



UNAP



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TESIS

**“SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA EN CEPAS DE
CAMPYLOBACTER TERMOTOLERANTES AISLADAS DE POLLOS DE
GRANJA Y DE VIDA LIBRE, IQUITOS 2019”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO**

PRESENTANDO POR:

**TACKESHY NAHOTO PINEDO VÁSQUEZ
MANUEL AUGUSTO CASIQUE SALAS**

ASESOR:

Blgo. FREDDY ORLANDO ESPINOZA CAMPOS, Mgr.

IQUITOS, PERÚ

2020

ACTA DE SUSTENTACIÓN



UNAP

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS N° 012-CGT-UNAP-2020

En la ciudad de Iquitos, Departamento de Loreto, mediante plataforma virtual, a los 20 días del mes de agosto de 2020, a horas 17:30, se dio inicio a la sustentación pública de la Tesis titulada: “**SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA EN CEPAS DE *Campylobacter* TERMOTOLERANTES AISLADAS DE POLLOS DE GRANJA Y DE VIDA LIBRE, IQUITOS 2019**”, presentado por los Bachilleres **TACKESHY NAHOTO PINEDO VÁSQUEZ** y **MANUEL AUGUSTO CASIQUE SALAS**, autorizada mediante **RESOLUCIÓN DECANAL N°114-2020-FCB-UNAP**, para optar el Título Profesional de **BIÓLOGOS**, que otorga UNAP de acuerdo a Ley 30220, su Estatuto y el Reglamento de Grados y Títulos vigente.

El Jurado Calificador y dictaminador designado mediante **RESOLUCIÓN DECANAL N° 067-2020-DEFPCB-FCB-UNAP** de fecha 11 de marzo de 2020, está integrado por:

- | | |
|---|--------------|
| - Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL ÁGUILA, Dr. | - Presidente |
| - Blga. MARÍA ELENA BENDAYÁN ACOSTA, MSc. | - Miembro |
| - Blgo. PEDRO MARCELINO ADRIANZÉN JULCA, MSc. | - Miembro |

Luego de haber escuchado con atención y formulado las preguntas, las cuales fueron respondidas:

SATISFACTORIAMENTE

El jurado después de las deliberaciones correspondientes, llegó a las siguientes conclusiones:

La sustentación pública y la Tesis ha sido APROBADO con la calificación de EXCELENTE, estando los Bachilleres aptos para obtener el Título Profesional de **BIÓLOGOS**.

Siendo las 19:38 se dio por terminado el acto de sustentación.

Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL ÁGUILA
Presidente

Blga. MARÍA ELENA BENDAYÁN ACOSTA, MSc.
Miembro

Blgo. PEDRO MARCELINO ADRIANZÉN JULCA, MSc.
Miembro

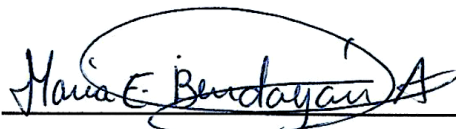
Blgo. FREDDY ORLANDO ESPINOZA CAMPOS, Mgr.
Asesor

JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR



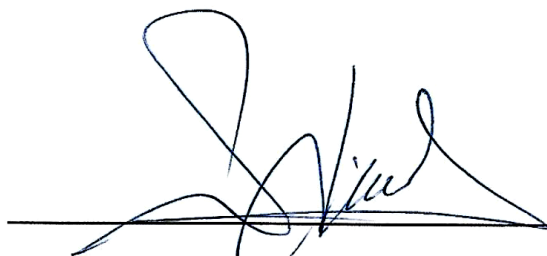
Blgo. Jorge Marapara Del Águila, Dr.

PRESIDENTE



Blga. María Elena Bendayán Acosta, MSc.

MIEMBRO



Blgo. Pedro Marcelino Adrianzén Julca, MSc.

MIEMBRO

ASESOR



Blgo. Freddy Orlando Espinoza Campos, Mgr.

DEDICATORIA

A Dios, a mi mamá Rosa Vásquez y a mi papá Wilder Pinedo, a mis abuelas y abuelos: Petronila LLiuya, Lelis Vásquez, Victoria Bentos y Joaquín Pinedo, a grandes amistades: Lidia, Claudiane, Any Clicia, Clenilson y Ângelo Louis.

Tackeshy N. Pinedo Vásquez

A Dios quién supo guiarme por el buen camino, para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se me presentaban enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. De igual forma a mis padres Elba y Alfonso quienes por ellos soy lo que soy, brindándome valores, principios, carácter, empeño, perseverancia y el coraje para conseguir mis objetivos.

Manuel Augusto Casique Salas

AGRADECIMIENTO

A la Dra. Margaret Kosek, al Dr. Pablo Yori, a la Blga. Maribel Paredes y a la MVZ Francesca Schiaffino, quienes permitieron que la pesquisa sea viable y por la oportunidad de plasmar un sueño en este camino profesional.

Al Dr. Hermann Silva Delgado, por su amistad, paciencia, gentileza, dedicación y sabiduría.

A nuestros compañeros de laboratorio, Dixner Rengifo, Marvin Yalta y Paul García, por su constante atención y apoyo incondicional.

Al asesor Blgo. Freddy Orlando Espinoza Campos, docente e investigador de nuestra universidad, por el apoyo, la entereza al brindar sus consejos y experiencia al compartir sus conocimientos en la redacción de esta tesis.

A todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron en el desarrollo de la presente tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
PORTADA	i
ACTA DE SUSTENTACIÓN.....	ii
JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR.....	iii
ASESOR.....	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I: MARCO TEÓRICO	4
1.1 Antecedentes	4
1.2 Bases teóricas	21
1.2.1 Generalidades	21
1.2.2 Etiología	21
1.2.3 Epidemiología en aves	22
1.2.4 Factores de virulencia	23
1.2.5 Gen <i>ARNr 16S</i>	24
1.2.6 Gen <i>cadF</i>	25
1.2.7 Resistencia a los antibióticos	25

1.2.8	Genes de resistencia a los principales antibióticos empleados en humanos	27
1.2.9	Aislamiento de <i>Campylobacter</i> spp.	28
1.2.10	Identificación por características fenotípicas	29
1.2.11	Diagnóstico e identificación por pruebas moleculares	30
1.3	Definición de términos básicos	32
CAPITULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES		35
2.1	Formulación de la hipótesis	35
2.1.1	Hipótesis nula	35
2.1.2	Hipótesis alterna	35
2.2	Variables y su operacionalización	36
CAPITULO III: METODOLOGÍA		37
3.1	Tipo y diseño	37
3.2	Diseño muestral	37
3.2.1	Población universo	37
3.2.2	Población de estudio	37
3.2.3	Muestreo o selección de muestra	37
3.2.4	Criterios de selección	38
3.3	Procedimientos de recolección de datos	39
3.3.1	Aislamiento de las cepas de <i>Campylobacter</i> termotolerantes a partir de muestras fecales de pollos de granja y de vida libre	39
3.3.2	Identificación de las especies de <i>Campylobacter</i> termotolerantes mediante pruebas bioquímicas	42

3.3.3	Confirmación de las cepas de <i>Campylobacter</i> termotolerantes por PCR semi – cuantitativo(109)	44
3.3.4	Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas aisladas de <i>Campylobacter</i> termotolerantes	46
3.4	Procesamiento y análisis de los datos	49
3.4.1	Comparación de la susceptibilidad antimicrobiana	49
3.5	Aspectos éticos	51
CAPITULO IV: RESULTADOS		52
4.1	Aislamiento de las cepas de <i>Campylobacter</i> termotolerantes a partir de muestras fecales de pollos de granja y de vida libre	52
4.2	Identificación de las especies de <i>Campylobacter</i> termotolerantes mediante pruebas bioquímicas	54
4.3	Confirmación de las cepas de <i>Campylobacter</i> termotolerantes por PCR semi – cuantitativo	56
4.4	Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas aisladas de <i>Campylobacter</i> termotolerantes	57
4.5	Comparación de la susceptibilidad antimicrobiana	61
CAPITULO V: DISCUSIÓN.....		64
CAPITULO VI: CONCLUSIONES.....		78
CAPITULO VII: RECOMENDACIONES.....		80
CAPITULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN		81
ANEXOS.....		93

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla N° 1. Cepas de <i>Campylobacter</i> termotolerantes aisladas a partir de muestras fecales.	52
Tabla N° 2. Prueba de chi – cuadrado para las cepas aisladas de <i>Campylobacter</i> termotolerantes.	53
Tabla N° 3. Tipo de población de pollos asociado a la identificación de la especie de <i>Campylobacter</i> por prueba bioquímica.	54
Tabla N° 4. Prueba de chi – cuadrado para las especies de <i>Campylobacter</i> termotolerantes.	55
Tabla N° 5. Susceptibilidad antimicrobiana fenotípica de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> aislados de pollos de granja.	57
Tabla N° 6. Susceptibilidad antimicrobiana fenotípica de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> aislados de pollos de vida libre.	59
Tabla N° 7. Prueba de chi – cuadrado de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> de las cepas de granja y vida libre / 10 antibióticos	62

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura N° 1. Cepas de <i>Campylobacter</i> encontradas o no en muestras fecales de pollos.	52
Figura N° 2. Presencia de las especies de <i>Campylobacter</i> termotolerantes en relación al tipo de población.	54
Figura N° 3. Lectura control de los genes <i>16S</i> y <i>cadF</i> .	56
Figura N° 4. Lectura de las cepas aisladas de <i>Campylobacter</i> termotolerantes mostrando la presencia de los genes ADN ribosomal <i>16S</i> y <i>cadF</i> .	56
Figura N° 5. Susceptibilidad antimicrobiana cepas de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> de pollos de granja.	58
Figura N° 6. Susceptibilidad antimicrobiana cepas de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> de pollos de vida libre.	60

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pag.
Anexo N° 1. Ubicación geográfica de los puntos de muestreo y sede del laboratorio.	93
Anexo N° 2. Lugares de muestreo y tipo de poblaciones de pollos en el trabajo de investigación.	94
Anexo N° 3. Composición química del medio de transporte Cary – Blair.	95
Anexo N° 4. Composición química del medio selectivo sin sangre para <i>Campylobacter</i> modificado con suplemento CCDA.	95
Anexo N° 5. Características fenotípicas básicas de especies de <i>Campylobacter</i> .	96
Anexo N° 6. Lista de primers y sondas usadas para la detección de <i>Campylobacter</i> termotolerantes.	96
Anexo N° 7. Composición química del agar Müller – Hinton.	97
Anexo N° 8. Modelo de ubicación de los sensidiscos en el agar Mueller – Hinton.	98
Anexo N° 9. Discos de sensibilidad y patrones de susceptibilidad.	99
Anexo N° 10. Flujograma de procedimientos	100
Anexo N° 11. Ficha de encuesta de pollos de vida libre	101
Anexo N° 12. Ficha de resultados de laboratorio	102
Anexo N° 13. Ficha de registro de muestras ingresadas al laboratorio	103
Anexo N° 14. Resumen de procedimientos empleados.	104
Anexo N° 15. Registro de la susceptibilidad de <i>C. jejuni</i> de pollos de	

granja	105
Anexo N° 16. Registro de la susceptibilidad de <i>C. coli</i> de pollos de granja.	106
Anexo N° 17. Registro de la susceptibilidad de <i>C. jejuni</i> de pollos de vida libre.	107
Anexo N° 18. Registro de la susceptibilidad de <i>C. coli</i> de pollos de vida libre.	107
Anexo N° 19. Tabla de distribución de Chi – cuadrado X^2	108

RESUMEN

El uso irresponsable de antibióticos en el sector agrícola viene provocando la resistencia de *Campylobacter*, por tal motivo el objetivo de la investigación fue evaluar la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *Campylobacter* termotolerantes aisladas de pollos de granja y de pollos de vida libre de la ciudad de Iquitos. Se colectó, 200 muestras fecales (100 de granja y 100 de vida libre). Se utilizaron métodos de extracción de ADN, PCR (genes *16S* y *CadF*), pruebas bioquímicas (hidrolisis del hipurato y acetato de indoxil) y pruebas de susceptibilidad (eritromicina, azitromicina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, tetraciclina, trimetoprima–sulfametoxazol, gentamicina, amoxicilina + ácido clavulánico, imipenem, cloranfenicol). Se aislaron, 69 cepas de *Campylobacter* (41 en pollos de granja y 28 en pollos de vida libre). En pollos de granja, se observaron altos niveles de resistencia al ácido nalidíxico, ciprofloxacina, tetraciclina, trimetoprima–sulfametoxazol, eritromicina y azitromicina; y en pollos de vida libre, los índices de resistencia fueron altos para tetraciclina, trimetoprima–sulfametoxazol y ciprofloxacina. Asimismo, las cepas de *Campylobacter* spp. mostraron una alta sensibilidad a imipenem y cloranfenicol en ambas poblaciones, existiendo diferencias significativas ($p < 0,05$) en 6 antibióticos. Concluyendo que *Campylobacter* spp. fue más sensible a los antibióticos en los pollos de vida libre.

Palabras clave: Antibacterianos, *Campylobacter*, Pollos, Pruebas de sensibilidad microbiana.

ABSTRACT

The irresponsible use of antibiotics in the agricultural sector has been causing *Campylobacter* resistance. For this reason, the objective of the research was to evaluate the antimicrobial susceptibility of thermotolerant *Campylobacter* strains isolated from free-range chickens in the city of Iquitos. Two hundred fecal samples were collected (100 farm and 100 free-living). DNA extraction methods, PCR (16S and CadF genes), biochemical tests (hydrolysis of hippurate and indoxyl acetate) and susceptibility tests (erythromycin, azithromycin, nalidixic acid, ciprofloxacin, tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole, gentamicin, amoxicillin + clavulanic acid, imipenem, chloramphenicol) were used. Sixty-nine *Campylobacter* strains were isolated (41 in free-range chickens and 28 in free-living chickens). In free-living chickens, high levels of resistance to nalidixic acid, ciprofloxacin, tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole, erythromycin and azithromycin were observed; and in free-living chickens, resistance rates were high for tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole and ciprofloxacin. In addition, *Campylobacter* spp. strains showed high sensitivity to imipenem and chloramphenicol in both populations, with significant differences ($p < 0.05$) in five antibiotics. Concluding that *Campylobacter* spp. was more sensitive to antibiotics in free-living chickens.

Keywords: Anti-Bacterial Agents, *Campylobacter*, Chickens, Microbial Sensitivity Tests.

INTRODUCCIÓN

Campylobacter spp. es uno de los principales microorganismos causantes de gastroenteritis en los seres humanos en todo el mundo^(1,2), además de causar enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)^(3,4), como la enfermedad diarreica aguda (EDA)⁽⁵⁾. En Loreto, 54 190 casos de EDA acuosa y 5 319 de EDA disintérica se reportaron en el 2018⁽⁶⁾, considerando a ésta bacteria un importante patógeno en la salud pública⁽⁷⁾.

Las especies comúnmente aisladas en estos casos son *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) en un 90% y *Campylobacter. coli* (*C. coli*) en un 5% a 10%⁽⁸⁻¹⁰⁾, siendo uno de los patógenos de mayor prevalencia a nivel comunitario en niños⁽¹¹⁾, obteniendo una mayor frecuencia de aislamiento en menores de 5 años asociándolos con malnutrición y retraso en su crecimiento⁽¹²⁻¹⁴⁾. Cabe señalar que la muerte por campilobacteriosis es poco frecuente; sin embargo, durante la infección pueden presentarse ciertas complicaciones como bacteremia, hepatitis, pancreatitis hasta abortos y post-complicaciones, como la artritis reactiva y el síndrome de Guillain – Barré o su disparidad, el síndrome de Miller Fisher^(5,15-17).

Asimismo, *Campylobacter* forma parte de la microbiota de muchos animales, especialmente de aves comestibles, que al parecer no desarrollan enfermedad alguna, pero están asociadas principalmente a la transmisión al hombre⁽¹⁸⁻²⁰⁾. No obstante, se han encontrado evidencias de daño en la mucosa intestinal y cuadros de diarrea en algunas razas de pollos⁽²¹⁾. Cabe señalar, que el estado del tracto gastrointestinal juega un papel esencial en la salud del ave, que a través de la digestión y absorción de nutrientes, repercuten en la inmunidad y en el control de la diversidad bacteriana⁽²²⁾.

Actualmente la carne de pollo constituye el principal alimento para los peruanos. En la ciudad de Iquitos, a pesar de existir una oferta importante de pescado que proviene de los ríos y de las piscigranjas, los pobladores prefieren la carne de pollo, llegando a representar el 53% del total de carnes consumidas⁽²³⁾, siendo ésta el principal factor de riesgo a través del consumo de carne insuficientemente cocida y por contaminación cruzada^(1,20,24).

En relación a la producción de la carne de pollo, uno de los componentes que influyen en la mayor proporción de aves portadoras de *Campylobacter*, es la forma de crianza. Los pollos de “*traspatio*” o de vida libre, están asociados a elevados porcentajes de muestras positivas para esta bacteria y los pollos de “*avícola*” o granja, donde las condiciones higiénicas y sanitarias están controladas, la frecuencia de aves portadoras de *Campylobacter* es significativamente menor⁽²⁵⁾. No obstante, es necesario reconocer que la producción avícola moderna es intensiva, con gran aglomeración de ejemplares que favorece la introducción de la infección por estas bacterias, a pesar de las mejores condiciones sanitarias que se practican en las granjas^(26,27).

La introducción de los antibióticos en la medicina humana y veterinaria ha sido uno de los logros más importantes del siglo XX; se identificó que dicho uso no solo era terapéutico, sino que también promovía el crecimiento en animales sanos, pero tal práctica no ha sido regularizada ni controlada^(28,29), generando resistencia a fluoroquinolonas, macrólidos, tetraciclinas, entre otros^(18,19,21,23,26,30,31); y más recientemente colistina (Polimixina E)⁽³²⁾.

En el año 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó un listado de bacterias con alta resistencia a diferentes antibióticos, mencionando a *Campylobacter* como uno de los patógenos de alta prioridad debido a su progresiva y alarmante alta resistencia a fluoroquinolonas a nivel global⁽³³⁻³⁵⁾. Así mismo, la entidad sugirió no tratar una campilobacteriosis de manera empírica, en cambio se debe realizar previamente una prueba de susceptibilidad *in vitro*⁽³⁶⁾, ya que el incremento de la resistencia en reservorios animales puede conducir a fallos en el tratamiento de los cuadros diarreicos producidos por estos microorganismos en las poblaciones humanas⁽³⁷⁾.

Particularmente en la ciudad de Iquitos, no se realizan los diagnósticos para *Campylobacter*, conociendo que la dosis infectante es de 500 unidades formadoras de colonias (UFC)⁽³⁸⁾, se continúa empleando un tratamiento antimicrobiano empírico con eritromicina, azitromicina, ampicilina y ciprofloxacina, existiendo reportes de resistencia que complican su tratamiento⁽³⁹⁾. El objetivo de conocer la susceptibilidad antimicrobiana, es de vital importancia para garantizar una terapia antimicrobiana adecuada, así como el monitoreo eficaz de la sensibilidad y resistencia a los antibióticos en *Campylobacter* spp. a nivel mundial, conociendo estos patrones desde su reservorio animal, previo a la transmisión al hombre⁽¹⁸⁾. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *Campylobacter* termotolerantes aisladas de pollos de granja y de vida libre.

CAPITULO I: MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes

En 1995, una investigación experimental, transversal y retrospectivo, en 200 muestras fecales de pollos obtenidas mediante hisopado cloacal (100 de “*pollos no confinados*” o de vida libre y 100 de “*pollos confinados*” o de granja) de la ciudad de Iquitos y periferia (Loreto), se determinó una prevalencia de 44.5% de positividad a *Campylobacter* spp. (84 de 200 muestras fecales), siendo aislado en 54,0% en “*pollos no confinados*” y 35,0% en “*pollos confinados*”. Siendo *C. jejuni* la cepa de mayor aislamiento en ambas poblaciones (21,5%), seguida por *C. coli* (14,0%), la de menor aislamiento fue *Campylobacter lari* (*C. lari*) con 9,0%. De los cuales, se encontró para “*pollos no confinados*” en *C. jejuni* un 27,0%, *C. coli* 17,0% y *C. lari* 10,0%; mientras que, en “*pollos confinados*” en *C. jejuni* un 16,0%, *C. coli* 11,0% y *C. lari* 8,0%. Donde la alta frecuencia de aislamiento de *Campylobacter* spp. encontrada en pollos con o sin confinamiento, demuestra la importancia como reservorio y fuente principal de infección en humanos⁽⁴⁰⁾.

Entre el 2009 – 2016, en Santa Clara de Nanay (Loreto), se llevó a cabo un estudio experimental, de seguimiento a una cohorte de 303 pacientes, desde el nacimiento hasta los 5 años de edad. La investigación determinó los patrones fenotípicos de la resistencia a los antibióticos y la epidemiología de la especie *Campylobacter* spp. en un entorno de bajos recursos. Cultivaron muestras de heces de niños asintomáticos y de niños con diarrea para detectar la presencia de ésta bacteria, por el método de difusión en disco. Los resultados muestran que, de 917 cepas

aisladas, el 77,4% de cepas de *C. jejuni* y el 79,8% de cepas de *C. coli* eran resistentes a la ciprofloxacina, mientras que el 4,9% de las cepas de *C. jejuni* y el 24,8% de las cepas *C. coli* lo eran a la azitromicina. Reportando que existe una alta incidencia de *Campylobacter* resistente a quinolonas y macrólidos en menores de 60 meses de edad. Dado la falta de asociación entre la exposición personal a los macrólidos y una posterior infección por *Campylobacter* resistente a los mismos, se concluyó que era necesario evaluar la fuente de *Campylobacter* multirresistente (MDR)⁽¹²⁾.

