

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Determinación de la resistencia antimicrobiana en cepas de**

***Campylobacter* aisladas de pollos de engorde**

**Disertación previa a la obtención del título de Microbiólogo**

**JONATHAN ALEJANDRO PARK JARRÍN**

**Quito, 2020**

## CERTIFICACIÓN DE LA FINALIZACIÓN DE LA DISERTACIÓN

Certifico que la Disertación previa a la obtención del título de Microbiólogo del Sr. Jonathan Alejandro Park Jarrín, ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Mgtr. Sonia Margarita Estrella Vásquez

Directora de la Disertación

Quito, 24 de junio de 2020

## **DEDICATORIA**

Con mucho cariño a mi familia, especialmente, a mi madre, mis tías y mi abuela.

A mis amigos cercanos.

A la PUCE

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios por sus bendiciones y por permitirme culminar con éxito esta etapa de mi vida.

A mi familia, que siempre hizo todo lo posible para que yo pueda recibir educación de calidad.

Agradezco a mi madre, por apoyarme en todos mis propósitos y sueños, que gracias a su ejemplo he llegado a ser lo que soy.

A mi tía Sandra, que ha sido un ejemplo de lucha y apoyo en mi vida, que me ayudó a cumplir mis metas, a mi tía Nohemí y mi abuela Clara quienes siempre llenaron de cariño y amor mi vida.

A mis tíos Guillermo, Ramiro y mi primo Antonio que han sabido brindarme consejos.

A la Magíster Magaly Estrella, porque desde el primer momento me apoyó con el desarrollo del presente trabajo, por la amistad brindada y porque me ha enseñado el verdadero significado de ética y de un trabajo de calidad. Al Doctor Heriberto Fernández, por todos los conocimientos brindados, fue un honor trabajar a su lado.

Muchas gracias Gabriela Felicita, futura gran Microbióloga y gran amiga por tu ayuda en el desarrollo de la tesis, te agradezco no solo por la ayuda brindada, sino por los buenos momentos convividos.

A la Microbióloga Ximena Oñate, que ha sido un pilar fundamental tanto en mi vida como en mi carrera profesional, a la Doctora Verónica Velazco gracias por sus conocimientos y a la Doctora Pilar Rodríguez de quien recibí grandes enseñanzas.

Gracias al Laboratorio de Diagnóstico Livexlab, sobre todo a los Microbiólogos Cristina Montalvo Castro y a Gonzalo Chávez.

Agradezco al área de Preparaciones de la PUCE en especial a Bolívar, Gabriela y sobre todo a Carolina Pineda.

Gracias Emma Dávila por el apoyo durante todo este tiempo, a mis amigos María Fernanda Celi, Carlos Torres, Nicolás Machasillas, Daniel Chamorro, Leslie Aldaz, Cristian Bernal, Galo Ordoñez, Cesar Melendres, David Suarez y Martin Arellano.

Al Padre Olger Paz, por ser mi guía espiritual y un consejero de vida.

A los profesores, Fernando Santacruz, Diana Astorga, Elena Granda gracias por todo su apoyo.

A mis compañeros y amigos de carrera por su ayuda y ánimos.

## TABLA DE CONTENIDOS

Carátula.....	I
Certificado de aprobación.....	II
Dedicatoria.....	III
Agradecimientos.....	IV
Tabla de contenidos.....	VI
Lista de figuras.....	VII
Lista de tablas.....	VIII
RESUMEN. –.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
Muestreo. –.....	14
Procesamiento de muestras. -.....	15
Cultivo en medios selectivos. -.....	16
Identificación fenotípica preliminar. -.....	17
Hidrólisis del hipurato de sodio al 1%. -.....	18
Viabilidad de los discos. –.....	18
Sensibilidad al ácido nalidíxico y cefalotina. -.....	18
Estudio de la susceptibilidad antibiótica. -.....	19
Conservación de las cepas. -.....	20
Extracción de ADN. -.....	20
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). -.....	21
Electroforesis en gel de agarosa. -.....	23
RESULTADOS.....	23
Aislamiento e identificación. –.....	24
Estudio de la susceptibilidad antibiótica. -.....	27
Identificación molecular. -.....	29
Análisis Estadístico. -.....	31
DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIONES.....	40
RECOMENDACIONES. ....	40

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Porcentajes correspondientes a aislados positivos y negativos.....	<b>24</b>
<b>Figura 2.</b> Caracterización macroscópica de los aislados. ....	<b>24</b>
<b>Figura 3.</b> Visualización microscópica.....	<b>25</b>
<b>Figura 4.</b> Resultados de las pruebas bioquímicas.....	<b>26</b>
<b>Figura 5.</b> Resultados de Pruebas Bioquímicas. Prueba de sensibilidad al Ac. Nalidíxico, Cefalotina e Hidrólisis del hipurato de sodio 1% .....	<b>27</b>
<b>Figura 6.</b> PCR convencional específica para confirmación del género <i>Campylobacter</i> spp.....	<b>30</b>
<b>Figura 7.</b> PCR convencional para confirmación de la especie <i>C. coli</i> .....	<b>30</b>
<b>Figura 8.</b> PCR convencional para confirmación de la especie <i>C. jejuni</i> .....	<b>31</b>
<b>Figura 9.</b> PCR convencional para confirmación de la especie <i>C. upsaliensis</i> .....	<b>31</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Secuencia de primers para PCR para <i>Campylobacter</i> spp.....	<b>22</b>
<b>Tabla 2.</b> Resultados de las muestras de ciegos, contenido cecal, hígados y mollejas, positivas para el género <i>Campylobacter</i> spp.....	<b>26</b>
<b>Tabla 3.</b> Resultados de la sensibilidad y resistencia de los aislados positivos de <i>Campylobacter</i> spp. obtenidos a partir de muestras de hígados, ciegos, mollejas y contenido cecal.....	<b>28</b>

## Determinación de la resistencia antimicrobiana en cepas de

### *Campylobacter* aisladas de pollos de engorde

#### Determination of antimicrobial resistance in *Campylobacter* strains isolated from broilers

Jonathan Park-Jarrin<sup>1</sup>, Heriberto Fernandez<sup>2</sup>, Fernando Santacruz<sup>1</sup>, Sonia Estrella<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Quito, Ecuador

<sup>2</sup> Universidad Austral de Chile, Instituto de Microbiología Clínica, Facultad de Medicina, Valdivia, Región de Los Ríos, Chile

japark@puce.edu.ec

#### RESUMEN. –

*Campylobacter* spp. es uno de los principales patógenos transmitidos por los alimentos en todo el mundo, especialmente por contaminación de carne y menudencias de pollo de engorde, principales componentes de la dieta ecuatoriana. Este patógeno está asociado a diarreas infecciosas a nivel mundial. En este estudio, se aisló, identificó y determinó la resistencia de *Campylobacter* spp. frente a los antibióticos utilizados en la crianza de pollos de engorde provenientes de las ciudades de Loja, Ambato y el cantón San Miguel de Los Bancos. Se analizaron 50 pollos con un total de 200 muestras, a razón de 50 muestras de cada uno de los siguientes tejidos: hígados, mollejas y ciegos, así como contenidos cecales. La bacteria fue aislada en medio selectivo de Butzler e identificada mediante pruebas bioquímicas como catalasa, oxidasa, hipurato de sodio al 1%, entre otras. El género *Campylobacter* fue confirmado a través de PCR convencional empleando cebadores específicos. 38 (76 %) aislados fueron positivos para *Campylobacter* spp., de los cuales 26 aislados (68,42 %) fueron *C. coli*, 7 aislados (18,42 %) *C. jejuni*, y 5 aislados (13,16 %)

fueron *C. upsaliensis*. A través del método de difusión en disco, se determinó que todas las cepas fueron resistentes a ciprofloxacina, eritromicina y tetraciclina. Además, se demostró sensibilidad en 38 aislados (100 %) a ampicilina y ampicilina-sulbactam y sensibilidad en 23 aislados (60,53 %) a gentamicina.

**PALABRAS CLAVE:** *Campylobacter*, pollos de engorde, resistencia antimicrobiana, menudencias.

**ABSTRACT.** –

*Campylobacter* spp. It is one of the main foodborne pathogens throughout the world, especially for contamination of meat and offal of broilers, which are the main components of the Ecuadorian diet. This pathogen is associated with infectious diarrhea worldwide. In this study, it was seen, the resistance developed by *Campylobacter* spp. against the antibiotics used in the breeding of broilers from the cities of Loja, Ambato and the canton of San Miguel de Los Bancos. 50 chickens with a total of 200 samples were analyzed, at a rate of 50 samples from each of the following tissues: livers, gizzards and blind and ceca contents. The bacterium was isolated in Butzler's selective medium and identified by biochemical tests such as catalase, oxidase, 1% sodium hippurate among others. The *Campylobacter* genus was confirmed through a conventional PCR. 38 samples were positive for *Campylobacter* spp. (76%), of which 68.42% were *C. coli*, 18.42% *C. jejuni*, and 13.16% *C. upsaliensis*. Through the disk diffusion method, it was determined that all strains exhibited resistance to ciprofloxacin, erythromycin and tetracycline, while 100% sensitivity to ampicillin and ampicillin plus sulbactam and a sensitivity of 60.53% to gentamicin was demonstrated.

**KEYWORDS:** *Campylobacter*, broilers, antimicrobial resistance, *C. upsaliensis*

## INTRODUCCIÓN

*Campylobacter* es un patógeno presente en el ambiente, causante de una enfermedad zoonótica, asociada a diarrea infecciosa en el ser humano. Es uno de los cuatro principales patógenos responsables de enfermedades diarreicas bacterianas a nivel mundial (OMS, 2018). Esta bacteria pertenece al Phylum Proteobacteria -uno de los más grandes grupos dentro del Dominio Bacteria-, incluida en el Orden Campylobacterales y Familia Campylobacteraceae (Bergey, Breed, Murray y Hitchens, 1994). Presenta una morfología bacilar curva, tinción Gram negativa, motilidad por la presencia de flagelo y cápsula que son factores de resistencia y virulencia (Hernández, Aguilera y Castro, 2013). Son microaerófilas (crecen bien en ambientes pobres en oxígeno y dióxido de carbono), termotolerantes, catalasa y oxidasa positivo. La hidrólisis de hipurato de sodio 1% positiva sirve para diferenciar a *Campylobacter jejuni* de las otras especies (Fernández, Ochoa y Simaluiza, 2016; Vinueza, 2017; Simaluiza, Toledo y Fernández, 2018). Así, podemos encontrar cinco especies de este género, que son responsables de la mayoría de las campylobacteriosis en humanos, siendo *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* las más frecuentes. Ocasionalmente, también se puede asociar a *Campylobacter lari* y raramente a *Campylobacter upsaliensis* y *Campylobacter fetus* en este tipo de infecciones (Simaluiza, Toledo, Ochoa y Fernández, 2015; Natsos, Koutoulis, Sossidou, Chemaly y Mouttotou, 2018).

A este microorganismo, se lo encuentra en animales de granja, especialmente en pollos de engorde. En los que, forman parte de su microbiota normal. Por lo tanto, son su principal reservorio y un foco de transmisión de la campylobacteriosis (Rawat, Deepak, y Upadhyay, 2018). Su transmisión ocurre por el consumo de carne, hígados y mollejas de pollo poco cocidas o crudas (Simaluiza, Toledo y Fernández, 2018). Por otro lado, la infección también

se puede producir porque la carne de los animales muertos o sus vísceras quedan contaminadas con las heces durante el sacrificio (Picazo, 2016; OMS, 2018).

Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) son uno de los problemas más comunes en la salud pública en Ecuador, donde microorganismos patógenos o sustancias dañinas pueden contaminar los alimentos y causar enfermedad (Organización Internacional para la Estandarización, 2017). En América del Sur, se ha reportado el incremento en un 45 % de casos de infección por el género *Campylobacter* a partir del consumo de carne de pollo (Fernández, 2011; Fernández y Torres, 2015). En el 2017 se presentaron alrededor de 35 000 casos de infecciones por *Campylobacter* spp. en Ecuador, específicamente en la provincia de Pichincha (Ministerio de Salud Pública, 2017). La gastroenteritis humana está asociada con enfermedades transmitidas por alimentos contaminados con este patógeno. En infantes puede desencadenar infecciones sistémicas graves, como las reportadas en los estudios de Poma, en Quito (2014) y Simaluiza, Toledo y Fernández, en Loja (2018).

La presencia del patógeno puede influir en la producción avícola por una contaminación masiva del lote, que conlleva al sacrificio del animal contaminado (Mardones & López, 2017). En ese sentido, la pérdida en las ventas podría tener repercusiones directas en el producto interno bruto (PIB) por sector (sector avícola), teniendo en cuenta que sus aportes alcanzaron el 3,7 % en el 2017 (Banco Central del Ecuador, 2018).

Las industrias agropecuarias, apicultoras y alimentarias utilizan sistemáticamente antibióticos para estimular el crecimiento y prevenir enfermedades en animales sanos (OMS, 2017). La administración de diferentes antimicrobianos en la producción de pollos de engorde genera la presencia de bacterias resistentes, como *Campylobacter* spp. presente en la carne de consumo. Otro mecanismo de transmisión de estas bacterias está asociado al personal que trabaja en las granjas con las aves de corral, así como obreros y veterinarios.

