Agar Dilution and the Agar Disk Diffusion Methods. J Clin Microbiol. 45(2):590-594.

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.

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. 1185-1193 pp.

OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 2016 a. *Campylobacter*, Nota descriptiva N°255. [En línea]. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/es/>>. [Consulta: 11-04-2016].

OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 2016 b. Resistencia a los antimicrobianos, Nota descriptiva N°194. [En línea]. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>>. [Consulta: 11-04-2016].

ORIHUEL, H.; SANZ, M.; BERTÓ, R.; CANET, J.; LORENZO, F.; CORUJO, A.; MILVAQUES, A. 2015. *Campylobacter*: un patógeno emergente. In: *Campylobacter* la bacteria discreta. Betelgeux. Valencia, España. pp. 5-44.

QUETZ J.; LIMA I.; HAVT A.; PRATA M.; CAVALCANTE P.; MEDEIROS P.; CID D.; MORAES M.; REY L.; SOARES A.; MOTA R.; WEIGL B.; GUERRANT R.; LIMA A. 2012. *Campylobacter jejuni* infection and virulence associated genes in children with moderate to severe diarrhoea admitted to emergency rooms in northeastern Brazil. *J. Med Microbiol.* 61, 507–513.

RIVERA, N.; BUSTOS, R.; MONTENEGRO, S.; SANDOVAL, M.; CASTILLO, J.; FERNÁNDEZ, H.; MATURANA, M.; DELGADO, L.; CONTRERAS, A.; CHÁVEZ, D.; QUEVENDO, 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.

SIDDHARTHA, T.; ZHAO, S.; McDERMOTT, P.; HARBOTTE, H.; ABBOTT, J.; ENGLISH, L.; GEBREYES, W.; WHITE, D. 2010. Antimicrobial Resistance, Virulence, and Genotypic Profile Comparison of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolated from Humans and Retail Meats. *Foodborne Pathog Dis.* 7(7): 835-844.

TALUKDER, K.; ASLAM, M.; ISLAM, Z.; AZMI, I.; DUTTA, D.; HOSSAIN, S.; NUR-E-KAMAL, A.; NAIR, G.; CRAVIOTO, A.; SACK, D.; ENDTZ, H. 2008. Prevalence of Virulence Genes and Cytotoxic Distending Toxin Production in *Campylobacter jejuni* Isolates from Diarrheal Patients in Bangladesh. *J Clin Microbiol.* 46(4):1485-1488.

TRESIERRA, A. 2013. *Campylobacter*: una bacteria zoonótica bastante desconocida. In: XIV congreso nacional de estudiantes de biología. Iquitos, Perú. 15-21 septiembre 2013. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Fac. De Cs Biológicas.

PLANIFICACIÓN

CARTA GANNT

Meses	Mes 1				Mes 2				Mes 3				Mes 4				Mes 5				Mes 6			
Semanas	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Toma de muestras	■	■	■						■	■	■	■					■	■	■	■				
Procesamiento de muestras	■	■	■						■	■	■	■					■	■	■	■				
Análisis de resultados					■	■	■						■	■	■						■	■	■	
Escrito del proyecto					■	■	■																	
Preparación de avance											■	■	■											
Avance de memoria															■	■								
Entrega de memoria de título																							■	■

ANEXOS

TABLA 1: Reactivos y volúmenes utilizados en las reacciones de PCR

Preparación reactivos PCR	
Reactivo	Volumen
Master Mix (2X)	12,5 MI
Primer 1 (10M)	2 MI
Primer 2 (10M)	2 µL
H ₂ O	6,5 µL
ADN	2 MI
Total	25 MI

(Inglis y kalischuk, 2003)

TABLA 2: Temperaturas y tiempo utilizados en las reacciones de PCR para confirmación género *Campylobacter*.

CONDICIONES TERMOCICLADOR PCR IDENTIFICACION DE GENERO			
Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
1	94	5 minutos	1
2	94	30 segundos	30
3	55	1 minuto	30
4	72	1 minuto	30
5	72	10 minutos	1
6	4	∞	

(Inglis y kalischuk, 2003)

TABLA 3: Temperaturas y tiempo utilizados en las reacciones de PCR para detección de especie *C. jejuni*.

CONDICIONES TERMOCICLADOR PCR IDENTIFICACION DE CAMPYLOBACTER JEJUNI			
Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
1	94	5 minutos	1
2	94	30 segundos	30
3	66	1 minuto	30
4	72	1 minuto	30
5	72	10 minutos	1
6	4	∞	

(Linton *et al*, 1997)

TABLA 4: Temperaturas y tiempo utilizados en las reacciones de PCR para detección de especie *C. coli*.

CONDICIONES TERMOCICLADOR PCR IDENTIFICACION DE ESPECIE CAMPYLOBACTER COLI			
Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
1	94	5 minutos	1
2	94	30 segundos	30
3	60	1 minuto	30
4	72	1 minuto	30
5	72	10 minutos	1
6	4	∞	

(Linton *et al*, 1997)

TABLA 5: Rangos de evaluación de sensibilidad a antibióticos.		
Antibiótico	Resistente	Sensible
Macrólidos		
Eritromicina	<20	>20
Azitromicina	<20	>20
Fluoroquinolonas		
Ciprofloxacino	<26	>26
Tetraciclinas		
Tetraciclina	<30	>30
Aminoglucósidos		
Gentamicina	<12	>15

(Luangtongkum, 2007; EUCAS, 2012)

FONIS SA 12/2259

http://www.ispch.cl/sites/default/files/resumen_marzo_2013.pdf

FIGURA 1: MAPA DE LOS PUNTOS DE MUESTREOS