En 2010, la European Food Safety Authority (EFSA) dio a conocer los resultados de una encuesta de referencia en toda la Unión Europea (UE), ejecutada en el 2008 sobre especies de *Campylobacter*. La población de estudio fueron lotes de “*pollos de engorde*” por tipo de producción (convencional, estándar, orgánicos de campo libre). Dando como resultado a los “*pollos de engorde*” de producción convencional, la proporción de aislamientos de *C. jejuni* en 64,0% sobre el total de aislamientos especializados, que fue mayor que *C. coli* con 36,0%. En el caso de los pollos de engorde de producción estándar y los orgánicos de campo libre, la distribución de aislamiento de *C. jejuni* y *C. coli* fueron aproximadamente iguales para ambas especies. Por lo tanto, parece que relativamente hubo mayor aislamiento de *C. coli* en bandadas de campo libre u orgánicas. Resaltando que la distribución de estas especies de *Campylobacter* en los lotes de “*pollos de engorde*” en toda la UE eran muy variable. En los países nórdicos (Noruega, Suecia, Finlandia y Estonia) sólo se aisló *C. jejuni*, mientras que en todos los demás países

también se detectó *C. coli*. En los Estados miembros del sur de la UE la presencia de *C. coli* fue más abundante y en algunos estados miembros, más de la mitad de los aislamientos pertenecían a esta especie⁽⁴¹⁾.

En 2012, en un estudio de tipo descriptivo retrospectivo se da referencia sobre la prevalencia de *Campylobacter* spp. en los grupos y canales de “*pollos de engorde*” en el Reino Unido en el 2008, en el cual se examinó el contenido cecal de cada lote de sacrificio seleccionado al azar, la piel del cuello y la pechuga de un solo canal para detectar la presencia de *Campylobacter* spp. La prevalencia del *Campylobacter* en el cecal de los lotes de “*pollos de engorde*” fue del 75,8%, frente al 87,3% en los canales. El estudio concluyó que existe una alta contaminación por *Campylobacter*⁽⁴²⁾.

En 2013, una investigación experimental, que incluyó una población de cepas de *Campylobacter* spp. aisladas de distintos orígenes, donde 40 cepas provienen de heces de pacientes humanos, 40 cepas aisladas de carnes de “*pollos broiler*” y 40 cepas aisladas de deyecciones de aves en Chile. La investigación determinó la susceptibilidad de estas cepas a los antibióticos: ciprofloxacina, tetraciclina, eritromicina y gentamicina. Utilizaron dos métodos, la técnica de Etest y la técnica de dilución en agar mediante la concentración mínima inhibitoria. El trabajo determinó que, en las 120 cepas estudiadas se encontraron 59 cepas resistentes a ciprofloxacina, 35 a tetraciclina, 20 a eritromicina y 4 a gentamicina; 41 de las cepas fueron multiresistentes. Manifestando que el incremento de los niveles de resistencia de *Campylobacter* spp. ameritaba el

establecimiento de sistemas de vigilancia para monitorizar dicha resistencia y resguardar la salud pública⁽⁴³⁾.

En el mismo año, se realizó un estudio de cohorte prospectivo para evaluar la prevalencia de *Salmonella* y *Campylobacter* spp. en una granja y en canales en la planta de procesamiento, cuyas muestras fueron recogidas de 55 bandadas de “*pollos de engorde*” en dicha granja en Georgia (EE.UU.), se recogieron muestras ambientales de los gallineros, durante las 48 horas anteriores al sacrificio, también se recogieron de los enjuagues de las canales en las aves de los mismos bandos en que se realizaron en 4 etapas diferentes del procesamiento. *Campylobacter*. se detectó en 35 muestras de la granja un (63,6%) y en 48 muestras de la planta de procesamiento un (87,3%) existiendo una relación positiva significativa entre ambas procedencias de las muestras, también se añade que las correlaciones entre las muestras recogidas de las mismas bandadas eran más altas para *Campylobacter* que para *Salmonella*. En conclusión, se demostró que el estado portador en los pollos es común, la contaminación del ambiente es frecuente y disminuye en el procesado industrial estudiado⁽⁴⁴⁾.

En el 2014, en un estudio experimental, se evaluó la resistencia antimicrobiana de las cepas de *Campylobacter* de “*pollos de engorde*” y pavos criados en granjas industriales en Italia. Se analizaron 32 cepas de *C. jejuni* y 24 de *C. coli* de “*pollos de engorde*” y 68 cepas de *C. jejuni* y 32 de *C. coli* de pavos. Se realizó la prueba de susceptibilidad a través de difusión de disco a apramicina, gentamicina, estreptomina, cefalotina, cefotaxima, ceftiofur, cefuroxima, ampicilina, amoxicilina +

ácido clavulánico, ácido nalidíxico, flumequina, enrofloxacin, ciprofloxacina, eritromicina, tilmicosina, tilosina, tiamulina, clindamicina, tetraciclina, trimetoprima – sulfametoxazol y cloranfenicol, utilizando los puntos de corte por el Comité de Antibióticos de la Sociedad Francesca de Microbiología (CASFM), Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, y las especificaciones del fabricante. Se registró multiresistencia en todas las cepas de pollos y en el 92% de pavo. Se detectó alta resistencia en quinolonas, tetraciclina y trimetoprima – sulfametoxazol entre un 65 – 100% en “*pollos de engorde*” y 74 – 96% en pavos; el 97% en pollos y 88% en pavo eran resistentes a ampicilina; entre el 93 – 100% en pollos y 100% en pavos eran resistentes a cefalosporinas. Ninguna cepa presentó resistencia a cloranfenicol y tiamulina. El predominio de la susceptibilidad fue para amoxicilina + ácido clavulánico y los aminoglicósidos en “*pollos de engorde*”; para los macrólidos y la clindamicina entre las cepas de pavo y *C. jejuni*, mientras que en *C. coli* el 87,5% eran resistentes de los “*pollos de engorde*”. Destacando además el predominio general de resistencia en *C. coli* comparado con *C. jejuni*⁽⁴⁵⁾.

En el mismo año, en Argelia, se evaluó la frecuencia de contaminación de *Campylobacter* termotolerante y se caracterizó la resistencia antimicrobiana de cepas aisladas de “*pollos de engorde*” de granjas y mataderos. Se analizaron 100 muestras fecales, 100 de contenido cecal y 100 pieles de cuello. Se determinó la susceptibilidad antimicrobiana a través de difusión de disco, utilizando las directrices del CASFM. Las cepas de *Campylobacter* termotolerante fueron aisladas en un 85% de

las muestras fecales, 98% de contenidos cecales y 80% de pieles de cuello; de las cuales todas presentaban resistencia a ácido nalidíxico y sensibilidad a gentamicina y cloranfenicol. El 83,7% de eran resistentes a tetraciclina y ciprofloxacina, 75,3% a ampicilina, 46,8% a amoxicilina + ácido clavulánico y el 21,7% eran resistentes a eritromicina. Todas las cepas mostraron multiresistencia. Manifestando el riesgo de la contaminación a los humanos en diversos niveles: intoxicación alimentaria en ingesta y productos de carne de pollo, y la resistencia cruzada a los antibióticos de origen humano y animal⁽⁴⁶⁾.

En el 2015, en un estudio experimental – retrospectivo, se colectaron 369 muestras entre el 2005 – 2010 para evaluar la prevalencia y susceptibilidad de *Campylobacter* spp. en la carne de pollos de crianza libre y de tipo convencional en Grecia. Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se realizaron por el método de difusión de disco de Kirby – Bauer al 0,5% de sangre lisada de caballo, establecido por el CLSI (2013). El estudio obtuvo una positividad de 28,7% en pollos de crianza libre y un 29,4% en crianza convencional, observándose tasas variables de resistencia a los antibióticos: Eritromicina (76,0%), tetraciclina (71,0%), ampicilina (66,0%), ciprofloxacina (51,0%), cefamendol (41,0%), cefoxitina (27,0%), amikacina (15,0%) y cefotaxima (5,0%). Concluyendo que no encontraron diferencias significativas en la susceptibilidad entre los tipos de crianza de pollos, que las mejores medidas de bioseguridad pueden disminuir la incidencia por *Campylobacter* y que las resistencias encontradas ameritan vigilancia

sobre el uso de los antibióticos en la producción de alimentos de origen animal⁽⁴⁷⁾.

En ese año, en Brasil, un estudio experimental con la finalidad de investigar la ocurrencia de *C. jejuni* y *C. coli* en pollos de crianza orgánica, y determinar su susceptibilidad a ciprofloxacina y enrofloxacina, en 80 muestras de contenido cecal; estas fueron confirmadas a través de microscopía, pruebas bioquímicas (catalasa y oxidasa) y molecular (PCR) con los genes *pg3* (*C. jejuni* o *C. coli*), *pg50* (flagelina) y *C-1/C-4* (región específica de *C. jejuni*), la resistencia antimicrobiana evaluada mediante el método de difusión de disco y la dilución en agar. Siendo aisladas el 100% de las muestras, identificando un 68,7% de *C. jejuni* y 31,2% de *C. coli*. Encontrando resistencia en 100% y 56,3% de las cepas a ciprofloxacina y enrofloxacina; además, 18,8% de las cepas fueron sensibles a enrofloxacina ($\leq 1\mu\text{g/mL}$), 38,7% intermedio ($2\mu\text{g/mL}$) y 42,5% fueron resistentes ($\geq 4\mu\text{g/mL}$). El alto uso de estos antibióticos evidenciado a través del CIM muestra la alta frecuencia de resistencia en las cepas de *Campylobacter*, mencionado además la persistencia en la producción de pollos relacionado a las cepas resistentes a fluoroquinolonas⁽⁴⁸⁾.

Tal es el caso, que en una investigación experimental en el mismo país. Se examinó y analizó características genéticas de la resistencia en *Campylobacter* spp. de origen avícola. En un total de 141 cepas aisladas de “pollos de engorde” de mataderos, a través de técnicas fenotípicas y genotípicas. Dichas cepas fueron evaluadas mediante susceptibilidad antimicrobiana de dos antibióticos (ampicilina y tetraciclina) y la

detección de los genes de resistencia (*bla*^{OXA-61}, *tet(O)* y *cmeB*). Siendo *C. jejuni* la especie más dominante (99,3%) y *C. coli* (0,70%). Además, mostraron 65% y 35,5% de las cepas de *Campylobacter* eran resistentes a β – lactámicos y tetraciclinas, el 18,5% de las cepas mostraron ser resistentes a varios fármacos (*cmeB*). Se encontró resistencia a dos genes diferentes a los antibióticos (β – lactámicos y tetraciclinas) en el 25,6% de las cepas. Destacando la implementación de sistemas de vigilancia, monitoreo y análisis de riesgo de la resistencia de *Campylobacter* en las “aves de corral” y otros animales⁽⁴⁹⁾.

En 2016, un estudio de tipo experimental incluyó como población de estudio a “pollos de traspatio” en el sur de Ecuador, para evaluar la prevalencia y el comportamiento antimicrobiano de cepas de *C. jejuni/coli* aisladas de esa población. Este estudio revela que la frecuencia de aislamiento de *Campylobacter* spp. fue de 41,7%, observándose una alta tasa de resistencia a la tetraciclina (94,0%) y a la ciprofloxacina (88,0%). La especie *C. jejuni* fue la especie más frecuente (32,5%), seguida de *C. coli* (9,2%). El estudio concluyó que *Campylobacter* es común en este contexto epidemiológico. Y que la multidrogorresistencia es más frecuente en *C. coli* que en *C. jejuni*. Mientras que la resistencia a la ampicilina puede ser un problema emergente que podría requerir el establecimiento de un laboratorio programa de vigilancia para evaluar su verdadera importancia⁽⁵⁰⁾.

En el mismo año, en Chile, se evaluó la susceptibilidad antimicrobiana en 120 cepas de *Campylobacter* spp. de cerdo y 60 de bovinos en carne, a través de la técnica de Kirby Bauer y E–test en ciprofloxacina,

tetraciclina, eritromicina y gentamicina. Encontrando resistencia en todas las cepas analizadas en la primera técnica, a través de CMI el 10,5% fueron resistentes a gentamicina, 57,9% a eritromicina, 82,6% a ciprofloxacina y 91,4% a tetraciclina a través de la segunda; siendo clasificadas como multiresistentes al 87,1% de todas. Indicando que la resistencia de *Campylobacter* spp. a los antibióticos presenta mayor destaque en ciprofloxacina y tetraciclina, siendo necesario proponer y establecer un enfoque integral entre medicina veterinaria, humana y en producción de alimentos para la vigilancia de la resistencia⁽⁵¹⁾.

Sin embargo, en un estudio de corte, en México, se determinó la susceptibilidad a la rifaximina y otros antibióticos de bacterias enteropatógenas aisladas de pacientes con gastroenteritis aguda. A través de 1000 muestras de heces, se aislaron las cepas bacterianas y fueron analizadas su susceptibilidad a la rifaximina por dilución simétrica (<100, <200, <400 y <800 µg/ml) y a cloranfenicol, trimetoprima – sulfametoxazol, neomicina, furazolidona, fosfomicina, ampicilina y ciprofloxacina, a través de difusión en agar a concentraciones estandarizadas; en los cuales, *Campylobacter* a dilución simétricas a rifaximina presentó susceptibilidad de 70,0% (<100 µg/ml) y 30,0% (<200µg/ml) y en difusión en agar presentó susceptibilidad del 80,0% a fosfomicina, 95,0% a cloranfenicol y 100% a furazolidona y neomicina; además de presentar una resistencia del 55% a ampicilina, 70% a ciprofloxacina y trimetoprima – sulfametoxazol. Además de encontrar diferentes niveles de susceptibilidad y resistencia en las otras bacterias. Haciendo mención en la importancia de seleccionar y diseminar de la

resistencia presente en las diferentes bacterias, las cuales pueden complicar el tratamiento por gastroenteritis⁽⁵²⁾.

En 2017, se realizó un estudio experimental; en donde incluyeron una población de estudio a 150 pollos distribuidos en 5 lotes, que pertenecían a establecimientos de producción para uso comestible en Buenos Aires, Argentina. La investigación demostró que los patrones de resistencia en cepas de *C. jejuni*, aislados de los ciegos de pollos, utilizaron el método de dilución y como criterios de interpretación el punto de corte de acuerdo con los datos del CLSI y del European Committee on Antimicrobial Susceptibility (EUCAST). La investigación dio como resultado una sensibilidad reducida de acuerdo a los porcentajes de cepas resistentes encontradas: ácido nalidíxico (63,0%), ciprofloxacina (66,0%), eritromicina (38,0%), tetraciclina (13,0%) y gentamicina (8,0%); además, identificaron cepas resistentes a dos o más clases de antimicrobianos utilizados en el estudio. El estudio concluyó la importante disminución en la sensibilidad antimicrobiana de *C. jejuni* a las diferentes clases de antibióticos, confirmando así la necesidad de implantar programas de monitoreo y vigilancia en las aves para consumo⁽⁵³⁾.

En el mismo año, en Túnez con el objetivo de conocer la prevalencia de *Campylobacter* en 590 muestras cloacales de “*pollos de engorde*”, criados en producción intensiva y la susceptibilidad antimicrobiana frente a 8 antibióticos. Las cepas fueron aisladas en caldo Bolton y recultivadas en agar Karmali en condiciones de microaerofilia, identificadas por PCR a través de los genes *16S ARNr* (género *Campylobacter*), *mapA* (*C.*

jejuni) y *ceuE* (*C. coli*). Reportaron un total de 22,4% de prevalencia de aislamiento y en cuanto a la susceptibilidad, todos los aislados eran resistentes a la tetraciclina y la eritromicina; observaron una alta resistencia contra ciprofloxacina (99,2%) y cloranfenicol (88,6%); en menor resistencia a ampicilina (61,4%), amoxicilina + ácido clavulánico (47,0%) y ácido nalidíxico (46,2%). Concluyeron que la aplicación de procedimientos de controles específicos de vigilancia enfocados en la salud, sea de carácter obligatorio frente a las altas tasas de resistencia y a la aparición de cepas de *Campylobacter* multiresistentes a varios antibióticos, con el fin de prevenir la aparición y su propagación⁽⁵⁴⁾.

En otro estudio, en Chile, con el fin de caracterizar la susceptibilidad antimicrobiana y los factores de virulencia en cepas de *C. jejuni* obtenidas desde carne de pollo y heces de “aves de corral”. En 30 muestras de carne y 40 de heces, siendo aisladas 30 cepas a través de medios selectivos (agar mCCDA y tripticasa de soya con sangre de cordero al 5%), siendo confirmadas por morfología microscópica, hidrólisis del hipurato (*C. jejuni*) y caracterizadas mediante la detección del gen 16S por PCR; la prueba de susceptibilidad se realizó mediante dilución en agar y E-test. Encontrando un 63,3% en las muestras de carne y un 20% en heces de *C. jejuni*. El 27,0% de las cepas de carne presentaron resistencia a todos los antibióticos menos a azitromicina, a diferencia de las heces que presentaron una mayor diversidad en resistencia; encontrándose en el 10% de estas 14 de 16 genes estudiadas, así como el 23% no presentó ningún gen de virulencia. El alto porcentaje de *C. jejuni* encontrado en estas muestras, demuestra la

alta diversidad genética y fenotípica representada en los perfiles de resistencia y factores de virulencia⁽⁵⁵⁾.

Sin embargo, en Valencia, en un estudio experimental, se analizó la resistencia de ocho antibióticos de uso clínico en cepas aisladas de *Campylobacter* en explotaciones avícolas, a través de antibiogramas a nivel fenotípico y PCR a nivel molecular de los genes de resistencia β -lactámicos (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CMY-2}), tetraciclinas (*TET(A)*, *TET(B)* y *TET(C)*), eritromicina (*ermB*) y quinolonas (*qnrS*). Se encontró una resistencia antimicrobiana del 100%. Además, se observó cepas multiresistentes de *C. coli* en los cuales ciprofloxacina y ácido nalidíxico obtuvieron el patrón más destacable con 35,7% y de *C. jejuni*, donde amoxicilina + ácido clavulánico, ampicilina, ciprofloxacina, ácido nalidíxico y tetraciclina registraron el patrón fue 27,5%, seguido de ampicilina, ciprofloxacina, ácido nalidíxico y tetraciclina con 20%. Los genes de resistencia fueron identificados en el 80% de las cepas estudiadas, mostrando resistencia en más de un antibiótico, el mayor patrón fue β – lactámicos – quinolonas – tetraciclinas. Determinando que la expresión fenotípica genética no depende directamente de un gen, siendo necesario estudiar la combinación de los métodos fenotípicos y moleculares⁽⁵⁶⁾.

Además, en Japón, en un estudio descriptivo experimental, se da referencia de los aspectos moleculares de genes de resistencia en cepas aisladas de *C. jejuni* en humanos y en pollos de consumo. En la cual 79 cepas fueron de pollos y 106 a humanos, estas fueron enriquecidas con medio agar cefoperazona de carbón modificado con desoxicolato en

microaerofilia a 42°C. Utilizaron la microdilución de caldo en CMI como pruebas de susceptibilidad a los antibióticos: ampicilina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, imipenem, ciprofloxacina y ácido nalidíxico verificados. Los ADN utilizados para la secuenciación del genoma completo fueron extraídos de las bacterias cultivadas, secuenciando el genoma para su análisis de portación de genes de resistencia. El trabajo determinó que ninguno de los aislamientos mostró resistencia al imipenem, cloranfenicol y eritromicina. Pocos de los aislados fueron resistente a ampicilina y estreptomicina, mientras que varios mostraron resistencia a tetraciclina, ciprofloxacina y ácido nalidíxico. Manifestando que los genes de resistencia de las cepas de *C. jejuni* en humanos también se encontraron en pollos, manifestando clones en común y que la transmisión directa se daría por consumo de “aves de corral” pocos cocidos⁽⁵⁷⁾.

Mientras que, en Ecuador, en un estudio experimental se determinó la susceptibilidad a antibióticos en bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y *Campylobacter*. Siendo analizadas 72 muestras de “pollos faenados”, mediante pruebas bioquímicas MICRO GEN ID, identificándose 8 diferentes especies y el método colorimétrico Simplate para la identificación de *Campylobacter*, siendo analizadas en pruebas de resistencia a 12 antibióticos. Se determinó que más del 75% de las bacterias fueron resistentes a la totalidad de antibióticos. Para *Campylobacter*, se aisló el 37,5% (27/72) de las cepas analizadas, de las cuales más del 67% fueron resistentes a los antibióticos (66,66% a enrofloxacin y ciprofloxacina, 62,69% a ampicilina, 77,78% a

norfloxacina, nitrofurantoína y amoxicilina, 88,89% a ceftazidina y cloranfenicol, 100% a colistina, trimetoprima – sulfametoxazol, eritromicina, y ácido nalidíxico).Recalcando que, en la administración de los antibióticos, es indispensable realizar exámenes previos para un correcto tratamiento y que el adecuado uso de estos medicamentos en animales, es crucial para prevenir la transmisión de patógenos resistentes que afecten la sanidad de las granjas⁽⁵⁸⁾.