Ellos se colonizan con las bacterias de los animales que cuidan y funcionan, a la vez como vehículo de transmisión (Rawat, Deepak, & Upadhyay, 2018; Toledo, Simaluiza, Ochoa & Fernández, 2015).

La campylobacteriosis se caracteriza por la presencia de un proceso infeccioso, que se manifiesta con diarrea aguda sanguinolenta, fiebre, dolor abdominal, con períodos de convalecencia entre dos a diez días (Rossi, 2017; Simaluiza, Toledo, Ochoa & Fernández, 2018). Puede llegar a ser letal cuando perdura por más de dos semanas y al diseminarse por vía sistémica, con la posibilidad de desencadenar una bacteriemia (OMS, 2017).

Los grupos de riesgo de contraer esta afección usualmente son infantes, niños pequeños (con un sistema inmune en desarrollo), personas de edad avanzada, individuos con el sistema inmunológico débil (VIH/SIDA, cáncer, diabetes, insuficiencia renal o trasplantados) y mujeres embarazadas (Toledo, Simaluiza, Astudillo & Fernández, 2018). También, se ha asociado a la infección con el síndrome de Guillain-Barré, un tipo inusual de parálisis flácida que, en muchos casos, se la considera de origen desconocido. De igual manera, está relacionada con el síndrome de Miller-Fisher; una enfermedad autoinmune que destruye ciertos componentes neuronales (Poma, 2014; Fernández & Torres, 2015).

En el Ecuador, la producción de aves de corral es de aproximadamente 250 millones de individuos anuales (El Comercio, recuperado, 5 de julio de 2019). Dicha producción está destinada en su mayoría al consumo humano como parte de su dieta cotidiana. Esto ha provocado un aumento en el riesgo de transmisión de *Campylobacter* spp. a la población (Ochoa, Simaluiza, Toledo y Fernández, 2016). *Campylobacter* spp. se encuentra como microbiota normal de los pollos de corral desde los 15 - 20 días y en condiciones experimentales, puede colonizar a pollos de 1 día (Urdaneta, 2016).

El género *Campylobacter* ha generado mecanismos de resistencia contra antibióticos como se demuestra en el estudio de Simaluiza, Toledo, Ochoa, & Fernández (2015) en el Ecuador y en estudios de Sakaridis, et al. (2019) en Grecia. Se ha determinado resistencia a macrólidos como la eritromicina, debido a mutaciones en las posiciones 2074 y 2075 del *gen erm* que codifica el 23s ARN. Esta mutación actúa interviniendo en el sitio de unión ribosomal y puede afectar al crear alteraciones en las bombas de eflujo inespecíficas (Boto, 2014). También se ha reportado la resistencia a tetraciclinas que está dada por el *gen TetO*, ubicado en un plásmido, y contribuye a la producción de proteínas de protección ribosomal (Andrade, 2017). Por ello, es importante determinar la presencia de resistencia antibiótica en productos como carne y vísceras, obtenidos sobre todo a partir de aves de engorde (OMS, 2018).

En el presente estudio se pretende aplicar técnicas microbiológicas y moleculares establecidas en el laboratorio de docencia de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) para obtener diferentes aislados de *Campylobacter* spp., a partir de muestras de contenido cecal, ciegos, mollejas e hígados de pollos de engorde y establecer sus perfiles de resistencia antimicrobiana.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Muestreo. –**

Se obtuvieron diferentes muestras de pollos obtenidos de planteles avícolas que mantienen convenios con un laboratorio de diagnóstico veterinario de la ciudad de Quito. Las localidades de las plantas avícolas fueron: Loja (2 lotes), Ambato (1 lote) y el cantón San Miguel de los Bancos (7 lotes), con un total de 10 lotes que contenían 50 pollos en pie y con una edad de faenamiento entre los 20 y 43 días. Estos pollos fueron procesados siguiendo buenas prácticas de laboratorio. De cada pollo se tomó muestras de hígado, molleja, ciego y contenido cecal, alcanzando un total de 200 muestras de los 50 pollos. El muestreo se realizó

durante 8 semanas. Las porciones de ciegos, mollejas e hígados se colocaron de manera separada en una funda plástica estéril con cierre hermético. Estas muestras se ubicaron en un enfriador para mantener la cadena de frío hasta llegar al laboratorio de Microbiología de la PUCE.

### **Procesamiento de muestras. -**

Se siguió el protocolo establecido por Fernández, Ochoa y Simaluiza (2016). Se tomó una muestra de contenido cecal con un hisopo estéril y se inoculó en la superficie de cajas Petri con medio selectivo de Butzler constituido por agar Columbia, suplemento antibiótico de Butzler (bacitracina, novobiocina, cicloheximida, colistin, cefazolina) marca Oxoid y enriquecido con 5 % de sangre humana. Sobre este medio se realizó una siembra por agotamiento. La caja inoculada se incubó a 42 - 43 °C por 48 horas en una atmósfera microaerófila (5 - 10 % de oxígeno y 3 - 10 % de dióxido de carbono) creada con sobres generadores (Oxoid) específicos para el cultivo de *Campylobacter* spp. (Fernández, y Torres, 2015).

A las muestras de hígado, mollejas y ciego que se encontraban en las fundas plásticas estériles se colocaron 15 ml de caldo BHI (Brain Heart Infusion) enriquecido con antibióticos de Butzler (Farece y Viñas, 2007). Las muestras fueron incubadas por 48 horas a 42 - 43 °C en una jarra hermética, con sobres generadores de microaerofilia (Medina, 2015).

Las muestras de materia cecal fueron sembradas directamente en medio de Butzler. A las colonias sospechosas para *Campylobacter* spp. (colonias planas, no hemolíticas, grisáceas, 1 - 2 mm de diámetro, similares a gotas de rocío) se les realizó una coloración de Gram modificada (Fernández, 2011; Fernández, Ochoa, y Simaluiza, 2016).

La coloración Gram modificada, según recomienda Fernández (2011), utiliza carbolfucsina al 0,8 % en lugar de safranina. Esta modificación permitió obtener un mejor contraste de las formas bacilares en el frotis bacteriano.

### **Cultivo en medios selectivos. -**

La metodología siguió las indicaciones establecidas por Fernández, Ochoa y Simaluiza (2016). Los 15 ml de caldo de enriquecimiento fueron previamente colocados en las fundas estériles que contenían las porciones de mollejas, hígados y ciegos. De allí se tomó 200  $\mu$ l del caldo y fue filtrado de manera pasiva, utilizando una membrana de nitrocelulosa (marca Millipore) de 0,45  $\mu$ m de poro. Esto permitió separar a *Campylobacter* spp. del resto de la microbiota presente en las muestras que, por su mayor tamaño, no traspasó los poros y quedó retenida en la superficie de la membrana filtrante, mientras que *Campylobacter* spp. con un diámetro menor a 0,45  $\mu$ m atravesó los filtros (Jordán, 2014; Poma, 2014). Para este procedimiento, se dejó secar las cajas Petri de agar Columbia enriquecido con 5 % de sangre humana, a 37 °C por una o dos horas, con la finalidad de obtener una superficie totalmente seca. Esto facilitó la absorción del líquido filtrado. Luego se depositó asépticamente la membrana de nitrocelulosa de 0,45  $\mu$ m sobre la superficie de la caja Petri y se colocó, con una micropipeta, 200  $\mu$ l del caldo de enriquecimiento y se dejó reposar durante 30 minutos. Este procedimiento de filtración por membrana también fue realizado para aquellas muestras que aparecieron macroscópicamente y/o microscópicamente contaminadas.

Transcurrido el tiempo, se retiró la membrana con ayuda de una pinza anatómica estéril. La caja inoculada se incubó a 42 – 43 °C por 48 horas en una atmósfera microaerófila. Las colonias obtenidas con características planas, no hemolíticas, grisáceas, de 1 – 2 mm de diámetro (similares a gotas de rocío) fueron consideradas como sospechosas para *Campylobacter* spp. (Fernández, Ochoa, & Simaluiza, 2016).

Durante el proceso de aislamiento, identificación y confirmación del género *Campylobacter* y sus diferentes especies, se analizaron simultáneamente las cepas estándares: *Campylobacter coli* ATCC 33559 y *Campylobacter jejuni* ATCC 33560, utilizadas como controles positivos, mientras que las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fueron empleadas como controles negativos.

### **Identificación fenotípica preliminar. -**

#### **Prueba de catalasa**

Sobre una placa portaobjetos se colocó una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrógeno) al 3 % y con un palillo de madera se realizó una suspensión con colonias sospechosas de *Campylobacter* spp. Después de 15 segundos se observó el desprendimiento de burbujas, esto indica que la prueba es positiva, debido a que la bacteria presenta la enzima catalasa capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Este resultado es el esperado en la identificación preliminar del género *Campylobacter* (Fernández, & Torres, 2015; Simaluiza, Toledo & Fernández, 2018).

#### **Prueba de oxidasa**

La prueba de oxidasa se basa en la detección de la presencia activa de la enzima denominada citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo. Este citocromo es reducido por el oxígeno molecular, el cual actúa como aceptor final de electrones. Para la ejecución de la prueba se tomó una o dos colonias sospechosas, con un palillo de madera estéril y se colocaron sobre la cinta de oxidasa que contiene para-fenil diamina como sustrato. Al producirse la oxidación de los citocromos, la cinta cambia de color. Luego de 10 a 15 segundos se observó el cambio de color de la colonia a rosado y luego a negro. Esto indicó

la presencia de una prueba positiva. Este resultado positivo es sugestivo a la presencia de *Campylobacter* spp. (Mardones & López, 2017).

#### **Hidrólisis del hipurato de sodio al 1%. -**

Esta prueba se basa en la acción hidrolítica de la enzima hipuricasa que poseen los aislados que pertenecen a la especie *C. jejuni*. Con un asa estéril se tomaron de tres a cuatro colonias sospechosas para *Campylobacter* spp. y se colocaron en un tubo con 400 µl de una solución de hipurato de sodio al 1 %. La incubación fue en baño maría a 37 °C por 2 horas (Farece & Viñas, 2007; Medina, 2015; Paguanquiza, 2016). Al final de la incubación, se agregó 200 µl de solución de ninhidrina al 3,5 % en acetona-butanol a una proporción de 1:1 al tubo y se dejó en reposo a 37 °C. Se hizo la lectura a los 10 minutos. Una coloración azul violeta, indicó una reacción positiva a la presencia de esta enzima (Fernández, Ochoa & Simaluiza, 2016).

#### **Viabilidad de los discos. –**

Para comprobar la calidad y el funcionamiento de los discos de antibióticos, se utilizó el método de Kirby- Bauer con una cepa de *E. coli* ATCC 25922. Se realizó un antibiograma en agar Muller- Hinton y se mostró sensibilidad hacia los discos de: cefalotina, ácido nalidíxico, ampicilina/sulbactam, ampicilina, tetraciclina, eritromicina, gentamicina, ciprofloxacina. (Rodríguez, et al., 2000).

#### **Sensibilidad al ácido nalidíxico y cefalotina. -**

Con un asa estéril se tomaron tres a cuatro colonias (que se han desarrollado por 48 horas) sospechosas a *Campylobacter* spp. a partir del crecimiento microbiano sobre agar Columbia enriquecido con 5 % de sangre humana. Las colonias sospechosas se colocaron en un tubo con 4 ml de solución salina estéril al 0,9 %, hasta realizar una suspensión que se ajuste al

número uno de la escala McFarland. La turbidez fue comparada con la escala de Wickerham (López, Ramírez, Mambuscay y Osorio, 2010; Taraco, 2016). Esta suspensión se inoculó en 3 sentidos con un hisopo estéril sobre la superficie de una caja Petri con agar Muller-Hinton enriquecido con 5 % de sangre humana. Después se colocó un disco de ácido nalidíxico de 30 µg y un disco de cefalotina de 30 µg, separados uno de otro con una distancia de 2 cm. Se incubó en ambiente de microaerofilia a 42 – 43 °C por 48 horas. Transcurrido este periodo, se midió el halo de inhibición. Este procedimiento se utilizó para la diferenciación fenotípica de las especies de *Campylobacter* (Fernández y Torres, 2015).

#### **Estudio de la susceptibilidad antibiótica. -**

Por el método de Kirby- Bauer se probaron seis antibióticos distintos. Para esto, se tomaron tres a cuatro colonias sospechosas para *Campylobacter* spp. y se colocaron en un tubo con 4 ml de solución salina estéril y se ajustó la turbidez con la escala 1 de MacFarland que fue comparada con la escala de Wickerham (López, Ramírez, Mambuscay y Osorio, 2010; Taraco, Seija, y Vignoli, 2016). La suspensión se inoculó en 3 sentidos, usando un hisopo estéril, en la superficie de una caja Petri con agar Mueller-Hinton enriquecido con 5 % de sangre humana. Esta técnica de siembra se la realizó para cubrir completamente el medio y permitir un crecimiento homogéneo en la superficie del agar (Jiménez, Hoyos, Rodríguez, Navarro y Gutiérrez, 2016). A continuación, sobre la superficie del medio de cultivo inoculado, se colocaron cada uno de los discos que contienen los diferentes antibióticos que fueron probados: eritromicina (15 µg), tetraciclina (30 µg), gentamicina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), ampicilina (10 µg) y ampicilina/sulbactam (10 µg) (Vinueza, et al., 2017; Toledo, Simaluiza, y Fernández, 2018; Montero, Vayas, Ávilés, Pazmiño y Erazo, 2018; EUCAST, 2019).

Las cajas sembradas se incubaron a 42 – 43 °C por 48 horas, en ambiente microaerofílico. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron las lecturas de los halos de inhibición obtenidos (Fernández, Ochoa y Simaluiza, 2016). Las interpretaciones de los resultados obtenidos se evaluaron los lineamientos del EUCAST, 2019.

### **Conservación de las cepas. -**

Para la conservación de las cepas de *Campylobacter* spp. identificadas mediante pruebas bioquímicas, se realizó la técnica que utiliza leche entera UHT como matriz. Para esto, se hizo un hisopado en césped sobre agar Columbia enriquecido con 5 % de sangre humana de las colonias descritas como pertenecientes al género *Campylobacter*, se inocularon en la leche y se congelaron a -18 °C.

También se guardaron las cepas en caldo de enriquecimiento BHI (Brain Heart Infusion), siguiendo el mismo proceso descrito en el párrafo anterior.

### **Extracción de ADN. -**

Para realizar la extracción de ADN de las colonias sospechosas, se utilizó el caldo BHI inoculado previamente y congelado a -18 °C.

Se pipeteó 1 ml del caldo de BHI inoculado con *Campylobacter* spp. en un microtubo de 1,5 ml y se centrifugó por 5 minutos a 45 RCF (fuerza centrífuga relativa). Se descartó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con 1 ml de PBS (Tampón Fosfato Salino) 1X. Se eliminó el sobrenadante y se agregó PBS+Tween 20 0.05% 1X). Después de esto, se colocó en el termobloque (Clever Scientific) a 100 °C durante 10 minutos y se volvió a centrifugar por 10 minutos a 45 RCF. Finalmente, se guardó el sobrenadante en otro microtubo de 1,5 ml (López y Mejía, 2012).

La cantidad, pureza y grado de contaminación del ADN fue obtenido con ayuda del espectrofotómetro Genova Nano, Jenway a una longitud de onda de 230, 260 y 280nm.

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). -**

Para confirmar el género y obtener las especies de *Campylobacter* spp. se realizó PCR convencional utilizando cebadores para el género *Campylobacter* spp. (C412F y C1228R\*) y los cebadores correspondientes a las especies de *C. jejuni* (C-1, C-3), *C. coli* (CC18F, CC519R) y *C. upsaliensis* (CU61F, CU146R) (Tabla 1). La primera reacción de amplificación fue para la confirmación de género *Campylobacter* spp. Una segunda PCR confirmó a las especies *C. coli*, *C. jejuni* y *C. upsaliensis*. En la PCR para *C. coli* se utilizó la cepa ATCC 33559 de *C. coli* como control positivo, mientras que para *C. jejuni*, se trabajó con la cepa ATCC 33560 de *C. jejuni*. Finalmente para todas las reacciones de PCR, se utilizó como control negativo la cepa ATCC 25923 de *S. aureus*.

Las reacciones de PCR se realizaron con un volumen final de 25 µl compuestas de: (12,5 µl a 1X de GoTaq Green Master Mix), 1 µl a 1 µM de cada uno de los cebadores específicos, (9,5 µl) agua ultrapura (Milli-Q) y 1 µl del ADN específico de cada aislado. Los ciclos de amplificación realizados fueron: un ciclo a 94 °C por un minuto; 35 ciclos a 94 °C por 15 segundos, 45 °C por 45 segundos, 72 °C por 105 segundos y finalmente un ciclo de 72 °C por 5 minutos (Yamazaki, et al, 2007; Fernández, Ochoa y Simaluiza, 2016). La PCR realizada para las especies *C. jejuni* y *C. upsaliensis* tuvo una ligera modificación la cual incrementó en un grado a la temperatura de hibridación de los cebadores específicos, para así mejorar la especificidad y disminuir las uniones incorrectas de los cebadores C-1, C-3 (*C. jejuni*) y CU61F, CU146R (*C. upsaliensis*)

**Tabla 1.** Secuencias nucleotídicas de cebadores empleados en la identificación de *Campylobacter* spp. por PCR

<b>Secuencia de cebadores empleados en la identificación de <i>Campylobacter</i> spp.</b>				
<b>Especies</b>	<b>Tamaño (pb)*</b>	<b>Gen</b>	<b>Primer</b>	<b>Secuencia (5' - 3')</b>
Género	816	16s	C412F	5'-GGATGACACTTTTCGGAGC-3'
<i>Campylobacter</i>		<i>Rrna</i>	C1228R*	5'-CATTGTAGCACGTGTGTC-3'
<i>C. coli</i>	502	<i>askJ</i>	CC18F	5'-GGTATGATTTCTACAAAGCGAG-3'
			CC519R	5'-ATAAAAGACTATCGTCGCGTG-3'
<i>C. jejuni</i>	161	<i>Cj0414§</i>	C-1	5'-CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT-3'
			C-3	5'-CCATAAGCACTAGCTAGCTGAT-3'
<i>C. upsaliensis</i>	86	<i>LpxA</i>	CU61F	5'-CGATGATGTGCAAATTGAAGC-3'
			CU146R	5'-TTCTAGCCCCTTGCTTGATG-3'
<i>C. fetus</i>	359	<i>CstA</i>	MG3F	5'-GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT-3'
			CF359R	5'-AGCCAGTAACGCATATTATAGTAG-3'
<i>C. hyointestinalis</i>	611	23S	HYO1F	5'ATAATCTAGGTGAGAATCCTAG-3'
		<i>rRNA</i>	HYOFET2	5'GCTTCGCATAGCTAACAT-3'
			3SR	

\* pb: pares de bases. (Yamazaki, et al, 2007; Fernández, Ochoa y Simaluiza, 2016)

### **Electroforesis en gel de agarosa. -**

La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 2 %, durante 60 minutos a 100 Voltios. En los geles se colocaron 8 µl de los productos amplificados por PCR. Para determinar el tamaño de los fragmentos obtenidos se empleó un marcador de peso molecular de 100 bp (BIONEER) y se tiñó con Diamond™ Nucleic Acid Dye (Yamazaki, et al, 2007). El gel fue visualizado con ayuda del fotodocumentador Chemidoc™ MP.

### **RESULTADOS**

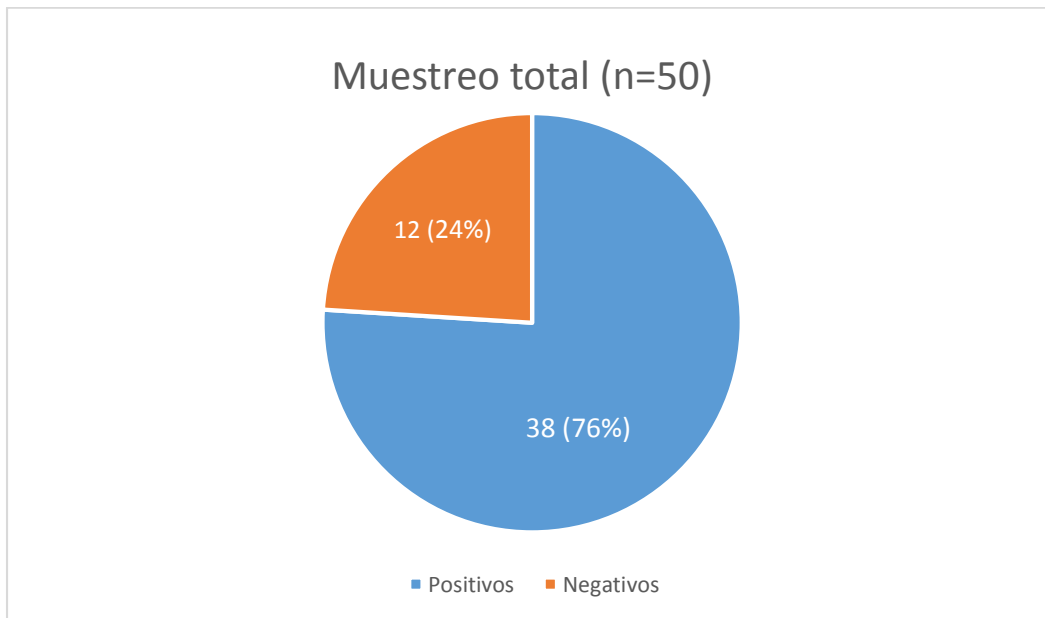
De los 50 pollos procesados, 38 salieron positivos para *Campylobacter* spp. (76 %) (Tabla 2). Para poder aislar *Campylobacter* spp. se procesaron 4 muestras de diferente parte de cada pollo: un fragmento de hígado, de ciego, de molleja y el contenido cecal; analizando un total de 200 muestras.

**Tabla 2.** Resultados obtenidos de cada muestra empleada en la obtención de aislados bacterianos del género *Campylobacter* spp. (ciegos, hígados, mollejas y contenido cecal).

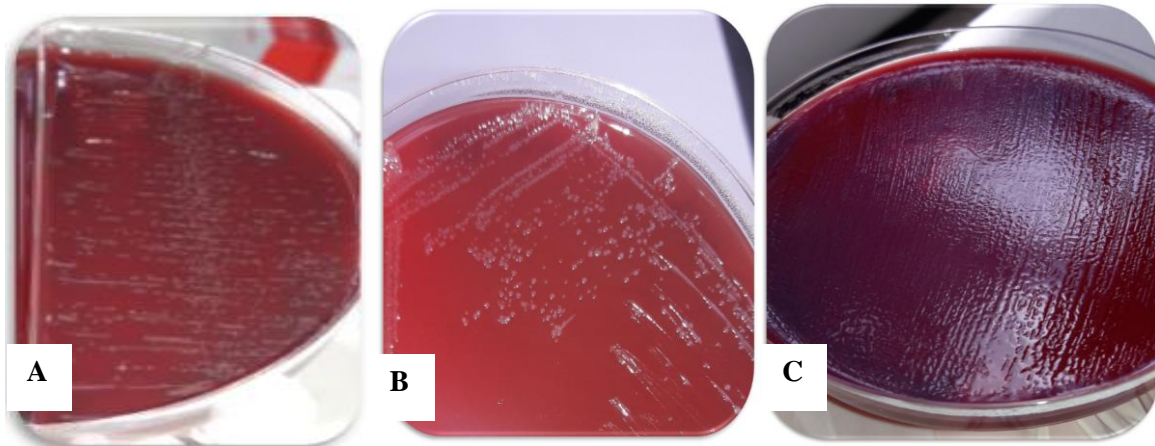
<b>Tipo de Muestra</b>	<b>Número de Pollos</b>	<b>Número de aislados positivos obtenidos de diferentes pollos</b>	<b>Número de aislados negativos obtenidos</b>
<b>Ciego</b>	50	19	31
<b>Contenido cecal</b>	50	2	48
<b>Hígado</b>	50	3	47
<b>Molleja</b>	50	14	36
<b>Total</b>	50	38	12

### **Aislamiento e identificación. –**

Los aislados de *Campylobacter* spp. obtenidos a partir de las muestras estudiadas se confirmaron microscópicamente mediante una tinción Gram modificada (Figura 1). Se observaron colonias con características macroscópicas típicas del género *Campylobacter*: colonias grisáceas, convexas, con bordes irregulares, o con forma de gota de agua, de rocío, puntiformes o alargadas y húmedas. Algunas colonias presentaron la capacidad de realizar “swimming”, que es una fina película húmeda superficial sobre los medios de cultivo sólidos (Figura 2).

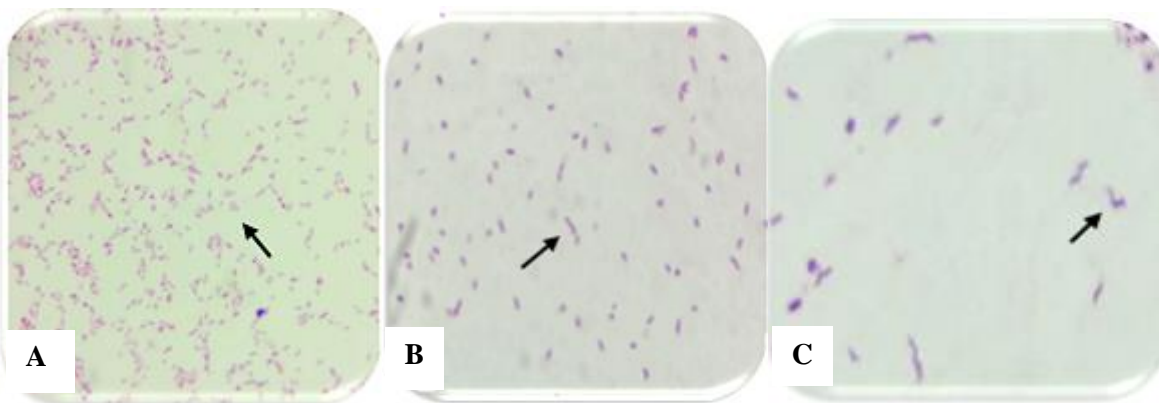


**Figura 1.** Porcentajes correspondientes a los aislados positivos y negativos obtenidos para el género *Campylobacter* spp a partir de 50 pollos.



**Figura 2.** Caracterización macroscópica de los aislados bacterianos obtenidos a partir de muestras de ciegos, hígados, mollejas y contenido cecal en agar Butzler. A) Colonias alargadas, húmedas, B) Colonias puntiformes y C) Presencia de “swimming” en el medio.