Paralelamente, en Brasil, se determinó el perfil de susceptibilidad de muestras de *Campylobacter* spp., en un análisis experimental en aislados de diferentes especies animales. Siendo estudiadas 45 muestras, incluyendo 16 cepas de *C. jejuni*, 8 de *C. coli* y 21 de *C. fetus* frente a 12 antibióticos; de las cuales, todas las cepas de *Campylobacter* spp. fueron sensibles a gentamicina, sulfadiazina y sulfametoxazol. Las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* fueron sensibles a cloranfenicol; las cepas de *C. jejuni* presentaron resistencia a cefoperazona (68,75%), ácido nalidíxico (31,25%), ampicilina y tetraciclina (37,5%), eritromicina (12,5%) y canamicina (6,25%); así como, las cepas de *C. coli* presentaron resistencia a cefoperazona (75,0%), ácido nalidíxico y tetraciclina (50,0%), eritromicina (37,5%), ampicilina y canamicina (12,50%), y las de *C. fetus* fueron sensibles a canamicina. Manifestando una preocupante baja susceptibilidad en antibióticos de uso clínico en el tratamiento de campilobacteriosis humana y la necesidad de la vigilancia de la resistencia en las cadenas de producción⁽⁵⁹⁾.

En 2018, una investigación experimental incluyó como población de estudio a 100 muestras colectadas en diferentes etapas del proceso de

la cadena de producción (Pre – escaldado, post – escaldado, post – desplume, etc.), desde muestras fecales y de enjuague de pollo obtenidas en una avícola en Colombia. Utilizaron como medio selectivo agar Campy – cefex (medio recomendado para el uso en procedimientos cualitativos de selección y aislamiento diferencial de las especies de *Campylobacter* para comida y avicultura), como también filtración de membrana para aislar *Campylobacter*. La investigación determinó la prevalencia de *Campylobacter* spp. previo y posterior a las acciones de mejora con un 76,1% y 29,4%, siendo altas en las muestras de heces con 100% y 40,0%. Se concluyó que es posible determinar la prevalencia de *Campylobacter* spp. a partir de muestras fecales y enjuague de pollos de avícola, asimismo se identificó las etapas críticas durante el proceso del beneficio⁽⁶⁰⁾.

En ese año, en Costa Rica, una investigación descriptiva, determinó los perfiles de sensibilidad de seis antibióticos en cepas de *Campylobacter* aisladas de pollos de cadenas de producción avícola, aislando 148 cepas de pollos de granjas, plantas de proceso y puntos de venta. Determinadas a través de dilución en agar, CMI y los perfiles de sensibilidad a doxiciclina, ciprofloxacina, ácido nalidíxico, enrofloxacina, cloranfenicol y eritromicina. El 92% (136/148) de las cepas no presentaron susceptibilidad a algún antibiótico y se encontró resistencia a ácido nalidíxico (91,2%), ciprofloxacina y enrofloxacina (85,8%), los cuales presentaron mayor frecuencia, seguido de doxiciclina (25,0%), cloranfenicol (5,4%) y eritromicina (2,7%). Encontrándose un perfil de resistencia frecuente en las quinolonas y un 2,03% a las quinolonas y

macrólidos, sin presentar multiresistencia en ninguna cepa estudiada. Se consideró que *Campylobacter* en pollos presenta condiciones favorables para su propagación a las poblaciones humanas, siendo fundamental la instauración de estrategias de vigilancias por su elevada resistencia a los antibióticos y su amenaza para la salud pública⁽⁶¹⁾.

En el 2019, en una investigación experimental en pollos y gallinas de varias granjas en el estado de Lagos en Nigeria, se recolectaron 150 muestras fecales, estas fueron aisladas en agar sangre en microaerofilia, utilizándose 13 antibióticos para la prueba de susceptibilidad, consideraron los puntos de corte de la CLSI. Se determinó una prevalencia de aislamiento para *Campylobacter* de 5,3%, identificando a todas las cepas como *C. coli*, encontrándose cepas resistentes a: nitrofurantoína (50,0%), gentamicina (75,0%), ofloxacina (62,5%), claritromicina (87,5%), cotrimoxazol (87,5%), ácido nalidíxico, cloranfenicol, cloxacilina, y estreptomina (100%), intermedicamente sensible a la eritromicina (62,5%), y sensible a amoxicilina + ácido clavulánico (87,5%), amoxicilina (87,5%) y tetraciclina (62,5%). El estudio concluyó en la necesidad de implantar programas de monitoreo y vigilancia para las aves de consumo, debido a la presencia de cepas multiresistentes y a la disminución de la sensibilidad a la eritromicina⁽¹⁾.

En el mismo año, en Brasil, en un estudio experimental – transversal con el fin de aislar *C. jejuni* y *C. coli* de las carcasas de pollos refrigerados, detectaron la ocurrencia de resistencia antimicrobiana y los genes responsables de estas. Siendo colectadas 105 muestras, de las cuales el 6,67% fue *C. jejuni* y el 3,81% fue *C. coli*, estas fueron obtenidas

mediante aislamiento microscópico y PCR. Se encontró una incidencia de resistencia en *C. jejuni* en tetraciclina (71,4%), ácido nalidíxico (42,9%), estreptomina y gentamicina (57,7%); como en *C. coli* en tetraciclina y estreptomina (100%), eritromicina (75,0%), ciprofloxacina, gentamicina y ácido nalidíxico (50,0%), ninguna cepa presentó resistencia a cloranfenicol. Se identificaron los genes *aph3-1*, *aadE* y *tet (O)* en *C. jejuni*, como *aph3-1* y *tet (O)* en *C. coli*. Dicha resistencia en las cepas de *Campylobacter*, puede ser transmitida a humanos a través de los productos animales, los genes pueden ser transmitidos a otras bacterias en el mismo ambiente y de esta manera llegar a limitar la eficacia de los tratamientos a campilobacteriosis⁽⁶²⁾.

En el 2020, en una investigación experimental con el fin de conocer la susceptibilidad del *Campylobacter* spp., en 200 muestras cecales de pollos de matanza en las principales producciones de pollo de consumo en Australia. Se utilizaron alícuotas homogenizadas, caldo Bolton selectivo para *Campylobacter*, agar *Campylobacter* Skirrow (CSK) y agar CampyFood ID (CFA) para aislar las cepas. En la prueba de susceptibilidad, se utilizó el agar Columbia con sangre de oveja, a través del método de microdilución utilizando el panel de NARMS Campy Sensititre y los resultados fueron capturados usando un sistema de visión. Obteniendo 108 aislamientos de *C. jejuni*, la resistencia comúnmente detectada fue a tetraciclina (22,2%), seguida de ciprofloxacina (14,8%) y el ácido nalidíxico (14,8%); 96 aislamientos de *C. coli* mostraron mayor sensibilidad a los antibióticos, la resistencia más observada fue ciprofloxacina, ácido nalidíxico, azitromicina, eritromicina

y clindamicina (5,2%), telitromicina (4,2%) y tetraciclina (3,1%), ninguno de los aislados era resistente al florfenicol o gentamicina. Se concluyó que pese a que los resultados relativamente bajos en resistencia, ponen de relieve el beneficio de la larga trayectoria al enfoque conservador para el registro de antibióticos para su uso en animales de consumo en Australia⁽⁶³⁾.

1.2 Bases teóricas

1.2.1 Generalidades

Campylobacter spp. fue identificado en 1916 por dos Veterinarios Británicos que reportaron un organismo peculiar en el moco uterino de una oveja preñada⁽⁶⁴⁾. Décadas después en los años 40 la bacteria fue aislada de sangre de mujeres embarazadas que presentaron aborto espontáneo y sepsis, probablemente *Campylobacter fetus* relacionado con estos casos. En lo que concierne a la asociación entre *Campylobacter* spp. y casos de diarrea en humanos, esta se produjo en la década de los 70, debido a las dificultades en el cultivo del agente. Actualmente, es el principal agente causante de gastroenteritis bacteriana en países desarrollados y con una prevalencia importante en los países en vías de desarrollo⁽⁶⁵⁾.

1.2.2 Etiología

El género *Campylobacter* pertenece a la familia *Campylobacteraceae*, bacilo Gram negativo, curvado, no esporulados, flagelados, móviles, de colonias incoloras, posee un mejor crecimiento entre 37 - 42° C. Con forma curva o espiral, poseen medidas que oscilan entre 0,5 a 6,0 µm de largo y 0,2 a 0,8 µm de ancho. Su metabolismo respiratorio es

microaerófilico, algunos fermentadores de carbohidratos, su energía proviene de la degradación de aminoácidos y generan resultados positivos a las pruebas bioquímicas de la catalasa y citocromo oxidasa^(17,66). Existen 34 especies descritas, 14 sub especies y 2 biovars^(67,68). entre las especies sobresalen las conocidas “termofílicas”, como *C. jejuni* y *C. coli* causantes de cuadros de campilobacteriosis en humanos, en cerca de 95% de los casos^(65,69). Otras especies como *C. lari* y *C. upsaliensis* también han sido aisladas en pacientes con enfermedades diarreicas, pero su notificación es menos frecuente^(67,70).

Todas las especies de *Campylobacter* spp. conocidas como “bacterias fastidiosas” pueden cultivarse entre 37°C – 42°C. Sin embargo, en condiciones adecuadas algunas especies crecen óptimamente a 42°C; denominándose termotolerantes, a diferencia a otras bacterias competidoras presentes en las heces que ralentizan su crecimiento. Todas las especies de *Campylobacter* requieren de una atmósfera microaerófila estricta, son sensibles ante altas temperaturas, pH ácido, oxígeno, desecación y estrés osmótico^(17,65,71).

1.2.3 Epidemiología en aves

C. jejuni y *C. coli* se encuentran bien adaptadas al tracto intestinal de las aves y están ampliamente distribuidas en ellas. El porcentaje de aves portadoras es mayor en la avicultura que en el cuidado silvestre, ello está asociado a las condiciones propias de producción, como la creación de ejemplares viables a través del uso de mejoras genéticas y tecnológicas, que favorecen la transmisión del agente debido a su alta densidad productiva^(67,72). Sin embargo, en el cuidado silvestre, asociado al

manejo tradicional, menor densidad poblacional y a la diversidad genética (favorecida por la resistencia y adaptación al medio ambiente), se ve limitada a su aplicación en zonas rurales⁽⁷³⁾. No obstante, este patógeno no es específico de las aves, siendo presente también en vacas, cerdos y paserinos aunque en menor prevalencia que en avicultura⁽⁶⁵⁾.

Con respecto a las especies y sistemas productivos infectados se encuentran: pollos de engorde, reproductoras livianas y pesadas, gallinas ponedoras y pavos en los diferentes sistemas, con una mayor prevalencia en sistemas orgánicos y de pastoreo. En todos estos casos es rara la detección de aves infectadas menores de tres semanas de edad, lo que acrecienta la prevalencia al aumentar la edad de las aves, con un punto máximo de presencia de *Campylobacter* spp. en el momento del sacrificio, donde se pueden encontrar una o varias especies colonizando las aves de un mismo lote^(65,74,75).

1.2.4 Factores de virulencia

En las bacterias se ha descrito diversos factores de virulencia asociados con adhesión, invasión, producción de toxinas y otros, que afectan los procesos de la célula hospedera.

Por factores de virulencia se reconocen:

1. Motilidad mediada por flagelos.
2. Adherencia a la mucosa intestinal.
3. Capacidad de invasión.
4. Producción de toxinas.

Los flagelos están asociados a la motilidad bacteriana, clave para la colonización del intestino delgado y para la supervivencia en diferentes medios que se encuentran en el tracto gastrointestinal. En *C. jejuni*, el gen *flaA* se reporta como necesario para la invasión de células epiteliales, y es responsable de la capacidad de adherencia y colonización celular en el tracto gastrointestinal. El gen *cadF* es asociado a la adherencia por medio de una proteína de membrana externa que media la adhesión a la fibronectina de la célula hospedero⁽⁶⁵⁾. Hasta la actualidad el gen *cadF* solamente se ha identificado en *C. jejuni* y *C. coli*, a diferencia de las otras especies de *Campylobacter*.

Otros genes relacionados han sido los genes *racR* y *dnaJ*, siendo sindicados como responsables de la expresión de la adherencia y colonización; *virB11*, *ciaB* y *pldA* han sido seleccionados como los genes responsables de la expresión de la invasión⁽⁷⁾.

1.2.5 Gen ARNr 16S

La identificación de bacterias basadas en el gen *ARN ribosomal 16S* o *ARNr 16S* (*ADN ribosomal 16S* o *ADNr 16S*) ofrece una alternativa a las pruebas fenotípicas poco sensibles para muchas especies de bacterias; sin embargo, presentan fallas en la identificación específica en el género *Campylobacter*. La fiabilidad de la secuenciación del *ADNr 16S* para la identificación específica de campilobacteres, presenta la falta de discriminación entre las especies *C. jejuni*, *C. coli* y la atípica *C. lari*^(76,77), siendo las especies de mayor importancia.

1.2.6 Gen *cadF*

1.2.6.1 Adhesión e Invasión

El flagelo es necesario para la invasión y es el más claro factor de patogénesis. El grado de adhesión e invasión de cepas de *Campylobacter* entre células epiteliales de cultivo in vitro, presenta una relación con el grado de severidad en las indicaciones clínicas en pacientes infectados con este patógeno. Un elemento importante según estudios es el gen *cadF* (*Campylobacter* adhesion to fibronectin), que se expresa en todas las cepas de *C. jejuni* y *C. coli*, y que participa en la adhesión celular por medio de la proteína de la membrana externa uniéndose a fibronectina de la célula hospedera, puesto que éste es un gen de virulencia⁽⁷⁸⁾.

1.2.7 Resistencia a los antibióticos

La resistencia a los antibióticos utilizados como tratamiento en humanos, que presenta una cepa zoonótica es una característica que le da una propiedad de mayor importancia a un patógeno. Este tema está en auge en los últimos años, como consecuencia del uso y abuso de los antimicrobianos tanto en sistemas productivos como en sistemas de salud. Debido a este uso continuo de antibióticos en la producción animal, aumenta la probabilidad de emergencia de cepas bacterianas resistentes^(79,80).

La generación de la resistencia se da mayormente por la mutación de la bacteria o por la adquisición de genes de resistencia, debido comúnmente a la exposición previa a un agente antimicrobiano, lo que

provoca que se perpetúe la enfermedad e incluso en algunos casos puede ocasionar la muerte del paciente. Ello lleva al encarecimiento de los costos en los sistemas de salud al emplear productos de mayor costo. El uso de medicamentos de mala calidad, prescripciones erróneas, deficiencias de control y prevención de las enfermedades infecciosas, son factores en común en los sistemas productivos y de salud que favorecen la resistencia antimicrobiana^(65,81).

Numerosos estudios sostienen que, desde el punto de vista molecular y bioquímico, existen diferentes mecanismos por los cuales una bacteria puede convertirse en resistente a un antibiótico:

1. Inactivación química del antibiótico, a través de la producción de enzimas las cuales son capaces de crear alteraciones de manera estructural en el antibiótico, produciendo la pérdida de su funcionalidad, tal como el acetil transferasa inhibidor de los aminoglucósidos y cloranfenicol, y las β – lactamasas inhibidor del grupo de los beta lactámicos^(82–85).
2. Alteración del sitio blanco de acción del antibiótico, los cuales se activan a través de la unión de las bacterias a una proteína esencial, alterando el lugar donde el antibiótico se afianza a la bacteria, interrumpiendo su función vital (mecanismo utilizado frecuentemente por las grampositivas resistentes a penicilina y meticilina)^(82,84,85).
3. Alteración de las barreras de permeabilidad bacteriana o eflujo activo de los antibióticos, mecanismo utilizado por las gramnegativas el cual disminuye la permeabilidad de la membrana inhibiendo el paso de moléculas hidrofóbicas (eritromicina o exacilina) a través de la

presencia de lipopolisacáridos; así como, las porinas para antibióticos hidrofílicos pequeños, que por medio de canales de agua ingresan a través de la membrana externa; y las pérdidas o modificaciones, que disminuyen la eficacia de la permeabilidad de la pared bacteriana, interrumpiendo el ingreso al espacio periplásmico (mecanismo utilizado contra aminoglucósidos y carbapenems)^(82,84,85).

4. Bombas de expulsión, este mecanismo utiliza a ciertas bacterias para la excreción de residuos o productos tóxicos y agentes antibacterianos; es posible que dichas bombas aumenten la concentración mínima inhibitoria (CMI), causando resistencia en algunas bacterias gramnegativas a través del transportador *CmlA* (tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol y algunas fluoroquinolonas)^(82,84,85).

1.2.8 Genes de resistencia a los principales antibióticos empleados en humanos

El *Campylobacter* resistente a los antibióticos constituye una grave amenaza para la salud pública. En los macrólidos, por ejemplo: la resistencia a este grupo está dada por el gen de la *ARNr metilasa erm(B)* que fue reportada en un aislado de *C. coli*, causando una gran preocupación ya que este grupo de antibióticos son los fármacos de elección para la terapia clínica de la campilobacteriosis⁽⁸⁶⁾.

Las fluoroquinolonas, actúan inhibiendo la replicación del ADN bacteriano por su acción sobre las enzimas ADN girasa y topoisomerasa IV. El principal mecanismo de resistencia a las fluoroquinolonas en el

Campylobacter es una mutación en la quinolona, región determinante de resistencia, que gracias al gen *gyrA* codifica la subunidad "A" de la enzima ADN girasa, lo que resulta en la sustitución del aminoácido treonina por isoleucina, lo que le confiere una menor sensibilidad^(20,87,88).

Los aminoglucósidos, en la expresión de la resistencia en gentamicina, está se presenta a través del gen *aphA-3* ubicada en el plásmido; al igual que el gen *tet(O)*, el cual codifica la resistencia a tetraciclina y se expresa a través de un cambio conformacional en el mismo, el cual es transferible entre las especies de *C. jejuni* y *C. coli*^(51,89,90).

1.2.9 Aislamiento de *Campylobacter* spp.

Los primeros aislamientos de *Campylobacter* fueron de hemocultivos, medio nutritivo libre de competencia bacteriana, lo que facilita su aislamiento e identificación. Los aislamientos en coprocultivo, donde otras bacterias compiten por nutrientes y a menudo crecen más rápido que *Campylobacter*. Con el fin de evitar crecimientos de coliformes contaminantes primero Dekeyser, luego Skirrow, idearon filtrar las muestras de heces diarreicas a través de membranas de filtros con porosidad de 0,5 μm , lo cual permitía retener a la mayoría de bacterias presente en las muestras, por ejemplo *Salmonella* (1,0 – 6,0 μm de ancho) pasando solo bacterias muy delgadas como *Campylobacter* (0,2 – 0,8 μm de ancho)⁽⁹¹⁾.

El desarrollo posterior del Agar Bützler, una combinación de agar sangre con base de medio Brucella o agar *Campylobacter* con la adición de cinco antibióticos (novobiocina, bacitracina, colistina, cefazolina y

cicloheximida), aumentó el aislamiento de *Campylobacter*, posteriormente Skirrow ideó otra fórmula más simple con solo tres antibióticos (vancomicina, polimixina B y trimetropina ambos conocidos como suplemento B y S, respectivamente)⁽⁹¹⁾.

Se han utilizado muchos medios para el aislamiento del *Campylobacter*, y se acepta que la presencia de sangre en estos medios es necesaria para absorber los radicales libres que inhiben a *Campylobacter*⁽⁹¹⁾.

Estudios comparativos de medios libres de sangre y conteniéndola, nos indican que los medios conteniendo carbón son superiores a los de sangre, incrementando la aerotolerancia de estos microorganismos. La presencia de agentes antimicrobianos, se utilizan para inhibir la flora acompañante, concretamente Bolton y colaboradores desarrollaron la combinación del desoxicolato y cefoperazona, (el suplemento CCDA) que consiguen inhibir la flora normal, pero no afectan al crecimiento de *Campylobacter*, las peptonas presentes son las fuentes de nitrógeno en este medio, la combinación de carbón, sulfato ferroso y piruvato sódico reemplazan a la sangre, el carbón actúa como adsorbente de muchos productos tóxicos, mientras que el sulfato ferroso y el piruvato actúan como agentes reductores⁽⁹²⁾.

1.2.10 Identificación por características fenotípicas

Entre las especies de *Campylobacter* spp. que crecen a 42°C, las que se encuentran más frecuentemente en muestras de origen animal son *C. jejuni* y *C. coli*. Sin embargo, se han descrito frecuencias bajas de otras especies. Generalmente, *C. jejuni* se puede diferenciar de otras especies de *Campylobacter* sobre la base de la hidrólisis de hipurato, ya

que es la única especie que da positivo a hipurato. Una de las características contrastadas más frecuentes ha sido la sensibilidad al Ácido nalidíxico, pero actualmente es difícil de interpretar porque se ha producido un aumento en la resistencia a este antibiótico en las cepas de *C. jejuni* y *C. coli*, y en el aislamiento de genogrupos de *C. lari* sensibles al mismo⁽⁷⁷⁾.

Los resultados deben confirmarse utilizando controles positivos y negativos definidos. Y parte de estas reacciones se manifiestan por sus características fenotípicas en varias de las pruebas:

Detección de hidrólisis de hipurato: La capacidad enzimática del microorganismo para hidrolizar el hipurato de sodio (ácido hipúrico) a ácido benzoico y glicina, por la acción de la enzima hipurato hidrolasa (hipuricasa), se logra mediante la observación del producto final (ácido benzoico o glicina) junto con el reactivo de contraste ninhidrina⁽⁷⁷⁾.