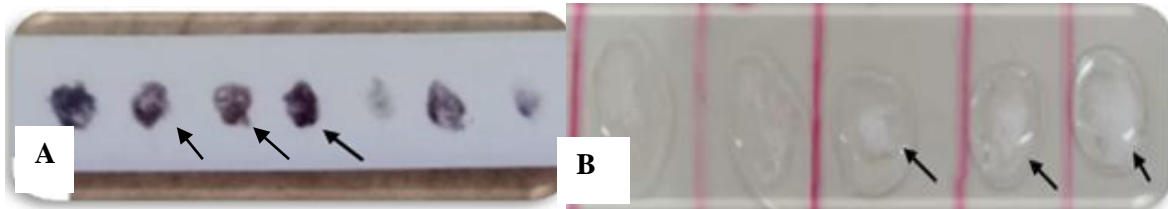
Las características morfológicas microscópicas de *Campylobacter* spp., fueron resaltadas con tinción de Gram modificada. Se observaron bacilos delgados Gram negativos, curvos, en espiral, con forma de alas de gaviota (Figura 3).



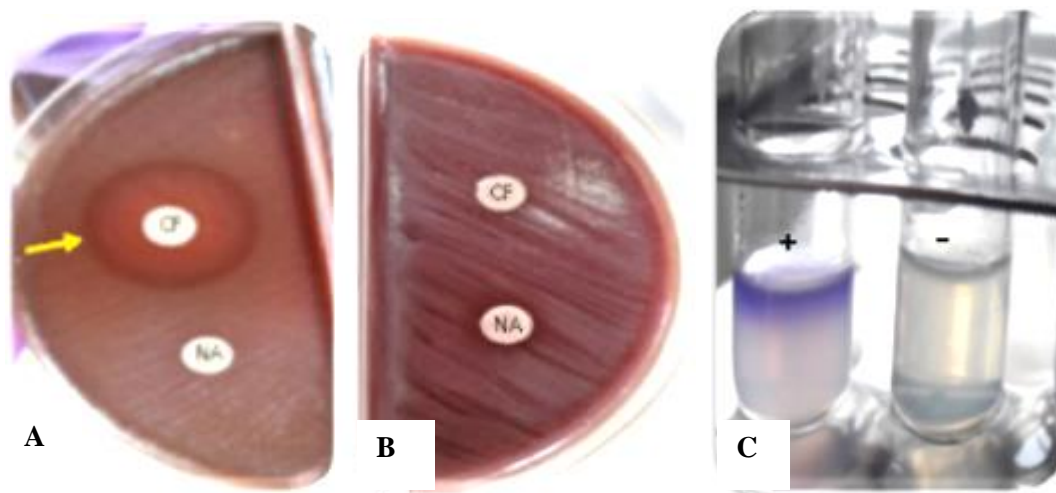
**Figura 3.** Visualización microscópica de *Campylobacter* spp. a magnificación 100X. A) bacilos Gram negativos cortos curvos y en espiral, correspondientes a *Campylobacter* spp., B) Bacilos alargados espiralados, C) Morfología típica de *Campylobacter* spp. en forma de alas de gaviota.

Los aislados fueron caracterizados por diferentes pruebas bioquímicas: catalasa, oxidasa, hidrólisis de hipurato de sodio 1 % y sensibilidad al ácido nalidíxico y cefalotina. Los 38 aislados obtenidos fueron catalasa y oxidasa positivo (Figura 4). Sin embargo, solo 7 cepas realizaron hidrólisis del hipurato de sodio 1 %, esto indica que tan solo un 18,42 % de las cepas presentaron la enzima hipuricasa (Figura 5C). En cuanto a la prueba de diferenciación

antibiótica hacia la cefalotina, existieron 12 cepas resistentes (31,58 %) y 26 sensibles (68,42 %). Para el ácido nalidíxico se presentaron 36 cepas resistentes (94,74 %) y 2 sensibles (5,26 %) (Figura 5A y 5B).



**Figura 4.** Resultados de las pruebas bioquímicas. A) Las flechas muestran una prueba positiva para oxidasa, presencia de color negro B) Prueba positiva para catalasa, las flechas indican el desprendimiento de burbujas.



**Figura 5.** Resultados de las pruebas bioquímicas. A) Prueba de sensibilidad al ácido nalidíxico (NA) y cefalotina (CF), donde se observa una resistencia al ácido nalidíxico y la flecha muestra sensibilidad a la cefalotina, B) Prueba de sensibilidad al ácido nalidíxico y cefalotina, se visualiza la resistencia hacia ambos antibióticos, C) Prueba de hidrólisis del hipurato de sodio, la formación del anillo morado indica una reacción positiva.

### **Estudio de la susceptibilidad antibiótica. –**

Se realizó la lectura de los halos de inhibición y su interpretación de acuerdo con el manual EUCAST, 2019 (Tabla 3). Se obtuvieron un total de 15 cepas resistentes (39,47 %) y 23 cepas sensibles (60,53 %) a la gentamicina. Las 38 cepas (100 %) presentaron resistencia a ciprofloxacina y eritromicina. 38 cepas fueron sensibles a la ampicilina y ampicilina-sulbactam (100 %).

**Tabla 3.** Resultados de la susceptibilidad de los aislados positivos a *Campylobacter* spp. obtenidos a partir de muestras de hígados, ciego, mollejas y contenido cecal.

Especie	Tipo de muestra	GN		AM				SAM				CIP				TE				E					
		R	%	S	%	R	%	S	%	R	%	S	%	R	%	S	%	R	%	S	%				
<i>C. coli</i>	Ciego	5	13.16	8	21.05	0	0	13	34.21	0	0	13	34.21	13	34.21	0	0	13	34.21	0	0	13	34.21	0	0
	Mollejas	2	5.26	9	23.68	0	0	11	28.95	0	0	11	28.95	11	28.95	0	0	11	28.95	0	0	11	28.95	0	0
	Higado	0	0	2	5.26	0	0	2	5.26	0	0	2	5.26	2	5.26	0	0	2	5.26	0	0	2	5.26	0	0
<i>C. jejuni</i>	Ciego	4	10.53	0	0	0	0	4	10.53	0	0	4	10.53	4	10.53	0	0	4	10.53	0	0	4	10.53	0	0
	Mollejas	2	5.26	0	0	0	0	2	5.26	0	0	2	5.26	2	5.26	0	0	2	5.26	0	0	2	5.26	0	0
	Higado	0	0	1	2.63	0	0	1	2.63	0	0	1	2.63	1	2.63	0	0	1	2.63	0	0	1	2.63	0	0
<i>C. upsaliensis</i>	Ciego	2	5.26	2	5.26	0	0	4	10.53	0	0	4	10.53	4	10.53	0	0	4	10.53	0	0	4	10.53	0	0
	Mollejas	0	0	1	2.63	0	0	1	2.63	0	0	1	2.63	1	2.63	0	0	1	2.63	0	0	1	2.63	0	0
	Higado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		39.47		60.53		0		100		0		100		100		0		100		0		100		0	

R: Resistente; S: Sensible, GM: gentamicina, AM: ampicilina, SAM: ampicilina-sulbactam, CIP: ciprofloxacina, TE: tetraciclina, E: eritromicina.

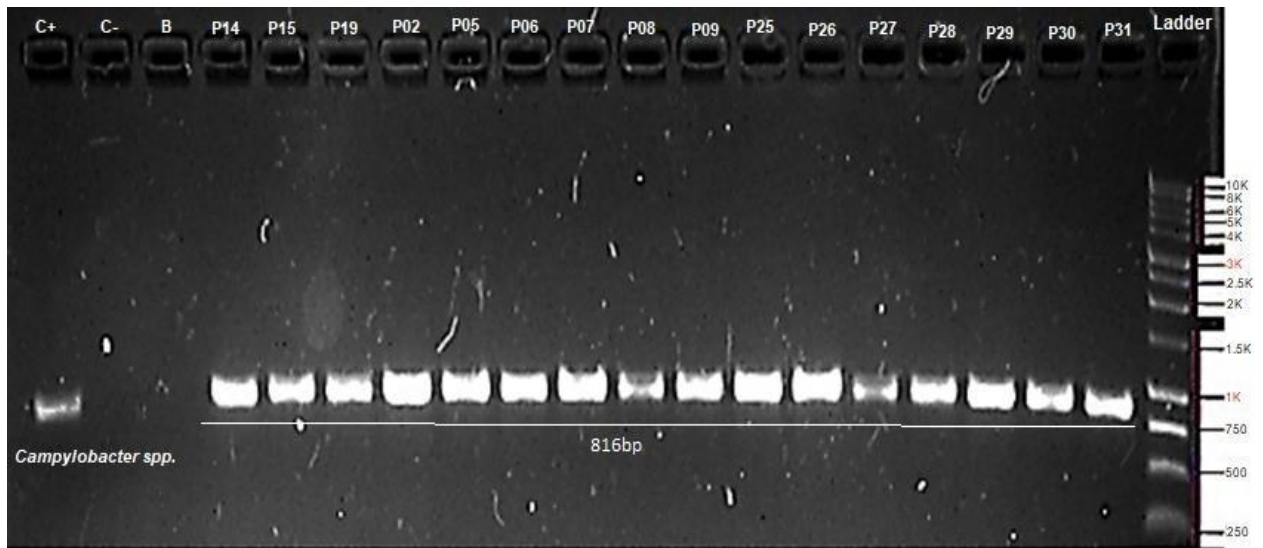
### **Identificación molecular. -**

Para confirmar los resultados de la identificación fenotípica del género *Campylobacter* obtenida por microscopía y pruebas bioquímicas, se hizo una PCR convencional empleando cebadores específicos para el género (Moreno y Florez, 2010). La identificación genotípica fue dirigida al gen 16s RNA, debido a que este ayuda a establecer relaciones filogenéticas y es considerado un cronómetro molecular que permite la identificación de diversos microorganismos (Rodicio y Mendoza, 2004)

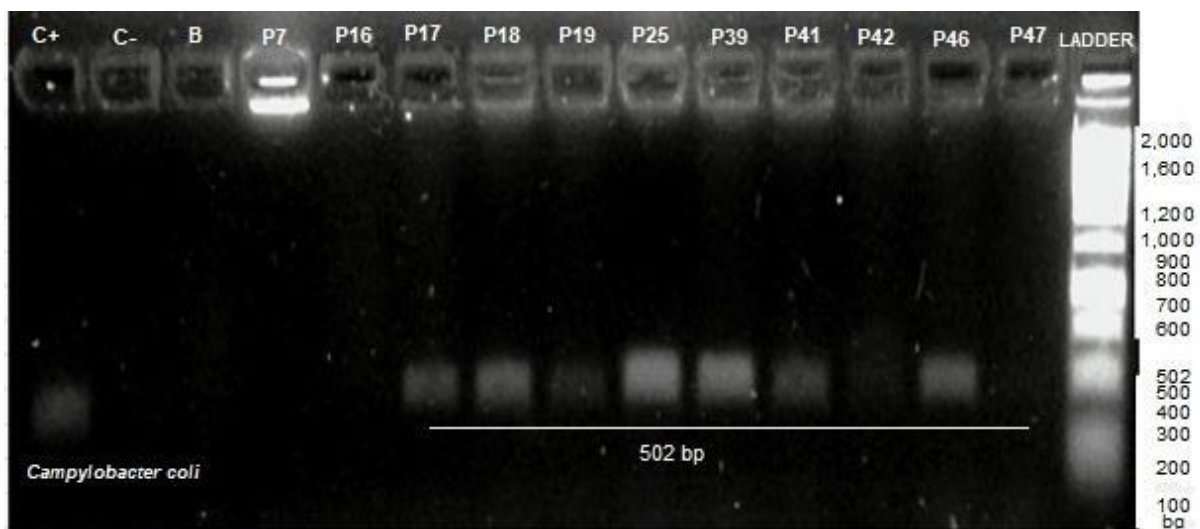
El análisis molecular identificó bandas específicas para el género *Campylobacter* spp. con un peso de 816 pares de bases (pb) (Figura 6). También, se determinaron las especies de *Campylobacter* presentes en este estudio, realizando PCR convencional dirigidas a los genes *ask<sup>t</sup>* para *C. coli*, *Cj0414<sup>s</sup>* para *C. jejuni* y el gen *LpxA* para *C. upsaliensis*. Para *C. jejuni*, el gen utilizado se encuentra altamente conservado y se expresa mayoritariamente a una temperatura de incubación de 42 °C. Este gen no se encuentra presente en ninguna de las otras especies de *Campylobacter* (Pajaniappan, et al., 2008). Por otro lado, el gen *LpxA* se encuentra en la membrana interna de *C. upsaliensis*, constituyendo parte del lípido A (Jiménez, 2008). Mientras que el gen *ask<sup>t</sup>* (aspartato quinasa), se emplea específicamente para *C. coli* (Chowdhury, et al., 2019).