Detección de hidrólisis de acetato de indoxil: La capacidad que tiene la bacteria por medio de la enzima enterasa que actúan en el sustrato para liberar índigo en presencia de oxígeno⁽⁹³⁾.

1.2.11 Diagnóstico e identificación por pruebas moleculares

Existen actualmente una amplia variedad de sistemas de amplificación bacteriana que difieren entre sí en la capacidad de discriminar entre las cepas bacterianas, en su fiabilidad, en el esfuerzo requerido y en el coste. Los métodos genotípicos se basan en el análisis de la estructura génica, incluyendo polimorfismos de ADN en los patrones de restricción y la presencia o ausencia de ADN extracromosómico⁽⁶⁷⁾.

La principal ventaja de los métodos genotípicos es la utilización de ADN, el cual tiene una elevada conservación dentro de cada especie. La taxonomía bacteriana actual, utiliza métodos de identificación molecular y al aplicarlos, algunas de las especies admitidas para sus características fenotípicas están siendo reclasificadas en grupos de taxa distinto. La fracción del ADN ribosomal 16S (*ARNr 16S*), es la secuencia de nucleótidos de especies bacterianas con mayor especificidad o similitudes provenientes de la misma rama filogenética⁽⁷⁷⁾, pero a lo mencionado, no es confiable para distinguir entre las principales especies de *Campylobacter*.

La técnica molecular más utilizada es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en ella destaca la PCR a tiempo real o PCR semi – cuantitativo; que, combinada con los nuevos sistemas automáticos para la purificación de ácidos nucleicos, ofrece una plataforma ideal para el desarrollo de una gran variedad de pruebas moleculares para la identificación y cuantificación de los agentes infecciosos de interés clínico. Debido a sus indudables ventajas, como la facilidad de empleo, la mayor rapidez o el menor riesgo de contaminación⁽⁹⁴⁾.

1.3 Definición de términos básicos

Antibiótico, es un agente biológico o químico utilizado para inhibir y combatir las infecciones bacterianas. Actúan eliminando las bacterias o impidiendo que se reproduzcan. Los antibióticos no combaten las infecciones causadas por virus⁽⁹⁵⁾.

BSAC, British Society for Antimicrobial Chemotherapy (traducción al español: Sociedad Británica de Quimioterapia Antimicrobiana).

Broiler, pollo criado específicamente en las cadenas de producción de alimentos, destino al sacrificio.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (traducción al español: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio).

Campilobacteriosis, es una infección causada por la bacteria *Campylobacter*, que afecta el tracto intestinal y raramente la circulación sanguínea. Se produce una respuesta inflamatoria, con deposiciones con sangre o síndrome disentérico, además asociada a calambres, fiebre y dolor abdominal.

Es una de las infecciones bacterianas más comunes de los seres humanos, a menudo se transmite por alimentos. Esta infección puede ser contraída por niños y adultos, y es frecuente adquirirla mediante la ingestión de alimentos contaminados (por lo general sin pasteurizar) y mal cocidos, o por manejo inadecuado de aves de corral, que contaminan el agua potable. El contacto con las aves contaminadas, con ganado o animales domésticos, especialmente perros, también pueden causar la enfermedad. Los animales criados para carne son la principal fuente de campilobacteriosis.

Cepa, cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento⁽⁹⁵⁾.

Concentración mínima inhibitoria (CMI), concierne a la concentración más baja de un antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana al cabo de 18 – 24 hrs de incubación⁽⁹⁵⁾.

Crioconservación, congelamiento y almacenamiento de células vivas a muy bajas temperaturas⁽⁹⁵⁾.

Disco de sensibilidad o sensidisco, es un disco impregnado con algún antimicrobiano usado para determinar la susceptibilidad antimicrobiana del mismo por difusión⁽⁹⁵⁾.

Escala de McFarland, estándares de turbidez de sulfato de bario. La escala es utilizada como referencia en suspensiones bacteriológicas para saber el número de bacterias por mililitro o UFC, que va desde 0,5 a 4,0. La escala usada para el inóculo de las pruebas de susceptibilidad por el método de disco difusión es 0,5⁽⁹⁵⁾.

Esterilización, proceso validado que permite la eliminación de toda forma de vida microbiana incluyendo endosporas bacterianas. Puede conseguirse por medio de métodos químicos, físicos o gaseosos⁽⁹⁵⁾.

Incubación, mantenimiento de cultivos bacterianos en condiciones favorables para su desarrollo y multiplicación⁽⁹⁵⁾.

Inóculo, alícuota de un cultivo bacteriano transferida a un medio de cultivo⁽⁹⁵⁾.

Intermedio (I), categoría que incluye aislados en los cuales las tasas de respuesta pueden ser inferiores a las de los aislados susceptibles, los aislados pueden inhibirse por concentraciones superiores del antibiótico

a las dosis obtenidas habitualmente. Esto implica que la eficacia clínica en los sitios del cuerpo donde los fármacos están fisiológicamente concentrados o cuando se puede utilizar una dosis de un fármaco⁽⁹⁵⁻⁹⁷⁾.

Medio de cultivo, medio artificial de sustancias nutritivas, que puede ser sólidos, semisólidos o líquidos, necesarios para el crecimiento y multiplicación bacteriana *in vitro*⁽⁹⁵⁾.

Microaerófilico, organismo que crece y se reproduce mejor en la presencia de oxígeno al 5% de tensión, 10% de anhídrido carbónico y 85% de nitrógeno⁽⁹⁵⁾.

Resistente (R), categoría que implica que los aislados no son inhibidos por las concentraciones normalmente alcanzables del agente con horarios de dosificación normales y/o que demuestran diámetros de zona que caen en el rango en el que son probables mecanismos específicos de resistencia microbiana, y la eficacia clínica del agente contra el aislado no ha sido demostrada de manera confiable en estudios de tratamiento⁽⁹⁵⁻⁹⁷⁾.

Sensible (S), categoría que implica que los aislados son inhibidos por las concentraciones normalmente alcanzables de agente antimicrobiano cuando se utiliza la dosis de antibiótico recomendada para tratar el sitio de la infección y la especie infectante⁽⁹⁵⁻⁹⁷⁾.

Termotolerantes, aquellas que pueden soportar temperaturas hasta de 45°C, comprenden un número muy reducido de microorganismos.

UFC, unidad formadora de colonias⁽⁹⁵⁾.

CAPITULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES

2.1 Formulación de la hipótesis

2.1.1 Hipótesis nula

H₀: La susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Campylobacter* termotolerantes aisladas en muestras fecales de pollos de granja es similar que la de pollos de vida libre.

2.1.2 Hipótesis alterna

H₁: La susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Campylobacter* termotolerantes aisladas en muestras fecales de pollos de granja no es similar que la de pollos de vida libre.

2.2 Variables y su operacionalización

Variable	Definición	Tipo por su naturaleza	Indicador	Escala de medición	Categorías	Valores de las categorías	Medio de verificación
<i>Campylobacter</i> termotolerantes	Bacilo, Gram negativo, de forma curva o espiral y crecimiento entre 37°C y 42°C.	Cualitativa	Características genotípicas nivel de género	Nominal	- <i>Campylobacter</i> spp.	Positivo (+) Negativo (-)	PCR semi-cuantitativo
			Características bioquímicas de cada especie.	Nominal	- <i>Campylobacter jejuni</i> - <i>Campylobacter coli</i> - <i>Campylobacter lari</i>	Positivo (+) Negativo (-) (ver Anexo N° 5)	-Hidrolisis del Hipurato -Hidrolisis del Acetato de indoxil
Susceptibilidad antimicrobiana	Categoría de respuesta a la actividad de los antibióticos frente a los microorganismos	Cuantitativa	Milímetros	Nominal	- Resistente (R) - Intermedio o moderadamente sensible (I) - Sensible (S)	Valores estandarizados por CLSI y BSAC, para cada antibiótico (ver Anexo N° 9):	Discos de sensibilidad (Halos de inhibición)
Comparación de la susceptibilidad antimicrobiana de pollos de granja y vida libre	Cruce de la respuesta antimicrobiana de las dos poblaciones de pollos	Cuantitativa	Porcentaje	Nominal	Diferencia de porcentajes	Se determinará con los resultados de comparación	Respuesta de la susceptibilidad antimicrobiana

CAPITULO III: METODOLOGÍA

3.1 Tipo y diseño

La investigación fue de tipo y diseño experimental, de contexto laboratorial, donde se manipuló intencionalmente variables dependientes, llevando a cabo la comparación de la respuesta de dos poblaciones de pollos (granja y vida libre); lo que permitió medir la susceptibilidad antimicrobiana entre las cepas aisladas de *Campylobacter* termotolerantes a partir de las muestras fecales de estas poblaciones.

3.2 Diseño muestral

3.2.1 Población universo

Se constituyó de muestras fecales de pollos (N=200), 100 de granja procedente de los mercados de Belén (50) y Modelo (50) de la ciudad de Iquitos, y 100 de vida libre de la comunidad de Santa Clara de Nanay en el distrito de San Juan Bautista, provincia de Maynas, departamento de Loreto (Ver Anexo N°1).

3.2.2 Población de estudio

Estuvo conformada por las cepas aisladas de *Campylobacter* termotolerantes a partir de muestras fecales de pollos, determinadas por PCR semi - cuantitativo a través de los genes *ADNr 16S* y *cadF*.

3.2.3 Muestreo o selección de muestra

El muestreo para el estudio fue no probabilístico, siendo colectadas únicamente muestras fecales recién evacuadas, efectuándose 10 muestreos entre los meses de agosto – setiembre – octubre del 2019

entre las 05:00 a 08:00 horas, las cuales se realizaron en paralelo tanto para la población de pollos de granja como los de vida libre, seleccionados por conveniencia colectando 10 muestras por cada ocasión; ajustados a los criterios de selección.

3.2.4 Criterios de selección

3.2.4.1 Criterio de inclusión

Pollos vivos, pertenecientes a los mercados de Belén y Modelo, en caso de granja y de la comunidad de Santa Clara de Nanay, en caso de vida libre; siempre y cuando se obtenga la autorización de los propietarios (Ver Anexo N° 2).

3.2.4.2 Criterio de exclusión

Pollos muertos y/o enfermos.

3.3 Procedimientos de recolección de datos

3.3.1 Aislamiento de las cepas de *Campylobacter* termotolerantes a partir de muestras fecales de pollos de granja y de vida libre

3.3.1.1 Colecta de la muestra

La colecta se realizó *in situ* mediante el hisopado directo desde las muestras fecales frescas, utilizándose dos hisopos por cada una; estos se introdujeron en el medio de transporte Cary – Blair (Oxoid CM0519) (Ver Anexo N° 3), evitando que el algodón tuviera contacto con el fondo del tubo con el medio. Además, se colectó parte de las mismas como reservorio puro en viales criogénicos (2 mL) y criopreservados a -70°C. Las muestras colectadas fueron codificadas de acuerdo a la procedencia, número de muestra y fecha. Las muestras fueron procesadas dentro de las 24:00 horas a su colecta^(12,98).

Cada procedimiento subsiguiente, fue realizado en el Área de Microbiología del Laboratorio de la Asociación Benéfica PRISMA, ubicada en Calle Ramírez Hurtado N° 622 Iquitos, Maynas, Loreto.

3.3.1.2 Siembra de la muestra

La preparación de las muestras fecales se realizó extrayendo un hisopo del Cary – Blair utilizando una pinza estéril, el mismo fue sumergido y agitado dentro de un microtubo estéril (1,5 mL) conteniendo 500 µL de cloruro de sodio al 0,9%. Finalmente, fue homogenizado en vórtex por 10 seg. para la siembra; se efectuó dispensando 200 µL de la dilución a través de un filtro de

membrana estéril S-Pak® de 0,45 µm de poro y 47 mm de diámetro (Millipore HAWG047S6), el cual fue ubicado sobre el medio selectivo sin sangre para *Campylobacter* “ABC” (Oxoid CM0739)(12,92), modificado con suplemento CCDA (Oxoid SR0155)(99)(Ver Anexo N° 4) en placas Petri (100 x 15 mm). El mismo que fue retirado a los 30 min. de haberse dispensado. Los medios sembrados fueron acondicionados a una atmósfera microaerofílica (5% O₂, 10% CO₂ y 85% N₂), a través de una jarra anaeróbica rectangular 7,0 L (Mitsubishi, 23-246-387) y sometidas a incubación a 42°C por 48 hrs^(12,98,100).

El medio de transporte Cary – Blair, con el hisopo sobrante fue preservado a -4°C, como reservorio adicional de siembra.

3.3.1.3 Repique de las cepas morfológicamente compatibles

3.3.1.3.1. Observación macroscópica

La verificación del crecimiento de la siembra en el área del filtrado y la observación, se realizó de acuerdo a las cepas morfológicamente compatibles con *Campylobacter* y a las características típicas: Grisáceas, planas y húmedas, con extensiones, y pueden presentar brillo metálico. El repique de las cepas seleccionadas se efectuó haciendo uso del método de palmera, y los medios sembrados fueron incubados en las mismas condiciones^(101,102).

3.3.1.4 Repique doble de las cepas aisladas de *Campylobacter* spp.

3.3.1.4.1. Observación microscópica

Posterior a la verificación de las cepas repicadas, en una lámina portaobjeto se realizó un extendido y fijado de las cepas repicadas. Mediante la técnica de tinción de Gram, se efectuó el coloreado de las mismas. De este modo, a través de objetivo de inmersión 100X, fueron confirmadas las cepas de *Campylobacter* de acuerdo a las características típicas: Bacilo Gram negativo no esporulado, pequeño, con forma de coma, S o ala de gaviota^(101,102).

3.3.1.4.2. Detección de oxidasa

Sobre un papel de filtro estéril se vertió una gota del reactivo de oxidasa (Gibson Bioscience 300180). Se extrajo una muestra de las cepas con el extremo posterior de un hisopo estéril, la misma que fue diseminada sobre el papel filtro. La reacción positiva se confirmó mediante la aparición de un color violeta o azul intenso a los 10 seg^(103,104).

3.3.1.4.3. Detección de catalasa

Se colocó en una lámina portaobjeto una gota de reactivo peróxido de hidrógeno (FisherChemicals H325-500). Se extrajo una muestra de las cepas con un asa plástica estéril, y se añadió a la misma. La reacción

positiva se confirmó mediante efervescencia, debido al desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno^(103,104).

Luego de la microscopia y la detección se efectuó el doble repique, R1 para almacenamiento como reservorio de cepa aislada y R2 para los procesos subsiguientes.

3.3.1.5 Almacenamiento de las cepas aisladas de *Campylobacter* termotolerantes

Se colectó la totalidad de las cepas aisladas del medio ABC + CCDA con un asa descartable estéril de 1 µL e introducidas en un vial criogénico (2 mL), conteniendo 1,5 mL de medio de digerido de soja y caseína "TSB" (BD 211768) conteniendo glicerol (FisherChemicals G33-500) al 20%, el cual fue sellado, codificado, homogeneizado en vórtex por 10 seg., almacenado en un criobox y criopreservado a -70°C⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁸⁾.

3.3.2 Identificación de las especies de *Campylobacter* termotolerantes mediante pruebas bioquímicas

3.3.2.1 Detección del hidrólisis de hipurato

Se suspendió una cepa aislada de *Campylobacter* utilizando un asa plástica estéril de 1 µL en 100 µL de la solución de Hipurato sódico al 1% (Sigma-Aldrich H9380-25G) en un microtubo de 1,5 mL. Se incubó en un termobloque a 37°C durante 2 hrs., se añadió 2 gotas del reactivo Ninhidrina 3.5% (Remel R21238) por un extremo del microtubo (sin retirar del termobloque) formando una

capa superpuesta. Se reincubó a 37°C durante 30 min. adicionales. Luego, se retiró el microtubo del termobloque y se observó el desarrollo del color. Esta prueba se efectuó paralelamente con los controles de *C. jejuni* y *C. coli*. La reacción positiva se confirmó mediante la aparición de un color purpura/azul antes de los 30 min. y la reacción negativa mediante la aparición de un color gris claro/amarillento o sin cambio después de los 30 min^(77,102,104).

Generalmente, *C. jejuni* se diferencia a través del hidrólisis del hipurato, ya que es la única especie de éste género que hidroliza el hipurato a comparación de *C. coli* y *C. lari*⁽⁷⁷⁾ (Ver Anexo N° 5).

3.3.2.2 Detección del hidrólisis del acetato de indoxil

Se suspendió una cepa aislada de *Campylobacter* sobre una tira conteniendo el reactivo Acetato de indoxil (Sigma-Aldrich 04739-100STRIPS-F), se humedeció la zona activa de la tira con agua por condensación en la tapa de la placa Petri o añadiendo una gota de agua destilada. Luego, se realizó un borrado de la cepa en la zona activa con un asa estéril. La reacción positiva se confirmó mediante la aparición de una mancha azul verdosa en la posición de la cepa borrada a los 3 – 5 min. y la reacción negativa no produjo cambio de color en la posición borrada^(77,104).

Generalmente, *C. lari* es la única especie produce una reacción negativa a ésta prueba. Sin embargo, *C. coli* si produce una reacción positiva, ya que si hidroliza el acetato de indoxil⁽⁷⁷⁾ (Ver Anexo N° 5).

3.3.3 Confirmación de las cepas de *Campylobacter* termotolerantes por PCR semi – cuantitativo(109)

3.3.3.1 Extracción de ADN

La extracción se realizó dentro de una cámara de flujo laminar, utilizando el protocolo de PureLink Genomic DNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific K182002), el cual tiene como finalidad obtener la lisis de las células bacterianas Gram negativas.

Se agregó 180 µL de PureLink Genomic Digestion Buffer y 20 µL de Proteinasa K en un microtubo de 1,5 mL. Luego, se añadió una asada de cepas vivas de *Campylobacter* spp., este fue sometido a vórtex e incubado en termobloque a 55°C por 30 min. Después, se adicionó 20 µL de RNasa A, siendo agitado en vórtex e incubado a temperatura ambiente por 2 min. Además, se agregó 200 µL de PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer y vortexeado brevemente. En seguida, se añadió 200 µL de etanol al 96 – 100% a la solución, este fue sometido a vórtex hasta homogeneizar. Se transfirió 640 µL de la solución en una columna PureLink Spin Column. Luego, se centrifugó a 10000g por 1 min. Se descartó el precipitado y se conservó la columna en un tubo colector PureLink Collection Tube. Se adicionó 500 µL de Wash Buffer 1 y fue centrifugado a 10000g por 1 min. Nuevamente se descartó el precipitado y se transfirió la columna a un nuevo tubo colector. Se agregó 500 µL de Wash Buffer 2 y se centrifugó a 20000g por 3 min., siendo descartado el tubo colector y se conservó la columna. La mini columna fue colocada en un microtubo de 1,5 mL. Se

adicionó 25 µL de PureLink Genomic Elution Buffer e incubado por 1 min. Luego, se centrifugó a 20000g por 1 min. Finalmente, se descartó la columna, el precipitado fue colocado en un vial criogénico debidamente etiquetado y conservado a -70°C. Cada extracción se realizó adicionando un control negativo como prueba de calidad.

3.3.3.2 PCR semi – cuantitativo para confirmar la identificación del *Campylobacter*

El PCR semi – cuantitativo se realizó a través de la preparación de 24 µL de Master Mix 16S – *cadF*, estas fueron preparadas utilizando los siguientes componentes: 12,5 µL de TagMan® Environmental Master Mix 2.0 (Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific, 4396833), 0,5 µL de 16S – Primer F/Primer R (10 µM), 0,5 µL de *cadF* – Primer R/Primer F (10 µM), 0,25 µL para cada sonda (10 µM), y 9 µL de agua libre de nucleasas (Ambion 4388514). Al finalizar, se adicionó 1 µL del ADN extraído de la cepa de *Campylobacter* spp.

Tales genes se emplearon de la siguiente manera: 16S, para detectar todas las especies del género *Campylobacter* spp.⁽¹¹⁰⁾; el adhesivo de *Campylobacter* a fibronectina (*cadF*), para detectar *C. jejuni* y *C. coli*⁽⁹⁸⁾ (Ver Anexo N° 6).

Las cepas aisladas de *Campylobacter* spp. fueron corridas en un sistema de PCR a tiempo real StepOnePlus™ (Applied Biosystems, 4376592). En cada corrido se adicionó un control positivo de *Campylobacter* spp., además de los controles

negativos de los procedimientos de extracción y la preparación del Master Mix *16S-cadF*, anteriores al PCR. Se utilizaron las siguientes condiciones de ciclo: 95°C durante 10 min., seguido de 45 ciclos de 95°C para 15 seg. y 55°C durante 1 min. Se utilizó un umbral de corte en el ciclo 38 para determinar positividad⁽¹⁴⁾, por el cual se registró la amplificación del ADN de las cepas aisladas de *Campylobacter* termotolerantes, que gracias a la acción de los primers *16S* y *cadF*, en cada ciclo generan fluorescencia los cuales son interpretados mediante longitudes de intensidad de luz, produciendo una curva estándar relativa. Se consideró *Campylobacter* negativo a aquella cepa que no presentó ningún registro de amplificación o que sobrepasó el punto de corte.

3.3.4 Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas aisladas de *Campylobacter* termotolerantes

3.3.4.1 Antibiograma

El antibiograma fue desarrollado mediante el método de disco difusión y la preparación del inóculo, a través del método de suspensión directa de colonias o Kirby – Bauer modificado⁽¹¹¹⁾.

Con un asa bacteriana estéril se extrajo entre tres a cuatro colonias de las cepas aisladas de *Campylobacter* spp. Se suspendió en 5 mL de cloruro de sodio 0,9% en un tubo de ensayo, hasta alcanzar una suspensión comparable al Estándar de turbidez de equivalencia McFarland 0,5 (Remel R20410). Luego de preparar el inóculo, se introdujo un hisopo estéril en el interior del tubo, de manera de humedecerlo completamente.

Antes de retirarlo, se escurrió sobre las paredes del tubo el excedente del mismo. Se sembró sobre la superficie del agar Mueller – Hinton (Oxoid CM0337) (Ver Anexo N° 7), medio de cultivo enriquecido diseñado especialmente para hacer ensayos de sensibilidad, suplementado con sangre de carnero al 5% en una placa Petri (150 x 20 mm).

Utilizando el método masivo realizando estrías en forma paralela y bien compactas abarcando toda la superficie de la misma; el procedimiento se repitió girando la placa 60° en dos a tres momentos adicionales para obtener un "césped" bacteriano. Se dejó secar entre 3 a 5 min. antes de colocar los discos. Los mismos fueron ubicados en la superficie del medio, utilizando una pinza estéril. Luego, se presionó levemente para que se adhiriera firmemente a la misma. Los discos se ubicaron a más de 15mm del borde de la placa y se distribuyeron de manera que no haya superposición de los halos (Ver Anexo N° 8).

Los discos de sensibilidad con los antibióticos impregnados que se utilizaron son: Imipenem (IPM) (10 µg, Oxoid CT0455B), cloranfenicol (C) (30 µg, BD 231274), amoxicilina + ácido clavulánico (AMC) (20/10 µg, BD 231629), eritromicina (E) (10 µg, Oxoid CT0020B), ciprofloxacina (CIP) (5 µg, Oxoid CT0045B), gentamicina (CN) (10 µg, Oxoid CT0024B), ácido nalidíxico (NA) (30 µg, Oxoid CT0166B.), tetraciclina (TE) (30 µg, Oxoid CT0054B), trimetoprima – sulfametoxazol (SXT) (25 µg, Oxoid CT0052B) y azitromicina (AZM) (15 µg, Oxoid CT0031B).

Las placas se colocaron de manera invertida dentro de los 15 min. posteriores a la aplicación de los discos⁽⁹⁵⁾. Luego, se acondicionó a una atmósfera microaerofílica a través de una jarra anaeróbica rectangular, e incubadas a 42 °C durante 48 hrs.

La susceptibilidad de las cepas de *Campylobacter* termotolerantes se determinó mediante la medición del diámetro de los halos de inhibición alrededor de los discos de sensibilidad utilizando una regla milimetrada, por la parte superior del agar Müller – Hinton suplementado con sangre de cordero al 5% y retirando la tapa⁽⁹⁵⁾. Los resultados fueron interpretados de acuerdo a las tablas elaboradas por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), y de la British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC), los cuales se expresan en las siguientes denominaciones: Sensible (S), Intermedio o Moderadamente sensible (I) y Resistente (R)^(96,97,112)(Ver Anexo N° 9).

3.4 Procesamiento y análisis de los datos

3.4.1 Comparación de la susceptibilidad antimicrobiana

Los resultados obtenidos fueron ingresaron a una base de datos previamente diseñada en el programa Microsoft Excel 2016, se compararon los datos de susceptibilidad (sensible, intermedio o moderadamente sensible y resistente) de las cepas aisladas de *Campylobacter* termotolerantes a partir de muestras fecales de las poblaciones de pollos de granja y pollos de vida libre frente a los antibióticos, considerando un p menor de 0,05 como significativo.

Para el análisis estadístico de la susceptibilidad a los antibióticos, se utilizaron las pruebas no paramétricas de Chi – cuadrado de Pearson y la prueba exacta de Fisher mediante el programa estadístico EpiInfo 7 para Windows.

Prueba Chi – cuadrado de Pearson

La X^2 es una prueba de no paramétrica que mide la discrepancia entre una distribución de frecuencias observadas y esperadas. Dentro de sus características generales, la prueba X^2 toma valores entre cero e infinito y no tiene valores negativos porque es la suma de valores elevados al cuadrado^(113–116).

$$X^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

Donde:

O = frecuencias observadas en el experimento.

E = frecuencias esperadas por el azar.

Prueba Exacta de Fisher

La prueba exacta de Fisher es una estadística alternativa a la X^2 que permite analizar si dos variables dicotómicas están asociadas cuando la muestra a estudiar es demasiado pequeña y no cumple las condiciones necesarias para que la aplicación del Chi – cuadrado sea idónea^(113,115,117).

3.5 Aspectos éticos

La presente tesis no se efectuó en seres humanos ni vulnera sus derechos como propietarios de los animales seleccionados, quienes fueron informados sobre el objetivo de estudio y autorizaron el ingreso a sus hogares e instalaciones de trabajo.

Por el contrario, la investigación se categoriza de “Ningún Riesgo”, ya que el único momento de interacción con los animales involucrados se efectuó en la colecta de las muestras fecales de los pollos de granja y de vida libre, el cual fue mínimamente invasivo.; dicho proyecto no vulnera los derechos de los animales según normativas establecidas en la Declaración universal de los derechos del animal de 1978, Ley N° 27265 “Ley de Protección a los animales domésticos y a los animales silvestres mantenidos en cautiverio”, aprobación del Procedimiento para el Uso de Animales en Investigación mediante Resolución Jefatural N° 102-2012-J-OPE/INS, aprobación del Reglamento del CIEA mediante Resolución Jefatural N°114-2012-J-OPE/INS y Código Deontológico del Colegio Médico Veterinario del Perú⁽¹¹⁸⁻¹²¹⁾. De manera que, los demás procedimientos se realizaron en el laboratorio con las cepas aisladas de las muestras fecales colectadas, por lo cual se exonera la evaluación por un comité de ética para animales.

CAPITULO IV: RESULTADOS

4.1 Aislamiento de las cepas de *Campylobacter* termotolerantes a partir de muestras fecales de pollos de granja y de vida libre

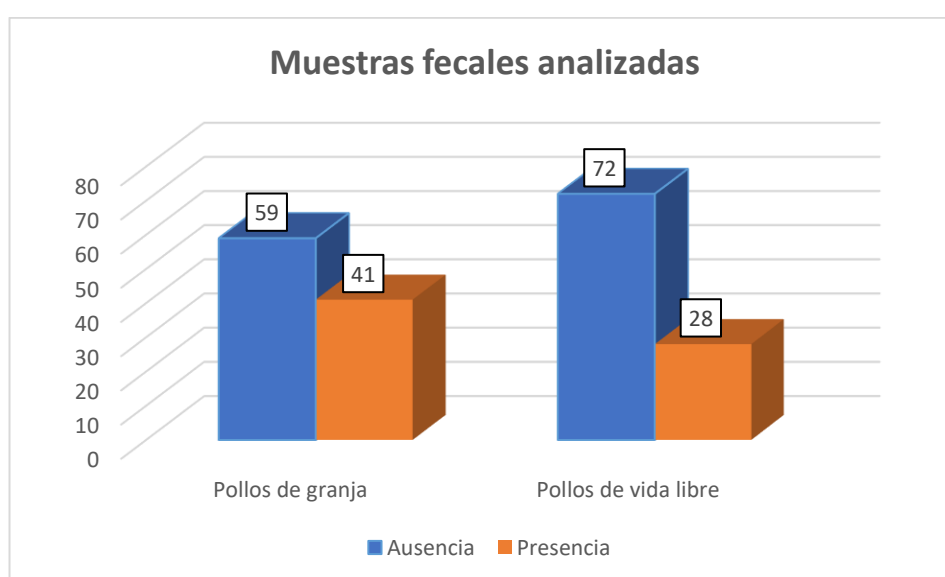
Fueron colectadas 200 muestras fecales de pollos (Ver Tabla N° 1). Se realizaron 10 muestreos en cada población, colectándose 10 muestras en cada oportunidad; lográndose aislar 69 cepas de *Campylobacter* termotolerantes a partir de las muestras fecales, 41 cepas presentes en pollos de granja y 28 en pollos de vida libre (Ver Figura N° 1).

Tabla N° 1. Cepas de *Campylobacter* termotolerantes aisladas a partir de muestras fecales.

Tipo de población	Procedencia	Cepas aisladas de muestras fecales % (n)			Total
		(n)	Ausentes	Presentes	
Pollos de granja	Mercado Belén	50	25,0 (50)	25,0 (50)	41,0 (41)
	Mercado Modelo	50	34,0 (68)	16,0 (32)	
Pollos de vida libre	Santa Clara de Nanay	100	72,0 (72)	28,0 (28)	28,0 (28)
TOTAL (N)		200	65,5 (131)	34,5 (69)	

Fuente: Datos de los tesisistas.

Figura N° 1. Cepas de *Campylobacter* encontradas o no en muestras fecales de pollos.



Fuente: Datos de los tesisistas.

Tabla N° 2. Prueba de chi – cuadrado para las cepas aisladas de *Campylobacter* termotolerantes.

Tipo de población *cepas de *Campylobacter* termotolerantes aisladas
tabulación cruzada

Tipo de población	Especie % (n)		Total	
	Presencia	Ausencia		
Granja	20,5 (41)	29,5 (59)	50,0 (100)	
Vida libre	14,0 (28)	36,0 (72)	50,0 (100)	
TOTAL (N)	34,5 (69)	65,5 (131)	100, (200)	
Pruebas estadísticas	Valor	Sig. Asintótica (2 caras)	Sig. Exacta (1 caras)	Sig. Exacta (2 caras)
Chi – cuadrado de Pearson	3,186	0,074		
Pruebas exacta de Fisher			0,037	0,073
Número de casos válidos	200			

Fuente: Datos de los tesis.

En la Tabla N° 3; se muestra que no existe diferencia significativa (p valor = 0,074) entre las poblaciones de pollos en relación a la cantidad de cepas aisladas de *Campylobacter* termotolerantes. Sin embargo, se observa un 73,0% de probabilidad que exista una similitud entre el tipo de población y las cepas aisladas de *Campylobacter* termotolerantes.

4.2 Identificación de las especies de *Campylobacter* termotolerantes mediante pruebas bioquímicas

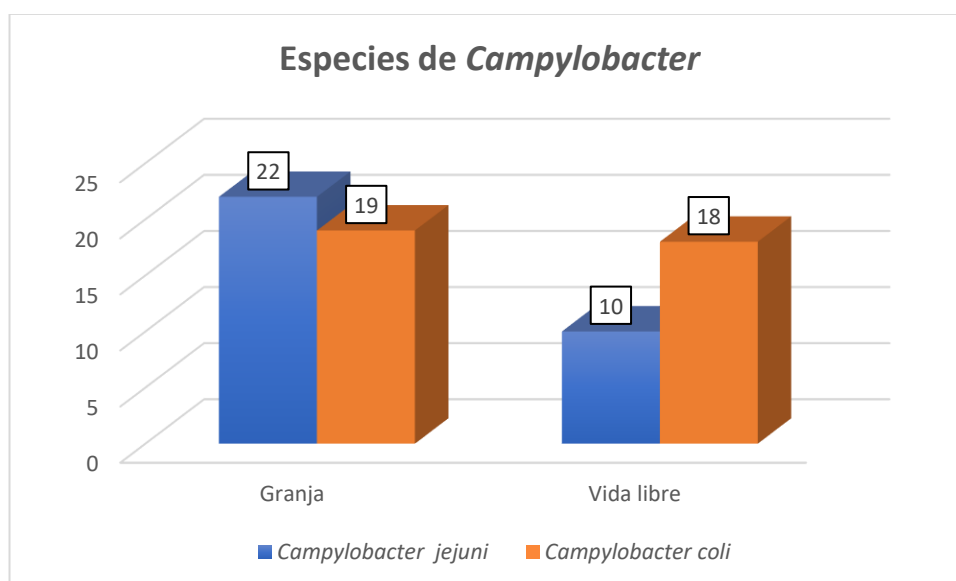
Se lograron identificar 32 cepas de *C. jejuni* y 37 de *C. coli* de la totalidad aislada (Ver Tabla N° 2); encontrándose una mayor prevalencia de *C. jejuni* (22,0%) en los pollos de granja; a diferencia que se encontró un mayor registro de *C. coli* (18,0%) en los pollos de vida libre (Ver Figura N° 2).

Tabla N° 3. Tipo de población de pollos asociado a la identificación de la especie de *Campylobacter* por prueba bioquímica.

Tipo de población	(n)	Pruebas bioquímicas %(n)		Total
		Hidrólisis de hipurato (<i>C. jejuni</i>)	Hidrólisis del acetato de indoxil (<i>C. coli</i>)	
Pollos de granja	100	22,0 (22)	19,0 (19)	41,0 (41)
Pollos de vida libre	100	10,0 (10)	18,0 (18)	28,0 (28)
TOTAL (N)	200	16,0 (32)	18,5 (37)	34,5 (69)

Fuente: Datos de los tesisistas.

Figura N° 2 Presencia de las especies de *Campylobacter* termotolerantes en relación al tipo de población.



Fuente: Datos de los tesisistas.

Tabla N° 4 Prueba de chi – cuadrado para las especies de *Campylobacter* termotolerantes.

Tipo de población *Especies de *Campylobacter* termotolerantes
tabulación cruzada

Tipo de población	n	Especie % (n)		
		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	Total
Granja	100	68,75 (22)	51,35 (19)	59,42 (41)
Vida libre	100	31,25 (10)	44,65 (18)	40,58 (28)
TOTAL (N)	200	100,00 (32)	100,00 (37)	100,00 (69)
Pruebas estadísticas	Valor	Sig. Asintótica (2 caras)	Sig. Exacta (1 caras)	Sig. Exacta (2 caras)
Chi – cuadrado de Pearson	1,493	0,222		
Pruebas exacta de Fisher			0,111	0,219
Número de casos válidos	69			

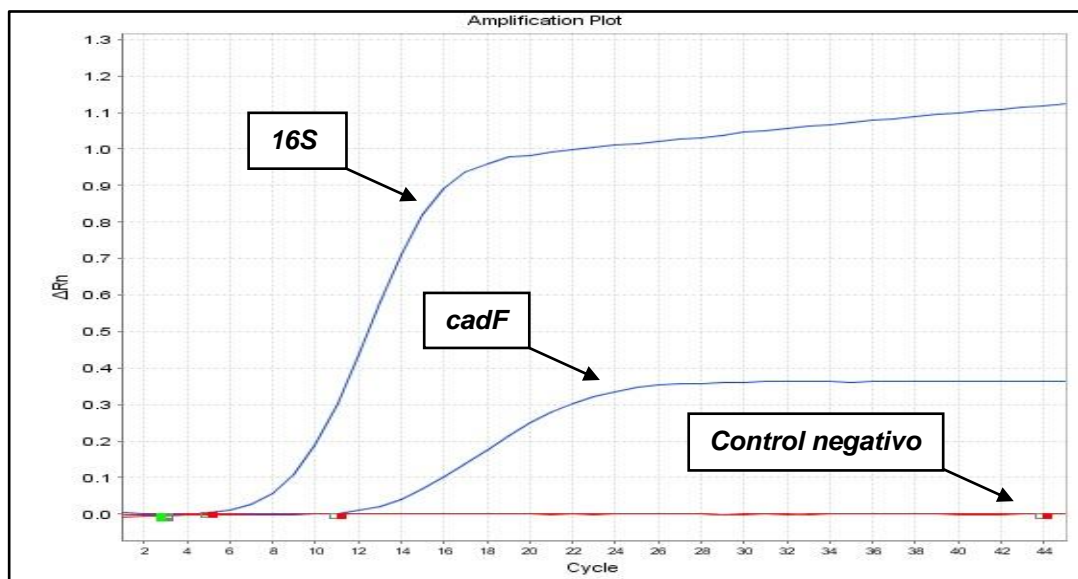
Fuente: Datos de los tesis.

En la Tabla N° 4; Se observa que no existe diferencia significativa (p valor = 0,222) entre las poblaciones de pollos en relación a las especies aisladas de *Campylobacter* termotolerantes.

4.3 Confirmación de las cepas de *Campylobacter* termotolerantes por PCR semi – cuantitativo

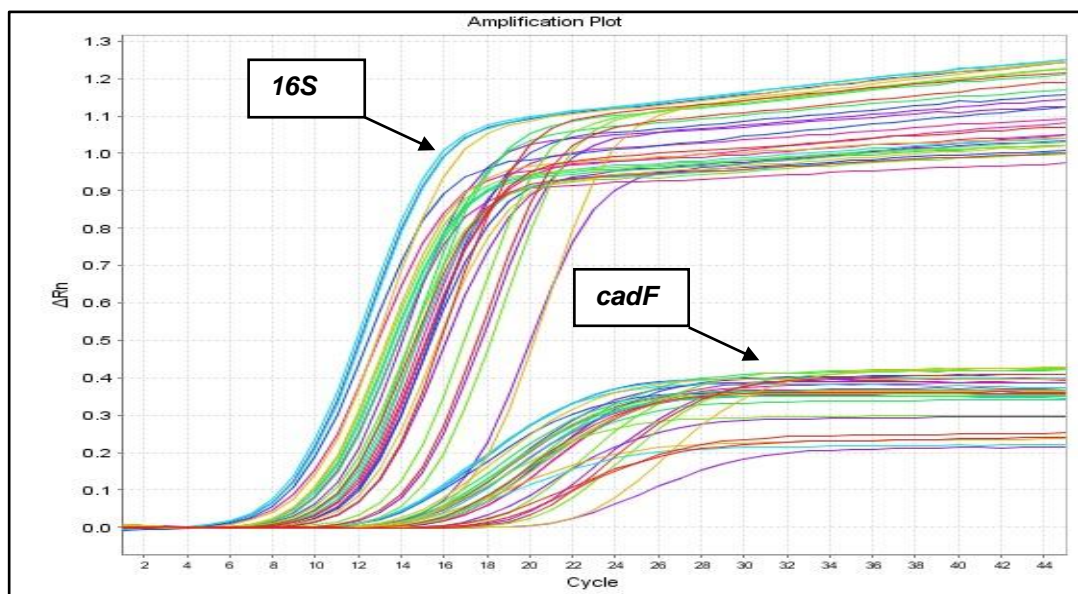
La detección de los genes *16S* y *cadF* fueron confirmados en las 69 cepas aisladas de *Campylobacter* termotolerantes, además se observa el control negativo como control de calidad (Ver Figura N° 3).

Figura N° 3 Lectura control de los genes *16S* y *cadF*.



Fuente: Datos de los tesisistas.

Figura N° 4 Lectura de las cepas aisladas de *Campylobacter* termotolerantes mostrando la presencia de los genes *ADN ribosomal 16S* y *cadF*.



Fuente: Datos de los tesisistas.

4.4 Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas aisladas de *Campylobacter* termotolerantes

En la Tabla N° 5, para ambas especies de las cepas aisladas de pollos de granja, se encontró que imipenem y cloranfenicol (100%) fueron los antibióticos más efectivos, seguido por amoxicilina + ácido clavulánico (68,2%) en *C. jejuni*. Únicamente imipenem y cloranfenicol (100%) fueron los más eficientes en *C. coli*.

Por otro lado, ácido nalidíxico, ciprofloxacina (100%) y tetraciclina (90%), registraron una alta resistencia en *C. jejuni*. Así mismo, ácido nalidíxico, ciprofloxacina y trimetoprima – sulfametoxazol (100%), azitromicina y eritromicina (79,0%) mostraron ser resistentes en *C. coli* (Ver Figura N° 4).

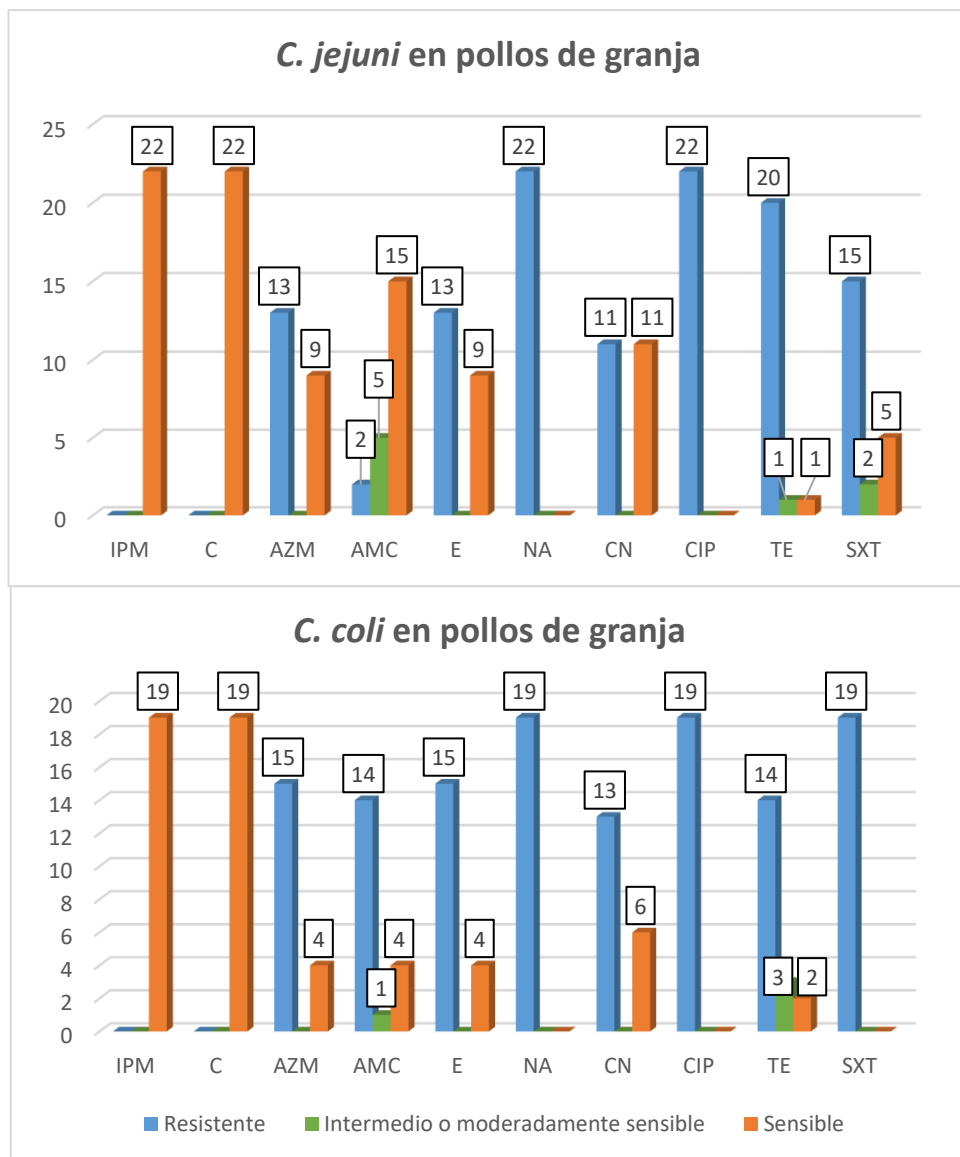
Tabla N° 5 Susceptibilidad antimicrobiana fenotípica de *C. jejuni* y *C. coli* aislados de pollos de granja.