De las 38 cepas identificadas como *Campylobacter* spp., se obtuvieron 26 bandas de 502 pb (Figura 7), que corresponden a *C. coli* (68,42 %). Para *C. jejuni* se obtuvieron 7 bandas con peso de 161 pb, obteniendo un 18,42% de *C. jejuni* (Figura 8). Finalmente, se realizó una PCR convencional sin control positivo para la identificación de 5 muestras que dieron negativo para las especies de *C. coli* y *C. jejuni*, las cuales fueron probadas para *C. fetus* (gen *CstA*), *C. hyointestinalis* (gen *23S rRNA*) y *C. upsaliensis* (*LpxA*). No se obtuvieron bandas

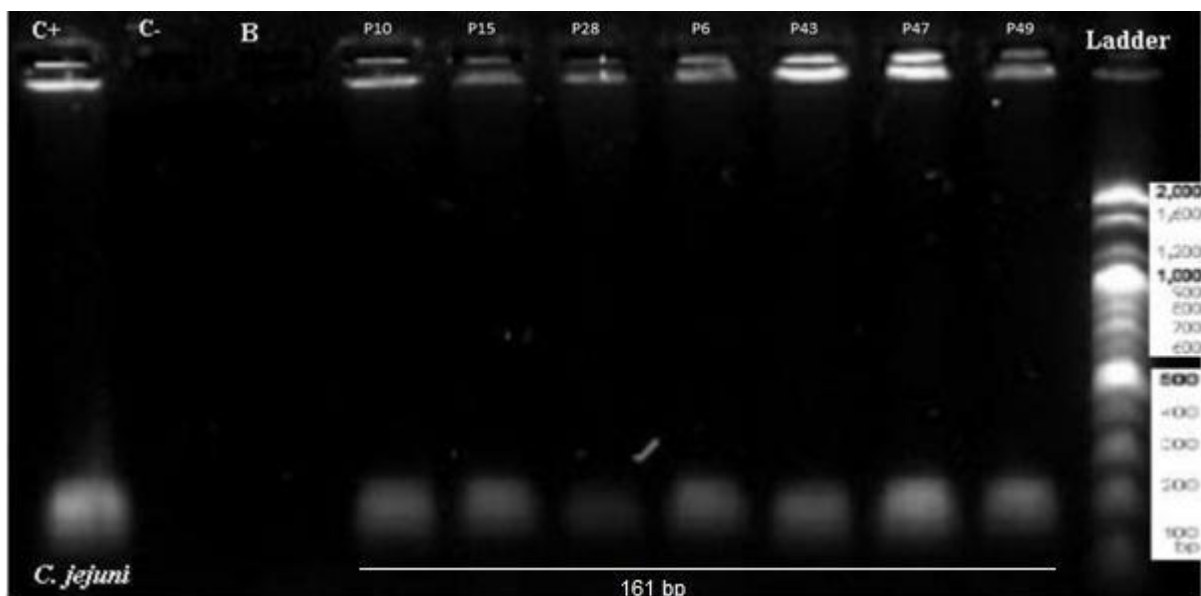
para *C. fetus* y *C. hyointestinalis*. Se obtuvo amplificación de bandas para *C. upsaliensis* con un peso molecular de 86 pb (Figura 9), alcanzando un 13,16% (5 aislados).



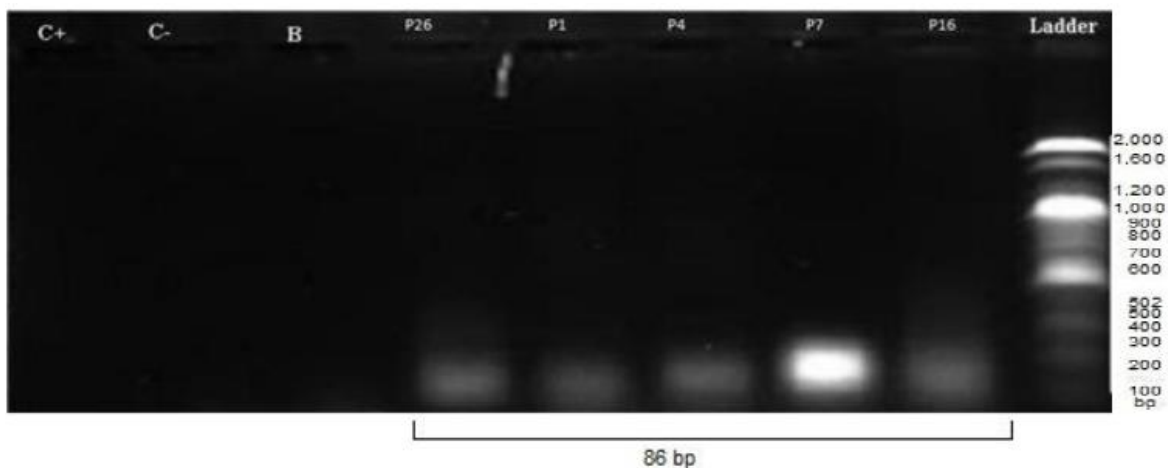
**Figura 6.** Gel representativo que contiene las bandas amplificadas del género *Campylobacter* spp. De izq a der, el primer pocillo contiene el control positivo (C+) (cepa ATCC 33560 de *C. jejuni*), el siguiente pocillo tiene el control negativo (C-) (*S. aureus*), el tercer pocillo posee el blanco (agua milli Q) y los siguientes pocillos se cargaron con las muestras positivas. El último pocillo contiene el marcador de peso molecular de 1kb, donde se observa que el tamaño de banda de 750 pb a 1kb.



**Figura 7.** Gel representativo que contiene las bandas amplificadas de la especie *C. coli*. De izq a der, el primer pocillo posee el control positivo (C+) (cepa *C. coli* ATCC 33559), el segundo pocillo contiene el control negativo (C-) (*S. aureus* ATCC 25923) y el tercer pocillo está cargado con el blanco, los siguientes pocillos poseen los aislados analizados. En el pocillo final se colocó el marcador de peso molecular de 100bp DNA Ladder. Se observa una banda con un peso de 400 pb a 500 pb, aproximadamente 502 pb.



**Figura 8.** Gel representativo que contiene las bandas amplificadas de la especie *C. jejuni*. De izq. a der. el primer pocillo contiene la cepa ATCC 33560, para *C. jejuni* (control positivo), el segundo y tercer pocillo poseen el control negativo (*S. aureus* ATCC 25923) y el blanco (agua Milli Q), respectivamente. Los siguientes pocillos se hallan cargados con las muestras y en el último pocillo, el Ladder de 100bp. Se observa la banda entre los 100 y 200 pb, aproximadamente 161 pb.



**Figura 9.** Gel representativo que contiene las bandas amplificadas de la especie *C. upsaliensis*. De izq a der, el primer pocillo se cargó con el control negativo (C-) (*S. aureus* ATCC 25923), el segundo pocillo con el blanco (Agua Milli-Q) y los demás pocillos poseen las muestras. Finalmente se halla el Ladder de 100bp. Se observa una banda de aproximadamente 82 pb.

### Análisis Estadístico. -

Los resultados obtenidos se expresaron mediante porcentajes en base al total de pollos con aislados bacterianos positivos.

Para el análisis de datos se utilizó el programa Microsoft Excel.

## DISCUSIÓN

La campylobacteriosis es una enfermedad considerada como uno de los problemas diarreicos más comunes según la OMS (2018). Con base en el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) de Ecuador, en el año 2013, una de las principales causas de morbilidad poblacional fueron las enfermedades diarreicas y problemas de gastroenteritis (Cuenca, 2015). Debido a que Ecuador es un gran productor avícola, la mayoría de la dieta ecuatoriana consiste en el consumo de carne de pollo y sus menudencias, siendo este el factor más común de transmisión de la campylobacteriosis, pues *Campylobacter* spp. presenta la capacidad de atravesar la mucosa intestinal, en ciertos casos, como mecanismo de evasión a pH ácidos, gracias a su flagelo. Éste le permite llegar a zonas del tramo gastrointestinal del pollo, donde las concentraciones de pH son menores, como el que se encuentra en la molleja (pH 3,35) y el hígado (pH 6,60), o concentraciones neutras como el pH del ciego que va de 7,08 a 7,12 (Gañán, 2009; Iovine, 2013; Fernández, Ochoa y Simaluiza, 2016).

En estudios como de los de Simaluiza, Toledo y Fernández (2018), realizado en Loja – Ecuador, se indicó que cuadros diarreicos, fueron asociados con gastroenteritis, causadas por *C. jejuni* en 13 casos (5,1 %) y 3 (1,2 %). por *C. coli*. El estudio de Jurado (2016) en España, demostró que la Campylobacteriosis se asocia al consumo de carne de pollo contaminada, sobre todo al consumo de mollejas e hígados, donde el número de casos anuales fue de 4 956 en el 2012, llegando a los 6 794 casos en el 2014, con un 83% de *C. jejuni* identificado y un 11% de *C. coli*.

En la presente investigación, los resultados mostraron que la frecuencia de aislamiento del género *Campylobacter* fue del 76 %. En cuanto a sus especies, un 68,42 % fue para *C. coli*, un 18,42 % para *C. jejuni*, y finalmente un 13,16 % para *C. upsaliensis*, en muestras de hígados, mollejas, ciegos y contenido cecal de pollos. Esto demuestra un aumento de *Campylobacter* spp. en comparación con los estudios realizados por Vasco (2015) en Quito:

Yaruquí, donde se aisló un 30,7 % de *Campylobacter* spp. a partir de muestras fecales de pollo. En el 2015, en Quito, Medina reportó un 64 % de aislamientos en carcasas de pollo. De igual manera, en investigaciones de Ochoa, Simaluiza, Toledo y Fernández, en el 2016, en hígados de pollo de traspatio, de tres localidades del sur de Ecuador (Vilcabamba, Loja, y Zamora), se obtuvo un 41,7 % de muestras positivas para *Campylobacter* spp. Mientras que, en estudios de Vinuesa, en Pichincha (2017) reportan que la prevalencia de *Campylobacter* spp. fue del 64,1 % en el contenido cloacal de la carne de aves de corral.

En Sapporo, Japón (2007), se aisló un 64,7 % de *Campylobacter* spp, y se indicó una contaminación que va del 40 al 45% en hígados y mollejas, mientras que en carne de pollo se encontró en el 70 % (Sallam, 2007). Esto, concuerda con el presente estudio, en el que se obtuvo una contaminación por *Campylobacter* spp. del 44,18 %, en hígados y mollejas. De igual manera, estudios como los de Karki, et al. (2018) en Estados Unidos, indican un 59,28 % de aislamientos de *Campylobacter* spp. en muestras de hígados y mollejas, donde se obtuvo un 60,60 % para *C. coli* y un 39,39 % para *C. jejuni*. Estudios de América Latina como el de Rojas, et al., (1996) en Costa Rica, reportaron un total de 73,3 % de *Campylobacter* en muestras de hígados, cuellos y mollejas, mientras que Figueroa (2018), en Perú: Puno logró obtener un 27,78 % de aislados en muestras de hígados y mollejas de pollo. El presente estudio obtuvo un 44,73 % de aislados de *Campylobacter* spp. en hígados y mollejas, porcentaje que está en relación con varios de los estudios referenciados.

En China, se obtuvo un 35,9 % de *Campylobacter* spp. en contenido cecal (Chen et al., 2010), en Estados Unidos se alcanzó un 51,4 % de prevalencia en muestras fecales de pollos broiler (Berghaus et al., 2013), en Argentina, se reportó un 62,1 % de aislados de *Campylobacter* obtenido de contenido cecal (Velilla, Terzolo, & Méndez, 2011). De igual manera, varios estudios que utilizaron contenido cecal reportaron la presencia de *Campylobacter* spp, como: Ruiz (2015), en Madrid, un 90 %, en la Unión Europea se obtuvo un 71,2 % (EFSA, 2010),

en Reino Unido un 75,8% (Powell et al., 2012) y en Grecia un 90% (Sakaridis, Papadopoulos, Boukouvala, Ekateriniadou, Samouris, y Zdragas, 2019). Datos similares de estudios reportados para Ecuador, Poma (2014) logró obtener un 71,8 % de aislados a partir de heces y contenido cecal. Este estudio encontró un 5,26 % de *Campylobacter* spp. en contenido cecal. Estudios de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), asocian la edad del faenamiento con el riesgo de *Campylobacter* spp. en pollos de engorde (FAO y WHO, 2009), que concuerda con estudios de Velilla et al. (2011), donde se indica una colonización máxima de *Campylobacter* spp. en aves de engorde entre los 42 y 45 días. En la presente investigación, la edad de faenamiento de los pollos fue, en la mayoría de los casos, a los 21 días, es decir, edad en la que el colon recién está comenzando a colonizarse con su microbiota normal. Esto puede indicar la baja prevalencia encontrada de *Campylobacter* spp en el contenido cecal.

En cuanto a las especies del género *Campylobacter*, se obtuvo una mayor prevalencia de *C. coli* (68,42 %) que de *C. jejuni* (18,42 %). Según Fernández (2011) se presenta con mayor frecuencia *C. coli* en animales y humanos en países de Sudamérica. Un ejemplo claro de esta prevalencia, se observa en la investigación de Poma en Ecuador (2014), donde se obtuvo un 67,69 % de *C. coli* y 38,3 % de aislados de *C. jejuni*. De igual manera, en Río de Janeiro, Brasil, se encontró un 53,66 % de *C. coli* y un 46,34 % de *C. jejuni* (Panzenhagen, et al., 2016). Sin embargo, el estudio de Sakaridis y colaboradores (2019) realizado en Grecia, demostró un aislamiento del 89,34 % de *C. coli* y 6,06 % de *C. jejuni*. En otras regiones del mundo como Europa: Reino Unido, Indica que la presencia de *C. jejuni* (40,6 %) es mayor a la de *C. coli* (31,9 %) (EFSA, 2010). En España, se obtuvo un 82,05 % de *C. jejuni* y un 35,90 % de *C. coli* (Urdaneta, 2016). Este contraste puede darse por factores como: diferencias geográficas, climáticas, técnicas de crianza del animal empleadas por países industrializados (Poma, 2014).