Antibiótico	<i>C. jejuni</i> aislados de granja				<i>C. coli</i> aislados de granja			
	% (n)*			Total (N)	% (n)*			Total (N)
	R	I	S		R	I	S	
Imipenem			100 (22)	22			100 (19)	19
Cloranfenicol			100 (22)	22			100 (19)	19
Azitromicina	59,1 (13)		40,9 (9)	22	79,0 (15)		21,0 (4)	19
Amoxicilina + ácido clavulánico	9,1 (2)	22,7 (5)	68,2 (15)	22	73,7 (14)	5,3 (1)	21,0 (4)	19
Eritromicina	59,1 (13)		40,9 (9)	22	79,0 (15)		21,0 (4)	19
Ácido nalidíxico	100 (22)			22	100 (19)			19
Gentamicina	50 (11)		50 (11)	22	68,4 (13)		31,6 (6)	19
Ciprofloxacina	100 (22)			22	100 (19)			19
Tetraciclina	90,0 (20)	4,5 (1)	4,5 (1)	22	73,7 (14)	15,8 (3)	10,5 (2)	19
Trimetoprima – sulfametoxazol	68,2 (15)	9,1 (2)	22,7 (5)	22	100 (19)			19

* R, resistente; I, intermedio o moderadamente sensible; S, sensible.

Fuente: Datos de los tesisistas.

Figura N° 5. Susceptibilidad antimicrobiana cepas de *C. jejuni* y *C. coli* de pollos de granja.



Números arábigos = Número de cepas.

Fuente: Datos de los tesisistas.

En la Tabla N° 6, la susceptibilidad en las especies de *Campylobacter* termotolerantes de las cepas aisladas de pollos de vida libre, se registró que imipenem y cloranfenicol (100%), eritromicina y gentamicina (90%) en *C. jejuni* fueron los antibióticos más efectivos. Asimismo, imipenem y cloranfenicol (100%), azitromicina y gentamicina (88,9%) fueron los más eficientes en *C. coli*.

Sin embargo, trimetoprima – sulfametoxazol (90%), tetraciclina (60%) y ciprofloxacina (50%) registraron resistencia en *C. jejuni*. De igual manera, ácido nalidíxico y ciprofloxacina (88,9%) y tetraciclina (61,1%) mostraron resistencia en *C. coli*. (Ver Figura N° 5).

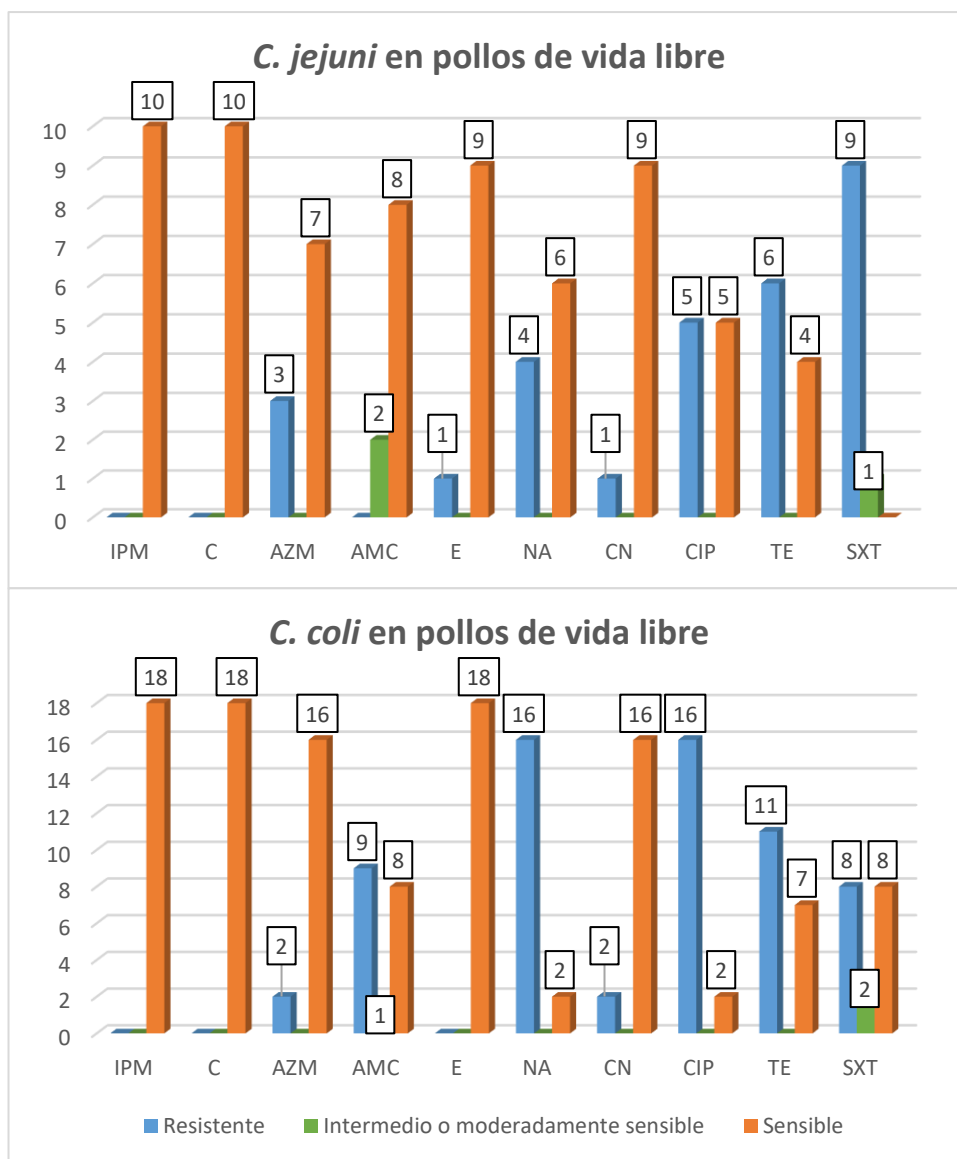
Tabla N° 6 Susceptibilidad antimicrobiana fenotípica de *C. jejuni* y *C. coli* aislados de pollos de vida libre.

Antibiótico	<i>C. jejuni</i> aislados de vida libre				<i>C. coli</i> aislados de vida libre			
	% (n)			Total (N)	% (n)			Total (N)
	R	I	S		R	I	S	
Imipenem			100 (10)	10			100 (18)	18
Cloranfenicol			100 (10)	10			100 (18)	18
Azitromicina	30 (3)		70 (7)	10	11,1 (2)		88,9 (16)	18
Amoxicilina + ácido clavulánico		20 (2)	80 (8)	10	50,0 (9)	5,6 (1)	44,4 (8)	18
Eritromicina	10 (1)		90 (9)	10			100 (18)	18
Ácido nalidíxico	40 (4)		60 (6)	10	88,9 (16)		11,1 (2)	18
Gentamicina	10 (1)		90 (9)	10	11,1 (2)		88,9 (16)	18
Ciprofloxacina	50 (5)		50 (5)	10	88,9 (16)		11,1 (2)	18
Tetraciclina	60 (6)		40 (4)	10	61,1 (11)		38,9 (7)	18
Trimetoprima – sulfametoxazol	90 (9)	10 (1)		10	44,4 (8)	11,1 (2)	44,5 (8)	18

* R, resistente; I, intermedio o moderadamente sensible; S, sensible.

Fuente: Datos de los tesisistas.

Figura N° 6. Susceptibilidad antimicrobiana cepas de *C. jejuni* y *C. coli* de pollos de vida libre.



Números arábigos = Número de cepas.

Fuente: Datos de los tesisistas.

4.5 Comparación de la susceptibilidad antimicrobiana

Las pruebas de susceptibilidad realizadas en las cepas aisladas de *C. jejuni* y *C. coli*, fueron comparadas con los diferentes antibióticos y el tipo de población de pollo, sean de granja o de vida libre.

Tabla N° 7. Prueba de chi – cuadrado de *C. jejuni* y *C. coli* de las cepas de granja y vida libre / 10 antibióticos

TABULACIÓN CRUZADA							
<i>C. jejuni</i> aislados				<i>C. coli</i> aislados			
Amoxicilina + ácido clavulánico				Amoxicilina + ácido clavulánico			
<i>p</i> = 0,5868	S	I	R	<i>p</i> = 0,3019	S	I	R
Granja	15	5	2	Granja	4	1	14
Vida libre	8	2	0	Vida libre	9	1	8
Azitromicina				Azitromicina			
<i>p</i> = 0,252	S	I	R	<i>p</i> = 0,000014	S	I	R
Granja	9	0	13	Granja	4	0	15
Vida libre	7	0	3	Vida libre	16	0	2
Cloranfenicol				Cloranfenicol			
<i>p</i> = 1	S	I	R	<i>p</i> = 1	S	I	R
Granja	22	0	0	Granja	19	0	0
Vida libre	10	0	0	Vida libre	18	0	0
Ciprofloxacina				Ciprofloxacina			
<i>p</i> = 0,00203	S	I	R	<i>p</i> = 0,443	S	I	R
Granja	0	0	22	Granja	0	0	19
Vida libre	5	0	5	Vida libre	2	0	16
Tetraciclina				Tetraciclina			
<i>p</i> = 0,0335	S	I	R	<i>p</i> = 0,0470	S	I	R
Granja	1	1	20	Granja	2	3	14
Vida libre	4	0	6	Vida libre	7	0	11
Trimetoprima – sulfametoxazol				Trimetoprima – sulfametoxazol			
<i>p</i> = 0,2573	S	I	R	<i>p</i> = 0,0007	S	I	R
Granja	5	2	15	Granja	0	0	19
Vida libre	0	1	9	Vida libre	8	2	8
Ácido nalidíxico				Ácido nalidíxico			
<i>p</i> = 0,000397	S	I	R	<i>p</i> = 0,443	S	I	R
Granja	0	0	22	Granja	0	0	19
Vida libre	6	0	4	Vida libre	2	0	16
Imipenem				Imipenem			
<i>p</i> = 1	S	I	R	<i>p</i> = 1	S	I	R
Granja	22	0	0	Granja	19	0	0
Vida libre	10	0	0	Vida libre	18	0	0
Eritromicina				Eritromicina			
<i>p</i> = 0,027	S	I	R	<i>p</i> = 0,0000053	S	I	R
Granja	9	0	13	Granja	4	0	15
Vida libre	9	0	1	Vida libre	18	0	0
Gentamicina				Gentamicina			
<i>p</i> = 0,076	S	I	R	<i>p</i> = 0,00131	S	I	R
Granja	11	0	11	Granja	6	0	13
Vida libre	9	0	1	Vida libre	16	0	2

S, Sensible; I, intermedio o moderadamente sensible; R, Resistente.

Fuente: Datos de los tesis.

En la Tabla N° 6, se muestran que las cepas de vida libre de *C. jejuni* son más sensible a la ciprofloxacina, tetraciclina, ácido nalidíxico y eritromicina que las cepas de granja; así como, las cepas de vida libre de *C. coli* son más sensible a la azitromicina, trimetoprima – sulfametoxazol, tetraciclina, eritromicina y gentamicina que las cepas de granja; lo cual muestra que existe una diferencia significativa $< 0,05$ en la relación de la susceptibilidad antimicrobiana de los pollos de granja y vida libre, frente a los mencionados antibióticos.

En tal sentido, se demostró que la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *Campylobacter* termotolerantes aisladas de pollos de granja, “no es similar” que la de pollos de vida libre, aceptando así la H_1 ; esto debido, a que los patrones de susceptibilidad a los antibióticos empleados fueron variables, dependientemente del tipo de población de pollos y la especie de *Campylobacter* spp.

CAPITULO V: DISCUSIÓN

La industria avícola es muy dinámica en cuanto a la mejora genética y adelantos tecnológicos, los cuales elevan los estándares productivos. Sin embargo, a pesar de estos esfuerzos tanto humanos, como económicos, aún continúa una alta dependencia de insumos foráneos, tales como los ingredientes en la elaboración de las dietas, el recurso genético utilizado y los diferentes fármacos, que en su mayoría son importados⁽⁷²⁾; a diferencia de la producción tradicional, favorecida por su amplia diversidad genética y crianza particularmente orgánica⁽⁷³⁾. Dentro de la avicultura comercial, el empleo de un ave híbrida (pollos de granja) destacada por su elevada productividad, viabilidad, buena conversión y adaptación a las condiciones intensivas de manejo. Dichos sistemas intensivos han contribuido a que las “razas criollas” (pollos de vida libre) fueran desapareciendo, siendo desplazadas y obligadas a permanecer al margen de las pequeñas poblaciones, mantenidas en los patios de las familias de zonas rurales del país.

La caracterización de la microbiota de las “aves de corral” (pollos de granja), se centra actualmente en el estudio del tracto gastrointestinal, dado que es el área de mayor abundancia y diversidad bacteriana, el cual presenta una mayor relevancia en la salud del huésped, desempeñando un papel esencial en la digestión y absorción de nutrientes, el desarrollo del sistema inmune y la exclusión de patógenos^(22,72), se ha señalado que la dieta y los aditivos alimentarios pueden afectar la microbiota gastrointestinal de las “aves de corral” con respecto a la diversidad y composición. En consecuencia, la microbiota intestinal se ve influenciada por factores genéticos y factores externos como la dieta y el ambiente.

El procesamiento en el Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres, comenta que los microorganismos del género *Campylobacter* en pollos, pueden ser aislados a partir de vertidos fecales recientes mediante hisopado; además de utilizar un medio de transporte (Amies, Cary Blair, Stuart, etc.) como estrategia para la desecación y los efectos tóxicos del oxígeno; asimismo, se describe la siembra de la muestra utilizando medios de cultivo selectivos para favorecer el crecimiento de *Campylobacter*, con agregado de antibióticos (cefoperazona, vancomicina, trimetoprima, etc.), para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras (cicloheximida, anfotericina B), a través del método de filtración pasiva con suspensión en PBS (pH 7,2 – 7,4) a temperatura ambiente e incubado a 42°C en microaerofilia⁽⁷⁷⁾. En el presente estudio, se empleó una metodología similar, realizando el suspendido a través de cloruro de sodio al 5%, este cambio no afectó el aislamiento en las concentraciones apropiadas, ya que *Campylobacter* es un microorganismo con requerimientos alimenticios muy exigentes, a tal punto de no presentar crecimiento en las condiciones inadecuadas.

De este modo, el porcentaje de aislamiento total de *Campylobacter* termotolerante en el presente estudio fue de 34,5%. Respecto a esto, en el Reino Unido⁽⁴²⁾, se reportó un porcentaje superior de 75,8%, a lo obtenido; asimismo, en Ecuador⁽⁵⁸⁾, se obtuvo un porcentaje de aislamiento 37,5% en muestras de pollos faenados, dato casi similar a lo encontrado en este estudio; en la ciudad de Iquitos⁽⁴⁰⁾, se registró un 44,5% de aislamiento en un estudio de “*pollos criados con y sin confinamiento*”. Acorde a esto, se manifiesta la existencia de una alta distribución de *Campylobacter* a nivel mundial, así como

la disminución del porcentaje en relación a la ciudad de Iquitos comparado con años anteriores.

Relacionado al tipo de crianza, en el presente estudio en los pollos de granja, el porcentaje de aislamiento de *Campylobacter* termotolerante fue del 41,0%; siendo menor a lo obtenido en Colombia⁽⁶⁰⁾, donde se obtuvo un 76,1% en una planta avícola; así como, en EE.UU.⁽⁴⁴⁾, se registró un 63,6% de aislamiento en “*pollos broiler*”; por otro lado, en la ciudad de Iquitos⁽⁴⁰⁾, se observó un porcentaje de aislamiento de 35,0% en “*pollos con confinamiento*”. Respecto a esto, en años anteriores, la comercialización de los pollos de granja se efectuaba en volúmenes menores a diferencia de la actualidad; que, debido a la alta demanda de la población humana dicha producción se incrementó considerablemente, favoreciendo la transmisión de *Campylobacter*. Esta indagación realizada, muestra que la variación del porcentaje de aislamiento en *Campylobacter* es dependiente de las medidas de saneamiento aplicadas en cada localidad, las cuales son de suma importancia para disminuir dichas cifras; en tal sentido, los factores de riesgos en esta población de pollos, caracterizados por el volumen de la producción avícola intensiva actual, las limitaciones de espacio, la frecuente falta de limpieza de las áreas de crianza como de los puntos de ingesta de alimentos, los cuales son muy resaltantes e influyen directa o indirectamente en los porcentajes de infección de *Campylobacter* en pollos de granja.

Mientras que, en los pollos de vida libre en el presente estudio, el porcentaje de aislamiento de *Campylobacter* termotolerante fue de 28,0%. A diferencia de Ecuador⁽⁵⁰⁾, el cual obtuvo un porcentaje de 41,7% en “*pollos de traspatio*”; así como, en la ciudad de Iquitos⁽⁴⁰⁾, se reportó un 54,0% de aislamiento en

“*pollos sin confinamiento*”, cifras mayores a lo encontrado. Esta diferencia explica a que esta población de pollos, debido a sus distintivos factores de riesgo tales como la exposición parcial al medio ambiente, a los cambios climáticos, a aguas servidas, la interacción con otras clases de animales y sus excrementos, propias de una crianza compartida; recalcando que este tipo producción es mínima y generalmente sólo para satisfacción alimenticia familiar.

En tal sentido, las razones encontradas a estas variaciones en las poblaciones de pollos, atribuyen a que las diferentes prácticas de crianza de pollos presentan distintos factores de riesgos que favorecen la propagación de *Campylobacter*, siendo estos puntos claves de intervención para disminuir en gran medida los porcentajes de infección de *Campylobacter* en pollos de granja y vida libre.

Cabe destacar que las especies *C. jejuni* y *C. coli*, son patógenos entéricos reconocidos en el mundo, sobre todo en países en desarrollo, donde regularmente no existe vigilancia ni estudio de brotes⁽¹⁰⁾. En el presente estudio fueron aisladas exitosamente ambas especies, pero no se consiguió aislar a la especie *C. lari*, ya que dicha especie presenta una baja prevalencia en muestras fecales y carne cruda de pollo⁽¹⁷⁾, además de ser reservorio principal en aves marinas (gaviotas)^(18,40) y a ciertos factores vinculados al agua, los cuales que son primordiales para su crecimiento, tales como las aguas contaminadas por contenidos fecales de dichas aves, alta prevalencia de lluvias y altas temperaturas, las cuales son recurrentes en nuestra región. En tal sentido, la probabilidad sería mayor en pollos de vida libre, por el acceso a las condiciones mencionadas, las cuales no están presentes en los pollos

de granja, que generalmente el contacto con el medio exterior tiende a ser restringidas, así como las estrategias de cuidado y saneamiento, que al parecer evitan que existan posibles infecciones para con esta última especie.

De modo similar en el presente estudio, la población de pollos de granja, *C. jejuni* tuvo un mayor predominio con 22,0% a comparación de *C. coli* con 19,0% y en cuanto a la población de pollos de vida libre, la cepa predominante fue *C. coli* con 18,0% y *C. jejuni* con 10,0%. Varios autores^(40,45,62), reflejan predominancia de *C. jejuni*, aislándose en pollos de distintos tipos de producciones, generalmente intensivas; en un reporte de la UE⁽⁴¹⁾, muestra la predominancia de *C. coli* en “*pollos criados con libertad*” y a la mayoría de edad de las aves como principales factores de colonización para esta especie, es decir en los pollos más jóvenes predomina la colonización por *C. jejuni* y con el paso del tiempo, la predominancia cambia por *C. coli*⁽¹⁸⁾. En este sentido en el presente estudio, los pollos de vida libre cumplirían las características antes mencionadas, ya que dichas aves han tenido contacto con aguas estancadas contaminadas y que la mayoría de los ejemplares se encontraban en la etapa adulta de su desarrollo, a comparación con los pollos de granja, que por lo general solo llegan hasta su etapa juvenil, antes de ser sacrificados. Sin embargo, ambas especies de *Campylobacter* son muy frecuentemente aislados especialmente en ambas poblaciones de pollos.