Adicionalmente, en la presente investigación se aisló un 13,16 % de *C. upsaliensis*, especie de la que no se tiene registro en Ecuador. Sin embargo, en países como Australia, se detectó un 9,7 % de *C. upsaliensis* en muestras de pollos (Kaakoush, et al., 2014) y en Brasil el 4,2 % (Kuana, et al., 2008). *C. upsaliensis* es la especie con menor frecuencia de aislamiento y en la actualidad se la ha denominado como una especie emergente. Su reservorio natural son gatos y perros. *C. upsaliensis* fue aislada por primera vez en 1983 en muestras de heces de perros y gatos que presentaban síntomas de enfermedades gastrointestinales (Patton, et al., 1989). En el 2012, el primer caso en humanos fue reportado en una mujer de 83 años que presentaba diarrea sanguinolenta. El género fue confirmado por medios de cultivos y tinción Gram, pero la identificación de la especie se dio por PCR debido a que las pruebas bioquímicas dieron resultados dudosos al presentar pruebas para catalasa débilmente positivas (Arellano, 2019).

En el año 1998, estudios de Bourke, Chan y Sherman, reportaron un aislamiento del 4 % de *C. upsaliensis* en muestras fecales de humanos, y en el 2002, Labarca, et al., indicaron un enlace definitivo entre animales domésticos (perros y gatos), como fuente principal de la enfermedad. Por otro lado, las aves de corral poseen una baja colonización de esta especie. En ese mismo estudio, se indica la importancia de *C. upsaliensis*, como un patógeno potencial en Estados Unidos, África y Australia (Bourke, Chan y Sherman, 1998; Lastovica y Le Roux, 1993; Lindblom, Sjögren, Hasson- Westerberg y Kaijser, 1995) debido a que se lo consideró como la segunda especie más probable de causar enfermedades en humanos.

En cuanto a las pruebas de identificación fenotípica de especie utilizando ácido nalidíxico y cefalotina, en este estudio podemos observar un 94,74 % y 31,58 % de resistencia hacia ambos antibióticos respectivamente. En 1985, Smith, Pinochet, Alegría Lazo y Freixes, identificaron a *C. jejuni* y *C. coli*, con una total sensibilidad al ácido nalidíxico en las 30

muestras analizadas y de igual manera una total resistencia a la cefalotina, debido a que *Campylobacter* spp. posee una resistencia intrínseca a la penicilina G y cefalosporinas (Lachance, Gaudreau, Lamothe y Larivière, 1991). Según Rivera (2011), las especies termófilas de *Campylobacter* spp. como *C. jejuni* y *C. coli* son resistentes a la cefalotina y sensibles al ácido nalidíxico. Fernández, Ochoa y Simaluiza (2016), indican una resistencia al ácido nalidíxico y variabilidad a la cefalotina. Sin embargo, en la presente investigación se obtuvo muestras de *C. coli* (68,42 %), *C. jejuni* (18,42 %) y *C. upsaliensis* (13,16 %) que resultaron ser resistentes a ambos antibióticos, lo que se observa en estudios de Notario et al. (2011), donde se obtuvo un 60 % de resistencia al ácido nalidíxico y cefalotina en aislados de gallinas, pollos y humanos. De igual manera, en estudios de Wiczorek, Wolkowicz y Osek (2018) se encontró una resistencia de 88,9 % hacia el ácido nalidíxico. Este aumento de la resistencia de este género bacteriano en la actualidad puede darse debido a mutaciones bacterianas (Winn, et al., 2013) generando resistencia cruzada entre quinolonas, incluyendo el ácido nalidíxico. Igualmente, la relación de un excesivo uso de enrofloxacina (una quinolona) en la producción avícola, utilizada para el tratamiento y profilaxis de microorganismos importantes en la avicultura (Griggs et al., 2005; Notario, 2011; Iovine, 2013). Lo que repercute en una baja especificidad para la identificación de especies con esta prueba (Rivera et al, 2011).

De las pruebas bioquímicas realizadas para la caracterización de *Campylobacter* spp., se obtuvo el total de 38 muestras positivas para catalasa y oxidasa (100 %), según Fernández y Torres (2015), Vasco (2015), es el resultado esperado en la identificación preliminar de *Campylobacter* spp. También, se realizó la prueba de hidrólisis de hipurato de sodio 1 % que ayudó a diferenciar la especie de *C. jejuni* de otras especies de *Campylobacter* (Farece y Viñas, 2007; Fernández, Ochoa y Simaluiza, 2016). Esta identificación fue corroborada mediante técnicas más específicas para confirmar especie, como la PCR (Yamazaki, et al,

2007), herramienta molecular empleada por su alto grado de sensibilidad y especificidad, así como por poseer un buen límite de detección (Moreno y Florez, 2010).

Posteriormente a la identificación de *Campylobacter* spp. mediante pruebas bioquímicas, el género fue confirmado mediante una PCR convencional en el que se evidenció bandas con un peso molecular de 816 pb que concuerda con estudios de Yamazaki (2007), Medina (2015), Toledo, Simaluiza, Astudillo y Fernández (2017) y Elmali y Can (2019). De igual manera se identificaron las especies de *C. jejuni* (con bandas de 161 pb), donde se obtuvieron 7 bandas que estuvieron acorde con el peso molecular de la cepa ATCC (Figura 8), que va a la par con las pruebas de hidrólisis del hipurato de sodio 1 % (Tabla 3). Para *C. coli* se detectaron bandas de 502 pb que presentaban los mismos pesos moleculares que la cepa ATCC utilizada como control positivo y cuyo peso molecular concuerda con estudios de Fernández, Ochoa y Simaluiza, (2016) y Poma, (2014). Por otro lado, se identificaron bandas de 86 pb, que coincide con el peso molecular reportado para *C. upsaliensis* (Fernández, Ochoa y Simaluiza, 2016; Raoult, et al., 2000; Fournier y Raoult, 2004), del que no se tiene estudios en el país. En esta PCR convencional no se incluyeron controles positivos debido a que en el momento en el que se realizó el estudio no se esperaba identificar esta especie.

En cuanto a las pruebas de sensibilidad antibiótica realizadas en la investigación, se obtuvieron 38 (100 %) cepas resistentes a la ciprofloxacina, antimicrobiano perteneciente al grupo de las quinolonas. Esto se observa de manera similar en estudios como los de Rivera (2011), Fernández y Pérez (2016), donde se obtuvieron cepas resistentes hacia la ciprofloxacina. Además, en este estudio se presentó un patrón de resistencia cruzada entre el ácido nalidíxico y la ciprofloxacina (Boonmar, 2007; Toledo, Simaluiza y Fernández, 2018). Este patrón de resistencia cruzada, se ha visto reportado en estudios de Iglesias (2018), donde se obtiene un 67,3 % de resistencia a la ciprofloxacina y al ácido nalidíxico, dos antimicrobianos distintos, que pertenecen a la familia de las quinolonas. Por otro lado,

Collado, et al. (2018), en Chile, aisló un 48 % de cepas resistentes a la ciprofloxacina e indicaron que esta resistencia puede darse por el uso de fluoroquinolonas en la producción animal. Este antibiótico es usado como agente terapéutico de primera y segunda línea para la profilaxis del animal (Cokal, Caner, Sen, Cetin y Karagenc, 2009).

Las cepas de *Campylobacter* spp. de origen humano y animal en los últimos años han generado resistencia a fármacos como: macrólidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas y penicilinas (Fernández, 2011; Collado, 2018; Sakaridis, 2019). Esto se evidenció en el presente estudio al obtener una resistencia del 100 % hacia la tetraciclina en las 38 aislados de *C. coli*, *C. jejuni* y *C. upsaliensis*.

Según estudios de Vinueza, et al. (2017), se mostraron tasas de resistencia antibiótica superior al 67 %. Es así, que para la tetraciclina se alcanzó un 83,3 % obteniendo un 67,6 % de resistencia para *C. jejuni*, y 15,7 % para *C. coli* y para ciprofloxacina una resistencia de 100 %. En cuanto a la eritromicina, se obtuvo una tasa de resistencia estadísticamente más alta para *C. coli* (25,9 %) en comparación con *C. jejuni* (4,2 %), indicando un patrón de resistencia a la eritromicina en ambas especies de *Campylobacter* (Flórez, 2018). Mientras que, en este estudio, *C. jejuni*, *C. coli* y *C. upsaliensis* presentaron resistencia del 100% en las 38 muestras frente a ciprofloxacina, eritromicina y tetraciclina. Con esto se evidencia un aumento potencial de la resistencia antibiótica, y a su vez se podría hablar de una multiresistencia adquirida por la bacteria, pues son más de dos antibióticos hacia los que se evidencia esta característica. Esto se describe en estudios como los Wang, et al., (2014), donde se indica la presencia de islas genómicas de multiresistencia en *Campylobacter* spp. Estas islas genómicas son secuencias de genes cromosomales que actúan como factor de virulencia, otorgando resistencia a los antibióticos (Cuadrado, 2017). Iglesias (2018), halla una multiresistencia hacia macrólidos, quinolonas y tetraciclinas. De igual manera, en

estudios de Flórez (2018), se registra resistencia a beta-lactámicos, macrólidos, aminoglucósidos y tetraciclinas.

Por otro lado, en ninguna de las tres especies de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. upsaliensis* estudiadas se encontró resistencia a ampicilina, como también se puede observar en los estudios de García-Migura, Hendriksen, Fraile y Aarestrup (2014) y Simaluiza, Toledo y Fernández, (2018). Lo que se contrasta con el estudio de García (2009), donde se encontró un 1,4 % de resistencia hacia este antibiótico. Sin embargo, se obtuvo un 93,2 % de sensibilidad, indicando que predomina este patrón de sensibilidad.

En el estudio de Döhne, et al. (2012), en Estados Unidos, Utah, *C. jejuni* y *C. coli* no presentaron resistencia hacia la ampicilina/sulbactam, al igual que en la presente investigación. Por otro lado, en el mismo estudio, se habló de un total de cepas sensibles a la gentamicina; esto contrasta con los resultados obtenidos pues se halló una resistencia de 18,42 % para *C. coli*, 15,79 %, en *C. jejuni* y un 5,26 % en *C. upsaliensis*. Sin embargo, en investigaciones como el de Pulgar (2016) en Chile, se encuentra un 10,9 % de resistencia hacia este antibiótico, datos que apoyan a los obtenidos en esta investigación, pues se obtuvo un total de 39,47 %, que demuestra un aumento de la resistencia en los últimos años. Esto puede darse por la administración de gentamicina como tratamiento hacia las enfermedades extra intestinales en animales de consumo como pollos, cerdos, etc (Qin et al., 2011). Esto coincide con datos obtenidos del uso de antimicrobianos en China (Yao, Liu, Wang, Zhang y Shen, 2017), donde se consume un total de 162 000 toneladas de antibióticos, de las que 83 200 toneladas van destinadas a animales de consumo como pollos de engorde.

## **CONCLUSIONES**

En este estudio se identificaron 3 especies de *Campylobacter*: *C. coli*, *C. jejuni* y *C. upsaliensis*, obtenidas a partir de muestras de ciegos, contenido cecal, hígados y mollejas de pollos de engorde. Se pudo determinar que existe una mayor prevalencia de *C. coli* en las muestras analizadas. En cuanto a la susceptibilidad antimicrobiana de *Campylobacter* spp., los hallazgos en este estudio indican una total resistencia a eritromicina, tetraciclina y ciprofloxacina, determinado una multiresistencia en las cepas aisladas. *C. upsaliensis* es una especie que no ha sido identificada hasta el momento en el Ecuador.

## **RECOMENDACIONES.**

- Continuar con los estudios sobre la resistencia antimicrobiana en *Campylobacter* spp.
- *Campylobacter* spp. es considerado, según la OMS, como un patógeno de prioridad elevada, de ahí la importancia de continuar con estudios que permitan obtener información que contribuya a un seguimiento epidemiológico referente al incremento de resistencia a los antibióticos de este género bacteriano.
- Para confirmar la presencia de la especie *C. upsaliensis*, identificado a través de la técnica de PCR convencional en la que no se utilizó control positivo, se recomienda realizar la secuenciación del ADN de estas cepas.
- Se sugiere no utilizar la prueba de identificación fenotípica de especie utilizando ácido nalidíxico y cefalotina debido al aumento de resistencia antimicrobiana.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, S. (2017). *Determinación de la prevalencia y la resistencia antimicrobiana de Campylobacter spp. en caninos de las parroquias urbanas de la ciudad de Quito*. (Tesis de grado). Universidad Central del Ecuador, Quito. Recuperado de: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/10150/1/T-UCE-0014-010-2017.pdf>
- Arellano, C. (2019). *Actualización con relación a la portación de Campylobacter spp. en animales domésticos en Chile*. (Tesis de grado). Universidad de Chile, Talca. Recuperado de: <http://dspace.utralca.cl/bitstream/1950/12079/5/20190142.pdf>
- Banco Central del Ecuador. (2018). *Boletín Estadístico*. Quito: Banco Central del Ecuador
- Bergey, H., y Holt, J. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Novena edición, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland. doi: 10.1007/b92997.
- Berghaus, R., Thayer, S., Law, B., Mild, R., Hofacre, C., y Singer, R. (2013). Enumeration *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in environmental farm samples and processing plant carcass rinses from commercial broiler chicken flocks. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(13), 4106-4114. doi:10.1128/AEM.00836-13
- Boonmar, S., et al. (2007). Serotypes, antimicrobial susceptibility, and gyr A gene mutation of *Campylobacter jejuni* isolates from humans and chickens in Thailand.