En definitiva, con el objetivo de conocer la susceptibilidad antimicrobiana de las especies aisladas de *Campylobacter* a partir de muestras fecales de pollos de vida libre y de granja, se empleó el método de disco difusión o Kirby – Bauer modificado, ya que esta técnica es comúnmente empleada para microorganismos de crecimiento rápido⁽¹¹¹⁾, siendo relacionadas con los puntos

de corte establecidos por la CLSI y BSAC a los antibióticos empleados, siendo estudiados en concentraciones estandarizadas para el tratamiento de infecciones de *Campylobacter* y *Enterobacteriaceae*.

Gran parte de estos antibióticos se encuentran en diversos productos agrícolas (POLLÓN, LINDA GALLINITA, CLORAFEN, DAIMEVIC T, SULFAMUNE, DIAMETON® T), estos son utilizados principalmente para la prevención y tratamiento de enfermedades diarreicas (gastrouritarias) como respiratorias, los cuales son administrados previa indicación; sin embargo, estos productos no hacen mención a *Campylobacter* de manera específica, siendo encontradas como parte de las Gram negativas. Esto puede deberse a que sea necesario que dichos productos sean relacionados directamente a *Campylobacter* spp. y a la efectividad de estos frente a esta bacteria.

La utilización de los antibióticos de primera y segunda línea de distintas familias en la investigación, corresponde a la importancia en su aplicación clínica, agrícola y su monitoreo debido al alto impacto en la salud pública⁽⁵⁵⁾, como los macrólidos (eritromicina y azitromicina) por el aumento de cepas de *Campylobacter* resistentes en casos clínicos y veterinarios; quinolinas (ácido nalidíxico y ciprofloxacina) por su uso en la industria avícola, carbapenem (imipenem) antibiótico de amplio espectro y su administración para tratar infecciones graves, a diferencia de los otros antibióticos (tetraciclina, gentamicina, amoxicilina + ácido clavulánico, cloranfenicol y trimetoprima – sulfametoxazol) de amplio uso clínico contra las infecciones bacterianas.

En cuanto a los macrólidos, en este estudio se observaron altos porcentajes de resistencia en cepas de *Campylobacter* aisladas de pollos de granja; a

comparación con los pollos de vida libre, que obtuvieron una alta sensibilidad en este grupo alcanzando el 100%. La resistencia a eritromicina como azitromicina en las cepas aisladas de pollos de granja, fue entre 59,1 – 79%; presentando en *C. coli* un mayor porcentaje de resistencia que *C. jejuni* para ambos macrólidos; en un estudio similar, en Brasil⁽⁶²⁾, se demostró que la resistencia a este antibiótico varía entre especies en carcasas de pollos, determinando a *C. coli* con mayor resistencia que *C. jejuni*. Es probable que *C. coli* tendría una mejor adaptación a condiciones ambientales desfavorables y mejores mutaciones en genes de resistencia ante antibióticos de diversos espectros. No obstante, las cifras encontradas están por debajo a lo reportado, en Chile⁽⁵⁵⁾ con 92,6% de resistencia, realizado en carne de pollos. Sin embargo⁽⁵¹⁾, se informó un 57,9% de resistencia a eritromicina, efectuado en heces de cerdo. Asimismo, en Lagos (Nigeria)⁽¹⁾, se demostró en muestras fecales de pollos, que los aislados de *Campylobacter* mostraron una disminución en la susceptibilidad; es decir, el 62,5% fue intermedio o moderadamente sensible, posibilitando que estas cepas con el tiempo sean resistentes a la eritromicina. Estos reportes demuestran que el incremento de resistencia en *Campylobacter* continúa en la actualidad, tanto en las cepas de origen humano como animal; dicha resistencia en los macrólidos, podría ser deberse a los tratamientos empíricos en medicina humana y veterinaria, ya que estos son administrados en su mayoría sin ejecutar pruebas de susceptibilidad.

A partir de la década de los 90, la resistencia de *Campylobacter* a fluoroquinolonas se ha incrementado rápidamente en diferentes países, reconociéndose como un problema emergente de salud pública⁽³¹⁾. En esta

investigación se observaron porcentajes más elevados de resistencia en las cepas de *Campylobacter* aislados en pollos de granja frente a pollos de vida libre. La resistencia a ciprofloxacina y ácido nalidíxico en *C. jejuni* y *C. coli* aislados de pollos de granja fue de 100%; como en Brasil⁽⁴⁸⁾, se reportaron resultados similares en “*pollos de engorde*”, a los que obtenidos en la investigación; asimismo en España⁽⁵⁶⁾, se obtuvo una resistencia de 95% para ciprofloxacina y un 91,67% para ácido nalidíxico en cepas aisladas de “*avícolas*”, demostrando la alarmante situación para estos antibióticos; en Costa Rica⁽⁶¹⁾, se afirmó que en la mayoría de las cepas existía una similitud en los patrones de resistencia, incluyendo a las quinolonas como la más frecuente. Sin embargo, en Australia⁽⁶³⁾, se reportó una mínima resistencia a este grupo de antibióticos en pollos, con un rango de 85,2 - 94,8 % de sensibilidad, explicando que los pollos estudiados no recibieron ningún tratamiento de fluoroquinolonas en su ciclo de vida; esto revela la diversidad genética y sensibilidad natural del *Campylobacter* frente a este grupo. Los niveles de resistencia a fluoroquinolonas podrían deberse al uso desmedido de estos fármacos en la industria avícola, principalmente de enrofloxacin, cuyo metabolito activo es ciprofloxacina⁽⁸⁰⁾, estos se encuentran en productos conocido como “LINDA GALLINITA” y “CLORAFEN”, los cuales son de administración oral y son utilizados como antibióticos de amplio espectro para la prevención y el tratamiento de enfermedades diarreicas y respiratorias, sin embargo como la no regulación de uso de antibióticos como promotores del crecimiento, lo cual sucede en la mayoría de avícolas en nuestro país, los cuales son comercializados de manera libre.

Por otro lado, la resistencia a tetraciclina en las cepas de *Campylobacter*, ha presentado altos porcentajes de resistencia en los aislados de pollos de granja con 73,7 % (*C. coli*) y 90% (*C. jejuni*), mientras los aislados de pollos vida libre obtuvieron hasta un 61,1%. En Grecia⁽⁴⁷⁾, se obtuvo una resistencia de 71,0% en “*pollos de engorde*”, dato similar a nuestro estudio; sin embargo, en Brasil⁽⁴⁹⁾, se obtuvo un 35,0% de resistencia a tetraciclina en pollos, cifra inferior a lo obtenido; al igual que, en Australia⁽⁶³⁾, se registró un 22% en pollos que no recibieron ningún tratamiento de fluoroquinolonas en su ciclo de vida. La oxitetraciclina, utilizada en la producción animal en la actualidad, es administrada de manera terapéutica y/o profiláctica⁽⁸¹⁾, generando resistencia a tetraciclinas en *Campylobacter* spp. por el gen *tet(O)*, transferible entre las cepas de *C. jejuni* y *C. coli*⁽⁵¹⁾. De acuerdo a esto, dicha resistencia se ve favorecida a la inadecuada administración de las concentraciones de producto agrícola “POLLON” en la dieta de los pollos, el cual favorece al aumento de la resistencia en las cepas de *Campylobacter*.

En cuanto a trimetoprima – sulfametoxazol, se observaron altos porcentajes de resistencia en las cepas de *Campylobacter* aisladas de pollos de vida libre, teniendo entre 44,4 - 90% y en pollos de granja el rango de resistencia fue entre 90 - 100%. Datos similares encontrados en Ecuador⁽⁵⁸⁾, con un 100% de resistencia a este antibiótico en “*pollos faenados*”; a diferencia que, en México⁽⁵²⁾, se reportó un 70% de resistencia para *Campylobacter* spp, en pacientes en un hospital, resultado dentro del rango encontrado en este estudio. Esta resistencia se fundamentaría en que las sulfonamidas aún tienen un papel en la terapéutica aviar, al ser combinadas con el trimetoprima⁽⁸¹⁾, esto se evidencia en ciertos productos agrícolas como DIAMEVIC T,

DAIMETON T y SULFAMUNE, los cuales presenta además otros antibióticos además de trimetoprima con la finalidad de combatir infecciones diarreicas y respiratorias en aves; es importante señalar que, en ninguno de estos productos mencionados hacen suma referencia a *Campylobacter* como parte de las indicaciones.

En relación a la OMS en el 2017, dicha entidad publicó una lista de bacterias “prioritarias” resistentes, encontrándose entre estas a *Campylobacter*, destacando la urgente necesidad de búsqueda de nuevos antibióticos para combatir a estos microorganismos⁽³⁴⁾. En cuanto a esto, en la presente investigación se encontraron cepas sensibles de *Campylobacter* spp a cloranfenicol y imipenem con un porcentaje del 100% de sensibilidad, tanto en los pollos de granja como en los pollos de vida libre, ofreciendo de esta manera una alternativa clínica contra especies de *Campylobacter* multiresistentes; estos resultados se asemejan a los registrados en Japón⁽⁵⁷⁾, en “humanos y pollos” que reportaron una resistencia nula de *Campylobacter* spp. para estos dos antibióticos; así como en Brasil⁽⁵⁹⁾, se reportó 100% de sensibilidad a cloranfenicol en cepas de *Campylobacter* aislados de diferentes animales, demostrando así una alta sensibilidad para este antibiótico.; sin embargo, en México⁽⁵²⁾, se registró un 5% de resistencia a cloranfenicol en pacientes con gastroenteritis aguda; Así como, en Túnez⁽⁵⁴⁾, se encontró un 88,6% de resistencia en “*pollos de engorde*”; de igual manera, en Nigeria⁽¹⁾, se documentó un 100% de resistencia en pollos y gallinas de varias granjas, dato que contrarresta a lo encontrado. Respecto a esto, cloranfenicol podría considerarse como una alternativa terapéutica en casos de enteritis en la región; no obstante, es importante considerar su vigilancia, ya que con el paso

del tiempo cloranfenicol podría perder efectividad en el tratamiento de enteritis contra *Campylobacter*. Mientras que, imipenem podría ser la mejor alternativa para las infecciones sépticas por campilobacteriosis, ya que dicho antibiótico no es utilizado o poco considerado como parte de la dieta suplementaria en la industria avícola; sin embargo, en el estudio ambos antibióticos presentaron una gran efectividad al exponerlas frente a las especies de *Campylobacter*.

En relación a gentamicina, en nuestro estudio las cepas de *Campylobacter* aisladas de pollos de granja, registró porcentajes de resistencia entre 50 - 68,4% y en los pollos de vida libre, se observaron altos rangos de sensibilidad de entre 88,9 - 90,0%, resultados pocos similares en Túnez⁽⁵⁴⁾, señaló un 12,9% de resistencia a gentamicina en *Campylobacter* spp. en muestras fecales de “*pollos broiler*”; así como, en Nigeria⁽¹⁾, se registró un 75,0% de resistencia en *C. coli* en muestras fecales de pollos y gallinas de granjas, dato que contrasta lo obtenido en el estudio, al igual que, en Brasil⁽⁶²⁾, se documentó un 50,0% de resistencia en cepas de *C. jejuni* y *C. coli* en carcasas de pollos refrigerados. No obstante, en Argelia⁽⁴⁶⁾, se reportó un 100% de sensibilidad a este antibiótico en muestras fecales y pieles de cuello de pollos de granja; dato similar en Australia⁽⁶³⁾, se documentó sensibilidad en casi todas las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas de contenido cecal de pollos; así como, en Brasil⁽⁵⁹⁾, todas las cepas de *Campylobacter* spp aisladas de diversos animales, fueron sensibles a gentamicina; de igual manera, en Italia, se en Italia⁽⁴⁵⁾, se registró un 83,3% de sensibilidad en cepas de *C. jejuni*, en cambio en *C. coli* presentó un porcentaje de resistencia del 66.7% en una colección de *C. jejuni* y *C. coli* de “*pollos de engorde*”; del mismo modo, en Argentina⁽⁵³⁾, se encontró un 92,0% de sensibilidad a gentamicina en lotes de

pollos destinados para uso comestible. Esta diferencia puede deberse a que la gentamicina en diferentes países, es utilizada en mayor o menor medida en la producción de pollos de granja, encontrando diversos registros de susceptibilidad antimicrobiana y una alarmante resistencia en cepas de *Campylobacter*, la utilización de productos agropecuarios como el “TAYLOSINA I FORTE”, el cual presenta sulfato de gentamicina como parte de sus compuestos, es administrado en concentraciones inadecuadas a los volúmenes estandarizados, causando así una progresiva resistencia a este antibiótico. En contraste a los pollos de vida libre, en donde no es necesaria en el mayor de los casos la administración de gentamicina durante su desarrollo aviar.

Además, para amoxicilina + ácido clavulánico en las cepas aisladas de *Campylobacter*, la especie *C. jejuni* obtuvo una alta sensibilidad en los pollos de granja (68,2%) y de vida libre (80,0%) correspondientemente. Así como, *C. coli* presentó altos porcentajes de resistencia en los pollos de granja (73,7%) y de vida libre (50,0%) respectivamente. En Argelia⁽⁴⁶⁾, se registró un 46,6% de resistencia a amoxicilina + ácido clavulánico de *Campylobacter* en muestras fecales y pellejos de cuellos en pollos de granja, resultado inferior al estudio. Sin embargo, en Túnez⁽⁵⁴⁾, en muestras fecales de “*pollos broiler*”, mostró un 52,7% de resistencia en *C. jejuni* y un 34,1% en *C. coli* a este antibiótico; no obstante, en Italia⁽⁴⁵⁾, se registró un 83,3% de sensibilidad en cepas de *C. jejuni*, en cambio en *C. coli* presentó un porcentaje de resistencia del 66.7% en una colección de *C. jejuni* y *C. coli* de “*pollos de engorde*”, señalando una cierta similitud a los resultados de susceptibilidad encontrados en los pollos de granja. Estos porcentajes de resistencias revelarían que

Campylobacter presenta β – lactamasas en las proteínas de unión para amoxicilina + ácido clavulánico⁽⁸³⁾, el cual impide el efecto del antibiótico. Sin embargo, la susceptibilidad encontrada, puede darse gracias a la presencia de porinas en la pared de ésta bacteria, la cual facilitaría el ingreso de moléculas de otro tipo de antibiótico, a pesar de la existencia de β – lactamasas presentes en la bacteria.

Así mismo, se manifiesta que el uso inadecuado e indiscriminado de antibióticos en la industria avícola repercute en la respuesta inmune de los pollos, modulando la microbiota intestinal en donde se encuentra *Campylobacter*, teniendo en cuenta los criterios de herencia y adaptación, las generaciones futuras dependen netamente de sus antecesores; ya que la variabilidad genética en el caso de los pollos de granja, por ser individuos híbridos, tienden a no ser muy dinámico, gracias a los procesos rutinarios de la crianza de estos especímenes lo cual conlleva a efectos de endogamia. Sin embargo, los pollos de vida libre, considerándolos de linajes puros, tienden a reflejar fenotipos y genotipos diversos adquiridos en la selección natural; cabe recalcar que este grupo de población de aves, no presentan alteración genética y es poca o nula la administración de antibióticos. Ya que, al comparar la susceptibilidad de *Campylobacter* de ambas poblaciones, reflejan más susceptibilidad las cepas provenientes de los pollos de vida libre, y más resistencia las cepas de pollos de granja.

En relación al agente – hospedero, *Campylobacter* en el presente estudio, tiende a presentar patrones de resistencia lo cual puede tener una correlación negativa en la salud del animal, si bien es cierto se han adaptado muy bien a los pollos, pero puede repercutir en la vida de los seres humanos al poseer

genes de resistencia para los antibióticos de uso clínico, quedando en evidencia que en el Perú, no existe una regulación estricta para la venta de antibióticos, mucho menos para el uso destinado en animales.

CAPITULO VI: CONCLUSIONES

1. Se aislaron 69 cepas de *Campylobacter* termotolerantes a partir de las muestras fecales de pollos; (41) correspondieron a pollos de granja y (28) a pollos de vida libre.
2. Se identificaron 32 cepas de *C. jejuni* y 37 de *C. coli* a través de las pruebas bioquímicas; para las cepas aisladas de pollos de granja fueron identificadas (22) cepas de *C. jejuni* y (19) de *C. coli*; en los pollos de vida libre se identificaron (10) cepas de *C. jejuni* y (18) de *C. coli*.
3. Se confirmaron las 69 cepas de *Campylobacter*, mediante la detección de los genes *16S* y *cadF*, a través del PCR semi – cuantitativo.
4. La susceptibilidad antimicrobiana de *C. jejuni* en pollos de granja muestra alta sensibilidad a imipenem, cloranfenicol, amoxicilina + ácido clavulánico y gentamicina; y resistencia a ácido nalidíxico, ciprofloxacina, tetraciclina, trimetoprima – sulfametoxazol, eritromicina y azitromicina. En *C. coli* se observa alta sensibilidad a imipenem y cloranfenicol; y resistencia a los demás antibióticos del estudio (multiresistente).

La susceptibilidad antimicrobiana de *C. jejuni* en pollos de vida libre, presenta alta sensibilidad a imipenem, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, amoxicilina + ácido clavulánico, azitromicina, ácido nalidíxico; y resistencia a tetraciclina, trimetoprima – sulfametoxazol y ciprofloxacina. En *C. coli* se registra alta sensibilidad a imipenem, cloranfenicol, eritromicina, azitromicina, gentamicina y trimetoprima – sulfametoxazol; y resistencia a ácido nalidíxico, ciprofloxacina, tetraciclina y amoxicilina + ácido clavulánico. De tal manera que, en los pollos de vida

libre, las cepas aisladas de *C. jejuni* y *C. coli*. presentan una importante susceptibilidad.

5. Comparando la susceptibilidad de *Campylobacter* termotolerantes según procedencia de aislamiento, las poblaciones de cepas aisladas en pollos de vida libre presentaron mayor sensibilidad que las cepas aisladas de pollos de granja; sin embargo, estas son más resistentes a ciprofloxacina, ácido nalidíxico, trimetoprima – sulfametoxazol, gentamicina y eritromicina.

CAPITULO VII: RECOMENDACIONES

- Realizar los futuros estudios de susceptibilidad antimicrobiana obteniendo muestras fecales, directamente de las granjas y comparar la prevalencia de campilobacteriosis con los centros de comercialización de pollos de la ciudad; además, efectuar futuros estudios en poblaciones de pollos de vida libre de otras comunidades periurbanas de la ciudad.
- Evitar exponer a las cepas de *Campylobacter* a cambios bruscos de temperatura por tiempos prolongados, ya que ello puede causar problemas en el crecimiento e incluso la pérdida de la cepa.
- Implementar el uso de primers específicos para elevar la sensibilidad en la identificación de especies de *Campylobacter* termotolerantes, en lugar de pruebas bioquímicas de menor sensibilidad.
- Implementar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana con el uso de cefalosporinas de I, II y III generación, colistina y derivados de las penicilinas como amoxicilina, ampicilina, carbapenemes y otros minoglicósidos de uso frecuente en medicina clínica y veterinaria.
- Para obtener mejores resultados en el crecimiento de *Campylobacter* para la prueba de susceptibilidad en el agar Müller Hinton, enriquecer con sangre al 5%.
- Implementar un Comité de supervisión y vigilancia de alto nivel en la prescripción y uso de los antibióticos destinados a la avicultura, que funcione en la universidad, colegio profesional de medicina veterinaria y el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) del MINAGRI.

CAPITULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Ogbor O, Ajayi A, Zautner AE, Smith SI. Antibiotic susceptibility profiles of *Campylobacter coli* isolated from poultry farms in Lagos Nigeria – A pilot study. *Eur J Microbiol Immunol*. junio de 2019;9(2):32-4.
2. Komba E, Mdegela R, Msoffe P, Matowo D, Maro M. Occurrence, species distribution and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter* isolates from farm and laboratory animals in Morogoro, Tanzania. *Vet World*. 3 de agosto de 2014;7:559-65.
3. Lee J, Jeong J, Lee H, Ha J, Kim S, Choi Y, et al. Antibiotic Susceptibility, Genetic Diversity, and the Presence of Toxin Producing Genes in *Campylobacter* Isolates from Poultry. *Int J Environ Res Public Health*. 17 de noviembre de 2017;14(11):1400.
4. Weiler N, Orrego M, Alvarez M, Huber C, Ortiz F, Nuñez L, et al. First results of the comprehensive surveillance of the antimicrobial resistance of foodborne pathogens, *Campylobacter* spp . and *Salmonella* spp ., in three different populations. Paraguay, 2011-2012. *Mem Inst Investig En Cienc Salud*. 31 de agosto de 2017;15(2):64-72.
5. OMS. *Campylobacter* [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2018 [citado 19 de enero de 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>
6. Boletín Epidemiológico del Perú [Internet]. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades; 2018. 1205-1210 p. (27; vol. 51). Disponible en: www.dge.gob.pe
7. Lapierre A. L. Factores de virulencia asociados a especies zoonóticas de *Campylobacter* spp. *Av En Cienc Vet* [Internet]. 2 de septiembre de 2013 [citado 11 de febrero de 2019];28(1). Disponible en: <http://www.avancesveterinaria.uchile.cl/index.php/ACV/article/view/27866>
8. Salcedo Falcon CA. Formación de biopelículas en cepas de *Campylobacter* termotolerantes aisladas durante el proceso de faenamiento de pollos broiler [Tesis de maestría]. [Santiago de Chile]: Universidad de Chile; 2020.
9. Igwaran A, Okoh AI. Human campylobacteriosis: A public health concern of global importance. *Heliyon* [Internet]. 14 de noviembre de 2019 [citado 2 de junio de 2020];5(11). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6861584/>
10. Simaluiza R, Toledo Z, Fernández H. Prevalencia y caracterización del perfil de susceptibilidad antimicrobiana de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en niños con diarrea de la ciudad de Loja, Ecuador. *Rev Chil Infectol*. abril de 2018;35(2):213-5.