*Microbiology and immunology*, 51(5), 531-537. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2007.tb03941.x>

Boto, D. (2014). *Estudio de las poblaciones de Campylobacter jejuni y Campylobacter coli aisladas en etapas iniciales de la producción de pollo de engorde en España: relaciones con cepas de origen clínico*. (Tesis doctoral). Instituto de Salud Carlos III. Universidad Complutense de Madrid, Madrid. Recuperado de: <http://eprints.ucm.es/28810/1/T35868.pdf>

Bourke, B., Chan., L, Sherman P. (1998). *Campylobacter upsaliensis*: waiting in the wings. *Clin Microbiol Rev*; 11:440–9. 2.PMID: [9665977](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9665977/)

Cantero, J. (2018). *Campylobacter spp. en granjas de pollos de engorde: diversidad genética, resistencia antimicrobiana y factores de viruela*. (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona. Recuperado de: [https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2017/hdl\\_10803\\_457744/jgcp1de1.pdf](https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2017/hdl_10803_457744/jgcp1de1.pdf)

Collado, L., Muñoz, N., Porte, L., Ochoa, S., Varela, C., & Muñoz, I. (2018). Genetic diversity and clonal characteristics of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* isolated from Chilean patients with gastroenteritis. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 58, 290–293. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.12.026>

Cokal, Y., Caner, V., Sen, A., Cetin, C., y Karagenc, N. (2009). *Campylobacter spp. and their antimicrobial resistance patterns in poultry: An epidemiological survey study in Turkey*. *Zoonoses and public health*, 56(3), 105-110. Recuperado: <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01155.x>.

Chen, X., Naren, G., Wu, C., Wang, Y., Dai, L., Xia, L., Luo, P., Zhang, Q., y Shen, J. (2010). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates in

- broilers from China. *Veterinary Microbiology*, 144(1-2), 133-139. Recuperado de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113510000076>
- Chowdhury, N., Asakura, M., Shiramaru, S., Kikuchi, K., Hinenoya, A., Neogi, S. B., y Yamasaki, S. (2019). Comparison of established PCR assays for accurate identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Japanese journal of infectious diseases*, 72(2), 81-87. DOI: <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2018.340>
- Cuenca, J. (2015). Prevalencia de las especies termotolerantes de *Campylobacter* (*C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. coli*, *C. lari* y *C. upsaliensis*) en niños con y sin diarrea del Hospital Regional Isidro Ayora, durante el periodo Septiembre - diciembre. Recuperado de: <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/13505>
- Cuadrado, F. (2017). *Caracterización genómica y resistencias a antimicrobianos de campylobacter*. (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid. Recuperado de: <https://eprints.ucm.es/50005/1/T40609.pdf>
- Döhne, S., et al., (2012). Antibiotic susceptibility of *Salmonella*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter jejuni* isolated from northern German fattening pigs. *Journal of food protection*, 75(10), 1839-1845. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-051>
- EFSA. (2010). Analysis of baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU 2008, Part A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates. *Efsa Journal*, 8(03), 1503- 1603. doi: 10.2903/j.efsa.2010.1503
- EL Comercio. (5 de Julio de 2019). Obtenido de <https://www.elcomercio.com/actualidad/ecuador-consumo-pollo-carne-celebracion.html?fbclid=IwAR3sSNPyqzddfCNmz2jAG-cpXQWnn6phmQQgW0cZZZ9FoVmmCyBo-JSevmU>.

- Elmalı, Mehmet, y Can, Hayriye Yeşim. (2019). Antimicrobial susceptibility and virulence-associated genes in *Campylobacter* isolates from milk and wastewater in Hatay, Turkey. *Ciência Rural*, 49(5), e20180227. Epub April 18, 2019. Recuperado de: <https://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20180227>
- EUCAST, (2019). Clinical breakpoints - breakpoints and guidance. Recuperado de: [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)
- FAO y WHO. (2009). Risk assessment of *Campylobacter* spp. in broiler chickens: Technical Report. *Microbiological Risk Assessment*, 12, 1-132. ISSN: 1726-274
- Farece, M., y Viñas, M. (2007). Manual de Procedimientos Para el Aislamiento y Caracterización de *Campylobacter* spp. Departamento de Bacteriología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” Centro Regional de Referencia WHO. Global Salm Surv para América del Sur, 5-33.
- Fernández, H. (2011). *Campylobacter* y campylobacteriosis: una mirada desde América del Sur. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(1), 121-127. Recuperado de: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342011000100019](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342011000100019).
- Fernández, H., Ochoa, S., y Simaluiza, J. (2016). Bases Metodológicas para el Diagnóstico Bacteriológico de las Infecciones por *Campylobacter*. Recuperado de: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182016000400019](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182016000400019)
- Fernández, H., y Pérez-Pérez, G. (2016). *Campylobacter*: fluoroquinolone resistance in Latin- American countries. *Austral Journal of Veterinary Sciences*, 48(3), 255-259. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/5017/501752396001/501752396001.pdf>

- Fernández, H., y Torres, N. (30 de enero de 2015). *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en tres grupos de gallinas de diferente origen geográfico del sur de Chile. Recuperado el 22 de abril de 2018, de Archivos de medicina veterinaria: <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2000000200012>
- Fernández, H, Vera, F, y Villanueva, M P. (2007). Especies de *Arcobacter* y *Campylobacter* en aves y mamíferos del sur de Chile. *Archivos de medicina veterinaria*,39(2),163-165. DOI: <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2007000200011>
- Figuroa, A. (2018). Frecuencia de campilobacterias termotolerantes en carcasas y menudos de pollo, provenientes de los mercados de Juliaca. (Tesis de grado). Universidad Nacional del Altiplano, Puno-Perú. Recuperado de: [http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/7593/Figuroa\\_Mamani\\_Alan.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/7593/Figuroa_Mamani_Alan.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Flórez, D. (2018). *Caracterización genómica y resistencia a antimicrobianos de Campylobacter* (Disertación doctoral) Universidad Complutense de Madrid, Madrid. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/cittes?codigo=133516>
- Fournier, P. E., y Raoult, D. (2004). Suicide PCR on skin biopsy specimens for diagnosis of rickettsioses. *Journal of clinical microbiology*, 42(8), 3428-3434. DOI: 10.1128 / JCM.42.8.3428-3434.2004
- Gañán, M. (2009). Estudio de diferentes estrategias encaminadas a la disminución de la incidencia de *Campylobacter* spp. en la cadena alimentaria. (Tesis de grado). Universidad Autónoma de Madrid. Recuperado de: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/101564/1/incidencia%20de%20Campylobacter.pdf>

- García-Migura, L., Hendriksen, R. S., Fraile, L., y Aarestrup, F. M. (2014). Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: the missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, 170(1- 2),1-9. Recuperado de:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113514000480>.
- García, P., Valenzuela, N., Rodríguez, L., Victoria, M., León, E., & Fernández, H. (2009). Susceptibilidad antimicrobiana de *Campylobacter jejuni* aislado de coprocultivos en Santiago de Chile. *Revista chilena de infectología*, 26(6), 511-514. DOI:  
<http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182009000700004>
- Griggs, D. J., Johnson, M. M., Frost, J. A., Humphrey, T., Jørgensen, F., and Piddock, L. J. V. (2005). Incidence and mechanism of ciprofloxacin resistance in *Campylobacter* spp. isolated from commercial chicken flocks in the United Kingdom before, during, and after fluoroquinolone treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 699– 707. doi: 10.1128/AAC.49.2.699-707.2005
- Hernández, C., Aguilera, M., y Castro, G. (2013). *Campylobacter jejuni*: ¿una bacteria olvidada? situación en México. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología*, 33(2), 77-84. Recuperado de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2013/ei132f.pdf>
- Iglesias, Y. (2018). Estructura poblacional y mecanismos de resistencia a antibióticos en *Campylobacter jejuni* aislados de humanos y aves. (Tesis doctoral) Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona. Recuperado de:  
<https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/664012/yit1de1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. (2013). Base de datos de Salud. Recuperado de:  
<https://www.ecuadorencifras.gob.ec/la-epidemiologia-aguda-es-la-causa-de-mayor-morbilidad-en-ecuador/>
- Iovine, N. M. (2013). Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. *Virulence*, 4(3), 230– 40. <https://doi.org/10.4161/viru.23753>
- Jiménez Blasco, N. (2008). Caracterización del lipopolisacárido de "Aeromonas" mesófilas. (Tesis doctoral) Universitat de Barcelona, Barcelona. Recuperado de:  
<http://hdl.handle.net/2445/42404>
- Jiménez, G., Hoyos, Y., Rodríguez, J., Navarro, J. M., y Gutiérrez, J. (2016). Método rápido para la detección de la sensibilidad a cefotaxima en enterobacterias. *Revista argentina de microbiología*, 48(4), 320-324. DOI: 10.1016/j.ram.2016.08.002
- Jordán, C. (2014). Determinación de *Campylobacter* spp. en vísceras (hígado e intestino) de gallinas en un matadero de La Habana. Habana: Universidad de la Habana.
- Jurado, E. (2016). Estudio epidemiológico de patógenos zoonóticos (influenza aviar, flavivirus, *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp.) en cimbeles y rapaces de Andalucía. (Tesis doctoral). Universidad de Córdoba, España. Recuperado de:  
<https://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/14137/2016000001536.pdf?sequence=1>
- Kaakoush, N. O., Sodhi, N., Chenu, J. W., Cox, J. M., Riordan, S. M., y Mitchell, H. M. (2014). The interplay between *Campylobacter* and *Helicobacter* species and other gastrointestinal microbiota of commercial broiler chickens. *Gut pathogens*, 6(1), 18. DOI: <https://doi.org/10.1186/1757-4749-6-18>
- Karki, A. B., Marasini, D., Oakey, C. K., Mar, K., y Fakhr, M. K. (2018). *Campylobacter coli* from retail liver and meat products is more aerotolerant than *Campylobacter*

*jejuni*. *Frontiers in microbiology*, 9, 2951. Recuperado de:  
10.3389/fmicb.2018.02951

Kuana, S. L., Santos, L. R., Rodrigues, L. B., Borsoi, A., Moraes, H. L. S., Salle, C. T. P., y Nascimento, V. P. (2008). Occurrence and characterization of *Campylobacter* in the Brazilian production and processing of broilers. *Avian diseases*, 52(4), 680-684. <https://doi.org/10.1637/8296-032608-Reg.1>

Labarca, J., Sturgeon, J., Borenstein, L., Salem, N., Harvey, S., Lehnkering, E., Reporter, R., Mascola, L. (2002). *Campylobacter upsaliensis*: otro patógeno a considerar en los Estados Unidos. *Enfermedades infecciosas clínicas*, 34 (11), e59-e60. DOI: <https://doi.org/10.1086/340266>

Lachance, N., Gaudreau, C., Lamothe, F., Larivière, (1991). L. Role of the [3-lactamase of *Campylobacter jejuni* in resistance to [3-lactamase agents. *Antimicrob Agents Chemother*; 35: 813-18. DOI: 10.1128 / aac.35.5.813

Lastovica, A., Le Roux, E. (1993). Prevalence of *Campylobacter* spp. in the diarrhoeic stools and blood cultures of pediatric patients. In *VIIth International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms*. *Acta Gastro-Enterol. Belg* (Vol. 56, p. 34).

Lindblom, G., Sjögren, E., Hansson-Westerberg, J., Kaijser, B. (1995). *Campylobacter upsaliensis*, *C. sputorum sputorum* and *C. concisus* as common causes of diarrhoea in Swedish children. *Scand J Infect Dis*; 27: 187-8. DOI: 10.3109 / 0036554950901900

López, L y Mejía, C. (2012). Nota de métodos de extracción de ADN para detección de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos. *Revista MVZ Córdoba*, 17 (3),

3169-3175. [Fecha de consulta 11 de febrero de 2020]. ISSN: 0122-0268.

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=693/69325096011>

López, W. A., Ramírez, M., Mambuscay, L. A., y Osorio, E. (2010). Diversidad de levaduras asociadas a chichas tradicionales de Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(2), 176-186. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=776/77617808014>

Mardones, G., y López, J. (2017). *IMPLICATIONS OF Campylobacter spp. AS A FOODBORNE PATHOGEN*. Chillán, Chile.: Universidad de Concepción. Recuperado de: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/chjaasc/2017nahead/0719-3890-chjaasc-02005.pdf>

Medina Santana, J. L. (2015). Cuantificación de *Campylobacter* spp. en un matadero Semi-industrial de Aves, y posterior identificación de especies (*C. jejuni* y *C. coli*) mediante técnicas de Diagnóstico Molecular (Bachelor's thesis, Quito: UCE). Recuperado de: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6787/1/T-UCE-0014-042.pdf>

Ministerio de Salud Pública del Ecuador. Enfermedades transmitidas por agua y alimentos. Gaceta Epidemiológica 2017. SE-23: 9-12. Disponible en: <http://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2013/02/Gaceta-GeneralSE-23.pdf>

Montero, M., Vayas, L., Avilés, D., Pazmiño, P., y Erazo, V. (2018). Evaluación de dos métodos para medir la sensibilidad de inhibición de crecimiento de la cepa certificada de *Staphylococcus aureus* subsp. aureus. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(4), 1543-1547. DOI: <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i4.15185>

Moreno, N., Florez, P. (2010). APLICACIÓN DE LAS PRUEBAS DE PCR CONVENCIONAL SIMPLE Y MÚLTIPLE PARA LA IDENTIFICACIÓN DE

AISLAMIENTOS DE *Leptospira* spp. EN COLOMBIA. Página de Internet:  
<https://www.scielosp.org/pdf/rpmesp/2010.v27n4/548-556/es>

Natsos, G., Koutoulis, K. C., Sossidou, E., Chemaly, M., y Mouttotou, N. K. (2016).  
*Campylobacter* spp. infection in humans and poultry. *Journal of the Hellenic  
Veterinary Medical Society*, 67(2), 65-82. Recuperado de:  
[https://ejournals.epublishing.ekt.gr/index.php/jhvms/article/view/15624/0/EndNot  
eCitationPlugin](https://ejournals.epublishing.ekt.gr/index.php/jhvms/article/view/15624/0/EndNoteCitationPlugin)

Notario, R., Borda, N., Gambande, T., Bermejo, J., Ponessa, A., y Toledo, V. (2011).  
CEPAS DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* RESISTENTES A QUINOLONAS  
AISLADAS DE HUMANOS, GALLINAS Y POLLOS. *MeDicina (Buenos Aires)*,  
71(4). Recuperado de: [http://www.medicinabuenosaires.com/revistas/vol71-  
11/4/vol.71\\_n4\\_p331\\_335.pdf](http://www.medicinabuenosaires.com/revistas/vol71-11/4/vol.71_n4_p331_335.pdf)

Ochoa, S., Simaluiza, R. J., Toledo, Z., y Fernández, H. (2016). Frequency and  
antimicrobial behaviour of thermophilic *Campylobacter* species isolated from  
Ecuadorian backyard chickens. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 48(3), 311-  
314. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/1730/173047612010.pdf>

Organización Internacional para la Estandarización. (2017). Microbiología de alimentos y  
alimentos para animales. Método horizontal para la detección y enumeración  
de *Campylobacter* spp. Recuperado el mayo de 2018, de:  
[https://translate.google.com.ec/translate?hl=es-419&sl=en&u=https://www.i  
so.org/standard/37091.html&prev=search](https://translate.google.com.ec/translate?hl=es-419&sl=en&u=https://www.iso.org/standard/37091.html&prev=search)

Organización Mundial de la Salud (OMS). (15 de diciembre de 2017).  
*Farmacorresistencia*. Recuperado el 24 de abril de 2018, de Uso de los  
antimicrobianos: <http://www.who.int/drugresistance/use/es/>

- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018) Página de internet:  
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>).
- Paguanquiza, J. (2016). Genotipificación del gen Flagelar A en *Campylobacter jejuni* provenientes de los procesos de faenamiento industrial de pollos broiler. Recuperado de: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/11620>.
- Pajaniappan, M., Hall, J., Cawthraw, S., Newell, D., Gaynor, E., Fields, J., Rathbun, K., Agee, W., Burns, C., Hall, S., Kelly, D., Thompson, S. (2008). A temperature-regulated *Campylobacter jejuni* gluconate dehydrogenase is involved in respiration-dependent energy conservation and chicken colonization. *Molecular microbiology*, 68(2), 474–491. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06161.x
- Panzenhagen, P., et al., (2016). Prevalence and fluoroquinolones resistance of *Campylobacter* and *Salmonella* isolates from poultry carcasses in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Control*, 61, 243-247. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.002>
- Patton, CM, Shaffer, N., Edmonds, P., Barrett, TJ, Lambert, MA, Baker, C., ... Brenner, DJ (1989). Enfermedad humana asociada con "*Campylobacter upsaliensis*" (especies de *Campylobacter* negativas a catalasa o débilmente positivas) en los Estados Unidos. *Revista de microbiología clínica*, 27 (1), 66-73. Recuperado de: <https://jcm.asm.org/content/27/1/66.short>
- Picazo, J. (2016). Procedimientos en Microbiología Clínica. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Recuperado de: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia14.pdf>
- Poma, V. (2014). Aislamiento Y Tipificación Molecular de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en Contenido Cecal de Pollos Faenados en Camales

Industriales en la Provincia de Pichincha. *Universidad Central del Ecuador, Ecuador*. Recuperado de: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/6610>

Portillo, J. (10 de noviembre de 2017). *Campylobacter spp.* en granjas de pollos de engorde: diversidad genética, resistencia antimicrobiana y factores de virulencia. (U. A. Barcelona, Barcelona) Recuperado el 22 de 2018, de <http://www.tdx.cat/handle/10803/457744>.

Powell, L., Lawes, J., Clifton-Hadley, F., Rodgers, J., Harris, K., Evans, S., y Vidal, A. (2012). The prevalence of *Campylobacter spp.* in broiler flocks and on broiler carcasses, and the risks associated with highly contaminated carcasses. *Epidemiology and Infection*, 140(12), 2233-2246. Recuperado de <http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=8729878&fileId=S0950268812000040>

Pulgar Cáceres, D. E. (2016). Determinación de la sensibilidad antimicrobiana en cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas de bovinos de carne y cerdos. Recuperado de: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/140660/Determinacion-de-la-sensibilidad-antimicrobiana-en-cepas-de-Campylobacter-jejuni-y-Campylobacter-coli-aisladas-de-bovinos-de-carne-y-cerdos.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Qin, SS., Wu, CM., Wang, Y., Jeon, B., Shen, SQ., Wang, Y., Zhang, Q, Shen, J. 2011. Antimicrobial resistance in *Campylobacter coli* isolated from pigs in two provinces of China. *Int. J. Food Microbiol.* 146(1):94-98. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.035>

Raoult, D., Aboudharam, G., Crubézy, E., Larrouy, G., Ludes, B., y Drancourt, M. (2000). Molecular identification by “suicide PCR” of *Yersinia pestis* as the agent of

- medieval black death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(23), 12800-12803. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.220225197>
- Rawat, N., Maansi, D. K., y Upadhyay, A. K. (2018). Virulence typing and antibiotic susceptibility profiling of thermophilic *Campylobacters* isolated from poultry, animal, and human species. *Veterinary world*, 11(12), 1698. doi: 10.14202 / vetworld.2018.1698-1705
- Rivera, N., et al. (2011). Genotipificación y resistencia antibacteriana de cepas de *Campylobacter* spp aisladas en niños y en aves de corral. *Rev. chil. infectol.* vol.28, n.6, pp.555-562. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182011000700008>.
- Rodicio, R., Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Recuperado de: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-identificacion-bacteriana-mediante-secuenciacion-del-13059055>
- Rodríguez., J. Canton., R, Garcia., J. Gomez., L. Martinez., L, Avial., C. y Vila., J. (2000). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Recuperado de: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>
- Rojas, X., Rojas, Y., Soto, L., Delgado, D., Hernández, F. (1996). *Campylobacter* sp. en pollos para el consumo humano. *Rev. Cost de Ciencias Médicas*, 17, 34-39. Recuperado de: <https://pdfs.semanticscholar.org/c02c/d530e218da6eb94486ba4808a24f1dd636da.pdf>

- Rossi, M. A. (2017). Campilobacteriosis asociada al consumo de alimentos: impacto en la salud pública. Recuperado de: <http://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/handle/123456789/1474>
- Ruiz, M. U. (2015). Detección y Caracterización de " *Campylobacter*" procedentes de animales, alimentos y agua residual (Doctoral dissertation) Universidad Complutense de Madrid, España. Recuperado de: <https://www.visavet.es/data/tesis/deteccion-caracterizacion-campylobacter-procedentes-animales-alimentos-agua-residual.pdf>
- Sakaridis, I., Papadopoulou, T., Boukouvala, E., Ekateriniadou, L., Samouris, G., y Zdragas, A. (2019). Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Molecular Typing of Thermophilic *Campylobacter* Spp. in a Greek Poultry Slaughterhouse. *Acta Veterinaria*, 69(3), 325-339. DOI: <https://doi.org/10.2478/acve-2019-0027>
- Sallam, K. I. (2007). Prevalence of *Campylobacter* in chicken and chicken by-products retailed in Sapporo area, Hokkaido, Japan. *Food Control*, 18(9), 1113-1120. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.07.005>
- Simaluiza, R., Toledo, Z., Fernández, H. (2018). Prevalencia y caracterización del perfil de susceptibilidad antimicrobiana de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en niños con diarrea de la ciudad de Loja, Ecuador. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182018000200213>
- Simaluiza., R, Toledo, Z. Ochoa., S. Fernández., H. (2015). Resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken livers used for human consumption in Ecuador. *J Anim Vet Adv* 14, 6-9

- Smith, P., Pinochet, L., Alegría, G., Lazo, J., Freixes, C. (1985). Presencia de *Campylobacter jejuni* en aves de corral y sus manipuladores. *Biomédica*, 5(3-4), 78-85. Recuperado de <https://boletinjidh.uchile.cl/index.php/ACV/article/view/4440/10710>
- Taraco, Seija, y Vignoli. (2016). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Montevideo: Instituto de la Higiene. Universidad de la República. Recuperado de: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>
- Toledo, Z., Simaluiza, R. J., Astudillo, X., y Fernández, H. (2017). Occurrence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* species isolated from healthy children attending municipal care centers in Southern Ecuador. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 59, e77. doi:10.1590/S1678-9946201759077
- Toledo, Z., Simaluiza, R., y Fernández, H. (2018). Occurrence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from domestic animals from Southern Ecuador. Recuperado de: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782018001100450](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782018001100450)
- Urdaneta, S. (2016). Epidemiología de *Campylobacter spp.* en granjas de pollos de engorde: prevalencia, factores de riesgo y dinámica de infección. (Tesis de grado). Universidad Autónoma de Barcelona. Recuperado de: <https://ddd.uab.cat/record/175837>
- Vasco, K. (2015). Zoonotic transmission of *Campylobacter jejuni* and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) in peri-urban Quito, Ecuador (Tesis de Masterado) Quito: USFQ. Recuperado de: <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/5650>

- Velilla, A., Terzolo, H., y Méndez, M. (2011). *Campylobacter coli* y *C. jejuni* aislados de pollos de engorde en Argentina. (Engormix, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). Recuperado de <http://www.engormix.com/MAavicultura/sanidad/articulos/Campylobacter-colit3504/165-p0.htm>
- Vinueza Burgos, C. V. (2017). *Salmonella and Campylobacter* in broilers at slaughter age: a possible source for carcasses contamination in Ecuador. Ghent University. Faculty of Veterinary Medicine, Merelbeke, Belgium. Recuperado de: <https://pdfs.semanticscholar.org/7f58/9025f8dbd75a1ad803b68d1bf8a932d6c8d9.pdf>
- Vinueza, C., Wautier, M., Martiny, D., Cisneros, M., Damme, V., y Zutter, L. (2017). Prevalence, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in Ecuadorian broilers at slaughter age. Recuperado de: <https://doi.org/10.3382/ps/pew487>.
- Wang, Y., Zhang, M., Deng, F., Shen, Z., Wu, C., Zhang, J., Zhang, Q. y Shen, J. (2014). Aparición de aislados de especies de *Campylobacter* resistentes a múltiples fármacos con una metilasa de rRNA adquirida horizontalmente. *Agentes antimicrobianos y quimioterapia*, 58 (9), 5405-5412. Recuperado de: doi: 10.1128/AAC.03039-14
- Wieczorek, K y Osek, J. (2013). Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*. *BioMed Research International*, 2013, 340605. <https://doi.org/10.1155/2013/340605>
- Wieczorek, K., Wołkowicz, T., y Osek, J. (2018). Antimicrobial resistance and virulence-associated traits of *Campylobacter jejuni* isolated from poultry food chain and

humans with diarrhea. *Frontiers in microbiology*, 9, 1508. doi: 10.3389 /  
fmicb.2018.01508

Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., y Woods,  
G. (2013). *Koneman Diagnóstico microbiológico* (6ta ed.). 376-378 México:  
Editorial Médica Panamericana. ISBN: 978-607-7743- 80-4. Recuperado de:  
[http://www.sidalc.net/cgi-  
bin/wxis.exe/?IsisScript=UCC.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresi  
on=mf=077975](http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=UCC.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mf=077975)

Yamazaki-Matsune, W., Taguchi, M., Seto, K., Kawahara, R., Kawatsu, K., Kumeda, Y., ...  
y Tsukamoto, T. (2007). Development of a multiplex PCR assay for  
identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter*  
*hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*  
and *Campylobacter upsaliensis*. *Journal of Medical Microbiology*, 56(11), 1467-  
1473. Recuperado de:  
[https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.4736  
3-0](https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.47363-0).

Yao,H., Liu,D., Wang, Y., Zhang, Q., y Shen, Z. (2017). High Prevalence and  
Predominance of the *aph(2'')-Ib* Gene Conferring Aminoglycoside Resistance in  
*Campylobacter*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 61:112-17. DOI: 10.1128 /  
AAC.00112-17.