11. Riveros M, Ochoa TJ. Enteropatógenos de importancia en salud pública. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2 de abril de 2015;32(1):157.
12. Schiaffino F, Colston JM, Paredes-Olortegui M, François R, Pisanic N, Burga R, et al. Antibiotic resistance of *Campylobacter* species in a pediatric cohort study. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 29 de enero de 2019 [citado 22 de marzo de 2019];63(2). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6355604/>
13. Bian X, Garber JM, Cooper KK, Huynh S, Jones J, Mills MK, et al. *Campylobacter* Abundance in Breastfed Infants and Identification of a New Species in the Global Enterics Multicenter Study. Young VB, editor. mSphere. 15 de enero de 2020;5(1):e00735-19, /msphere/5/1/msphere735-19.atom.
14. François R, Yori PP, Rouhani S, Sigvas Salas M, Paredes Olortegui M, Rengifo Trigoso D, et al. The other *Campylobacters*: Not innocent bystanders in endemic diarrhea and dysentery in children in low-income settings. Vinetz JM, editor. PLoS Negl Trop Dis. 7 de febrero de 2018;12(2):e0006200.
15. Facciola A, Riso R, Avventuroso E, Visalli G, Delia SA, Laganà P. *Campylobacter*: from microbiology to prevention. J Prev Med Hyg. junio de 2017;58(2):E79-92.
16. Same RG, Tamma PD. *Campylobacter* Infections in Children. Pediatr Rev. noviembre de 2018;39(11):533-41.
17. Rowe MT, Madden RH. CAMPYLOBACTER | Introduction. En: Batt CA, Tortorello ML, editores. Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition) [Internet]. Oxford: Academic Press; 2014 [citado 9 de julio de 2020]. p. 351-6. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300000525>
18. Mardones P G, López M J, Mardones P G, López M J. Implicancias de *Campylobacter* spp. como patógeno alimenticio. Chil J Agric Amp Anim Sci. mayo de 2017;33(1):73-83.
19. Giacoboni G, Cerdá RO, López C. Emergencia a la resistencia antibiótica en cepas de *Campylobacter jejuni* aisladas de carne de pollo. Analecta Vet [Internet]. 2001 [citado 14 de enero de 2019];21, n.º 2. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10915/11132>
20. Orrego M, Weiler N, Portillo R, Lird G, Acosta L, Ortiz F, et al. Síndrome diarreico agudo causado por *Campylobacter* spp. en pacientes menores de 11 años y su resistencia antimicrobiana a las drogas de elección para tratamiento 2010-2012, Paraguay. Pediatría Asunción. 2014;41(2):127-30.
21. Humphrey S, Chaloner G, Kemmett K, Davidson N, Williams N, Kipar A, et al. *Campylobacter jejuni* Is Not Merely a Commensal in Commercial

Broiler Chickens and Affects Bird Welfare. mBio. 1 de julio de 2014;5(4):e01364-14, mBio.01364-14.

22. Cantero Portillo JG. *Campylobacter* spp. en granjas de pollos de engorde: diversidad genética, resistencia antimicrobiana y factores de virulencia [Tesis de doctorado]. [Bellaterra]: Universitat Autònoma de Barcelona; 2017.
23. Paredes Panduro LJ, Pereira Reategui JA. Análisis de la comercialización del pollo en la ciudad de Iquitos, periodo 2015 [Internet] [Tesis de maestría]. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; 2015 [citado 11 de febrero de 2019]. Disponible en: <http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/handle/UNAP/4198>
24. Ge M-C, Kuo S-F, Chang S-C, Chien C-C, You H-L, Lu J-J. Antimicrobial Susceptibility and Virulence Surveillance of *Campylobacter* spp. Isolated From Patients in Two Tertiary Medical Centers in Taiwan. Front Microbiol. 7 de enero de 2019;9:3186.
25. Kassem II, Kehinde O, Kumar A, Rajashekara G. Antimicrobial-Resistant *Campylobacter* in Organically and Conventionally Raised Layer Chickens. Foodborne Pathog Dis. enero de 2017;14(1):29-34.
26. Rossler R, Romero Scharpen A, Berisvil A, Sirini N, Saluzzo M, Zimmermann J, et al. Influencia de vectores y fómites en la transmisión de *Campylobacter* termotolerante en crianzas sucesivas de pollos parrilleros en granjas avícolas [Internet]. Esperanza; 2018 [citado 22 de enero de 2020]. Disponible en: http://www.fcv.unl.edu.ar/media/investigacion/JornadaFCV2018/fscomm and/SP_ROSSLER_INFLUENCIA.pdf
27. Zhiñin Guerrero MB. Crianza de pollos camperos para el mejoramiento de la economía familiar en zona urbana marginal [Tesis de titulación]. [Babahoyo, Los Rios, Ecuador]: Universidad Técnica de Babahoyo; 2019.
28. Cota-Rubio E. Resistencia a antibióticos de cepas bacterianas aisladas de animales destinados al consumo humano. Rev Iberoam Cienc. 2014;1:11.
29. Peralta F-U, Nilson M, Miazzo A. Nutrición aviar: alternativas naturales para optimizar la funcionalidad gastrointestinal. 1 de enero de 2019;4:103-9.
30. Lucas L. J, Vilca L. M, Ramos D D. Presencia de *Campylobacter* spp en canales y ciegos de pollos de engorde en Lima, Perú. Rev Investig Vet Perú. agosto de 2013;24(3):346-52.
31. González-Abad MJ, Alonso-Sanz M. Incidencia y sensibilidad de *Campylobacter jejuni* en pacientes pediátricos: Implicación en bacteremia. Rev Esp Quimioter. 2016;26(2):92-6.

32. Resolución directoral. Disponen prohibir la importación, comercialización, fabricación o elaboración de productos veterinarios que contengan el principio activo colistina (Polimixina E) o cualquiera de sus sales y dictan diversas disposiciones. Sec. Agricultura y riesgo, 0091-2019-MINAGRI-SENASA-DIAIA nov 28, 2019 p. 6-9.
33. Moya-Salazar J, Terán-Vásquez A, Salazar-Hernández R. Alta resistencia antimicrobiana a Fluoroquinolonas por *Campylobacter* en pacientes pediátricos de un hospital peruano. Rev Peru Med Exp Salud Pública. marzo de 2018;35:156-8.
34. OMS. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Internet]. 2017 [citado 17 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
35. Cha W, Mosci R, Wengert SL, Singh P, Newton DW, Salimnia H, et al. Antimicrobial Susceptibility Profiles of Human *Campylobacter jejuni* Isolates and Association with Phylogenetic Lineages. Front Microbiol [Internet]. 26 de abril de 2016 [citado 19 de mayo de 2020];7. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00589/abstract>
36. Sack DA, Lyke C, McLaughlin C, Suwanvanichkij V. Antimicrobial resistance in shigellosis, cholera and campylobacteriosis. 2001;(WHO/CDS/CSR/DRS/2001.8):56.
37. Rivera F N, Bustos B R, Montenegro H S, Sandoval M M, Castillo N J, Fernández J H, et al. Genotipificación y resistencia antibacteriana de cepas de *Campylobacter* spp. aisladas en niños y en aves de corral. Rev Chil Infectol. diciembre de 2011;28(6):555-62.
38. OPS, González Ayala SE, Cecchini DM. Diagnóstico e investigación epidemiológica de las ETAs [Internet]. Organización Panamericana de la Salud. [citado 29 de enero de 2020]. Disponible en: <http://new.paho.org/arg/publicaciones/publicaciones%20virtuales/libroETAs/modulo2/modulo2e.html>
39. Riddle MS, Tribble D. Preface: Guidelines for the Treatment of Travelers' Diarrhea in Deployed Military Personnel. Mil Med. septiembre de 2017;182(S2):1-3.
40. Tresierra-Ayala A, Fernández H, Bendayán ME, Pereyra G, Bernuy A. Aislamiento de especies termotolerantes de *Campylobacter* en dos poblaciones de pollos criados con y sin confinamiento. Rev Saúde Pública. octubre de 1995;29:389-92.
41. EFSA. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella*

on broiler carcasses, in the EU, 2008. Parma, Italy: European Food Safety Authority; 2010. Report No.: 8.

42. Powell LF, Lawes JR, Clifton-Hadley FA, Rodgers J, Harris K, Evans SJ, et al. The prevalence of *Campylobacter* spp. in broiler flocks and on broiler carcasses, and the risks associated with highly contaminated carcasses. *Epidemiol Infect.* diciembre de 2012;140(12):2233-46.
43. Eguiguren G, Angeles M de los. Determinación de la sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas de deyecciones de aves, carnes de pollos broiler y pacientes humanos [Internet]. [Santiago de Chile]: Universidad de Chile; 2013 [citado 5 de marzo de 2019]. Disponible en: <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/131568>
44. Berghaus RD, Thayer SG, Law BF, Mild RM, Hofacre CL, Singer RS. Enumeration of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in Environmental Farm Samples and Processing Plant Carcass Rinses from Commercial Broiler Chicken Flocks. *Appl Environ Microbiol.* 1 de julio de 2013;79(13):4106-14.
45. Giacomelli M, Salata C, Martini M, Montesissa C, Piccirillo A. Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from poultry in Italy. *Microb Drug Resist Larchmt N.* abril de 2014;20(2):181-8.
46. Messad S, Hamdi T-M, Bouhamed R, Ramdani-Bougoussa N, Tazir M. Frequency of contamination and antimicrobial resistance of thermotolerant *Campylobacter* isolated from some broiler farms and slaughterhouses in the region of Algiers. *Food Control.* junio de 2014;40:324-8.
47. Economou V, Zisides N, Gousia P, Petsios S, Sakkas H, Soultos N, et al. Prevalence and antimicrobial profile of *Campylobacter* isolates from free-range and conventional farming chicken meat during a 6-year survey. *Food Control.* octubre de 2015;56:161-8.
48. Frasão BS, Côrtes LR, Nascimento ER, Cunha NC, Almeida VL, Aquino MHC. Detecção de resistência às fluoroquinolonas em *Campylobacter* isolados de frangos de criação orgânica. *Pesqui Veterinária Bras.* julio de 2015;35(7):613-9.
49. Sierra-Arguello YM, Morgan RB, Perdoncini G, Lima LM, Gomes MJP, Nascimento VP do. Resistance to β -lactam and tetracycline in *Campylobacter* spp. isolated from broiler slaughterhouses in southern Brazil. *Pesqui Veterinária Bras.* julio de 2015;35(7):637-42.
50. Ochoa S, Simaluiza RJ, Toledo Z, Fernández H. Frequency and antimicrobial behaviour of thermophilic *Campylobacter* species isolated from Ecuadorian backyard chickens. *Arch Med Vet.* 2016;48(3):311-4.

51. Pulgar Cáceres DE. Determinación de la sensibilidad antimicrobiana en cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas en bovinos de carne y cerdos [Tesis de titulación]. [Santiago de Chile]: Universidad de Chile; 2016.
52. Novoa-Farías O, Frati-Munari AC, Peredo MA, Flores-Juárez S, Novoa-García O, Galicia-Tapia J, et al. Susceptibilidad de las bacterias aisladas de infecciones gastrointestinales agudas a la rifaximina y otros agentes antimicrobianos en México. Rev Gastroenterol México. enero de 2016;81(1):3-10.
53. López C, Giacoboni G, Sommerfelt I. Resistencia a antimicrobianos de *Campylobacter jejuni* aislados de pollos, provincia de Buenos Aires, Argentina. Rev Med Vet. 2017;98(3):8-12.
54. Gharbi M, Béjaoui A, Ben Hamda C, Jouini A, Ghedira K, Zrelli C, et al. Prevalence and Antibiotic Resistance Patterns of *Campylobacter* spp. Isolated from Broiler Chickens in the North of Tunisia. BioMed Res Int [Internet]. 2018 [citado 24 de febrero de 2020]; Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/7943786/>
55. Gutiérrez S, Orellana D, Martínez C, García Mena V, Gutiérrez S, Orellana D, et al. Caracterización de cepas de *Campylobacter jejuni* obtenidas desde carne de pollo y heces de aves de corral de la zona central de Chile. Rev Médica Chile. diciembre de 2017;145(12):1551-8.
56. Lonjedo Barceló R. Estudio de las resistencias antimicrobianas en *Campylobacter* termófilos aislados en producción avícola [Internet] [Tesis de maestría]. [Valencia]: Universitat Politècnica de València; 2017. Disponible en: <http://polipapers.upv.es/index.php/IA/article/view/3293>
57. Ohishi T, Aoki K, Ishii Y, Usui M, Tamura Y, Kawanishi M, et al. Molecular epidemiological analysis of human- and chicken-derived isolates of *Campylobacter jejuni* in Japan using next-generation sequencing. J Infect Chemother. marzo de 2017;23(3):165-72.
58. Dota Cabrera CS. Resistencia a antibióticos de uso veterinario en Enterobacterias y *Campylobacter* aisladas de pollos faenados expendidos en el Mercado «El Arenal» de Cuenca [Tesis de titulación]. [Ecuador]: Universidad del Azuay; 2017.
59. Brito CPT de, Dorneles EMS, Alves TM, Stynen APR, Lage AP. Antimicrobial susceptibility profile of *Campylobacter* spp. isolated from different animal species in Minas Gerais. Braz J Vet Res Anim Sci. 19 de mayo de 2017;54(1):54.
60. Delgado LFE. Determinación de la prevalencia de *Campylobacter* sp. en una planta avícola ubicada en el departamento del Meta [Tesis de titulación]. [Colombia]: Pontificia Universidad Javeriana; 2018.
61. Lazo Láscarez KS. Determinación de los perfiles de sensibilidad a antibióticos en bacterias del género *Campylobacter* spp. aisladas

de pollo de engorde en tres puntos de la cadena avícola en Costa Rica [Tesis de titulación]. [Campus Presbítero Benjamín Níñez, Heredia]: Universidad Nacional; 2018.

62. Silva PR, Palma JM, Souza NR, Moura HM de, Peregmanis S, Santana AP. Isolation and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* found in chilled chicken carcasses in the Federal District Region and surrounding areas. *Semina Ciênc Agrár*. 7 de agosto de 2019;40(5Supl1):2247.
63. Abraham S, Sahibzada S, Hewson K, Laird T, Abraham R, Pavic A, et al. Emergence of Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* among Australian Chickens in the Absence of Fluoroquinolone Use. Elkins CA, editor. *Appl Environ Microbiol*. 7 de febrero de 2020;86(8):e02765-19, /aem/86/8/AEM.02765-19.atom.
64. Silva J, Leite D, Fernandes M, Mena C, Gibbs PA, Teixeira P. *Campylobacter* spp. as a Foodborne Pathogen: A Review. *Front Microbiol* [Internet]. 2011 [citado 3 de enero de 2020];2. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2011.00200/abstract>
65. Mata Carranza MA. Resistencia a antimicrobianos y caracterización de factores de virulencia de cepas de *Campylobacter* spp. aisladas de pavos [Internet] [Tesis de maestría]. [Santiago de Chile]: Universidad de Chile; 2013 [citado 30 de enero de 2019]. Disponible en: <http://163.178.205.27:8080/xmlui/handle/123456789/86>
66. Levin RE. *Campylobacter jejuni*: A Review of its Characteristics, Pathogenicity, Ecology, Distribution, Subspecies Characterization and Molecular Methods of Detection. *Food Biotechnol*. 3 de diciembre de 2007;21(4):271-347.
67. Vargas U, Hely S. Epidemiología de *Campylobacter* spp. en granjas de pollos de engorde: Prevalencia, factores de riesgo y dinámica de infección [Internet]. 2016. Disponible en: <https://ddd.uab.cat/record/175837>
68. Vandamme P, Dewhirst FE, Paster BJ, On SLW. *Campylobacter* Sebald and Véron 1963, 907,AL emend. Vandamme, Falsen, Rossau, Hoste, Segers, Tytgat and De Ley 1991a, 98. En: Brenner DJ, Krieg NR, Garrity GM, Staley JT, Boone DR, Vos P, et al., editores. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* [Internet]. New York: Springer-Verlag; 2005 [citado 3 de enero de 2020]. p. 1147-60. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/0-387-29298-5_282
69. Butzler J-P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin Microbiol Infect*. octubre de 2004;10(10):868-76.
70. OMS. Estadísticas Sanitarias Mundiales. Organización Mundial de la Salud; 2011.

71. Crushell E, Harty S, Sharif F, Bourke B. Enteric *Campylobacter*: Purging Its Secrets? *Pediatr Res.* enero de 2004;55(1):3-12.
72. Mantilla MJ, Torres Sáez RG. Enfoque metagenómico para la caracterización del microbioma de aves corral. Revisión. *Rev Colomb Biotecnol.* 1 de julio de 2019;21(2):77-97.
73. Vargas T, Alexandra P. Caracterización morfológica, productiva y genética de la gallina criolla del Ecuador. Morphological, productive and genetic characterization of the creole chicken of Ecuador [Internet]. 2020 [citado 9 de agosto de 2020]; Disponible en: <http://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/19648>
74. Zhang Q, Sahin O. Campylobacteriosis. En: Swayne DE, Boulianne M, Logue CM, McDougald LR, Nair V, Suarez DL, et al., editores. *Diseases of Poultry* [Internet]. 1.ª ed. Wiley; 2020 [citado 3 de enero de 2020]. p. 754-69. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119371199.ch17>
75. Newell DG, Fearnley C. Sources of *Campylobacter* Colonization in Broiler Chickens. *Appl Environ Microbiol.* 1 de agosto de 2003;69(8):4343-51.
76. Gorkiewicz G, Feierl G, Schober C, Dieber F, Köfer J, Zechner R, et al. Species-Specific Identification of Campylobacters by Partial 16S rRNA Gene Sequencing. *J Clin Microbiol.* junio de 2003;41(6):2537-46.
77. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 8.ª ed. World Organisation for Animal Health; 2018. 1833 p. ((mammals, birds and bees); vols. 1, 2 y 3).
78. Dasti JI, Tareen AM, Lugert R, Zautner AE, Gross U. *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *Int J Med Microbiol IJMM.* abril de 2010;300(4):205-11.
79. OMS. Resistencia a los antibióticos [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2018 [citado 18 de febrero de 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibioticos>
80. Threlfall EJ. Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* infections and animal drug use. *Int J Infect Dis.* mayo de 2004;8(3):190-2.
81. Albuja Canova RI. Residuos de antimicrobianos en hígados de pollo comercializados en el Mercado de Modelo de Piura, por el método microbiológico de las tres placas [Tesis de titulación]. [Piura]: Universidad Nacional de Piura; 2015.
82. Martinez Rocha AK. Uso de Antimicrobianos en la Avicultura: sus implicaciones en la Salud Pública [Tesis de maestría]. [Bogotá]: Universidad Nacional de Colombia; 2012.

83. García C P, Valenzuela S N, Rodríguez L MV, León C E, Fernández J H. Susceptibilidad antimicrobiana de *Campylobacter jejuni* aislado de coprocultivos en Santiago de Chile. Rev Chil Infectol. diciembre de 2009;26(6):511-4.
84. Moreno M C, González E R, Beltrán C. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello. agosto de 2009;69(2):185-92.
85. Pérez-Cano HJ, Robles-Contreras A. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. Rev Médica MD. 2013;4.5(3):186-91.
86. Qin S, Wang Y, Zhang Q, Zhang M, Deng F, Shen Z, et al. Report of ribosomal RNA methylase gene erm(B) in multidrug-resistant *Campylobacter coli*. J Antimicrob Chemother. 1 de abril de 2014;69(4):964-8.
87. Frasão B da S, Medeiros V, Barbosa AV, de Aguiar WS, dos Santos FF, Abreu DL da C, et al. Detection of fluoroquinolone resistance by mutation in gyrA gene of *Campylobacter* spp. isolates from broiler and laying (*Gallus gallus domesticus*) hens, from Rio de Janeiro State, Brazil. Ciênc Rural. noviembre de 2015;45(11):2013-8.
88. Álvarez-Hernández DA, Garza-Mayén GS, Vázquez-López R. Quinolonas: Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. Rev Chil Infectol. octubre de 2015;32(5):499-504.
89. Luangtongkum T, Jeon B, Han J, Plummer P, Logue CM, Zhang Q. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. Future Microbiol. marzo de 2009;4(2):189-200.
90. Qin S-S, Wu C-M, Wang Y, Jeon B, Shen Z-Q, Wang Y, et al. Antimicrobial resistance in *Campylobacter coli* isolated from pigs in two provinces of China. Int J Food Microbiol. 15 de marzo de 2011;146(1):94-8.
91. Moya-Salazar J, Pio-Dávila L, Terán-Vásquez A, Olivo-López J. Rendimiento diagnóstico del agar sangre con filtro versus agar karmali para el diagnóstico de *Campylobacter* en coprocultivo. Horiz Méd. julio de 2016;16(3):58-65.
92. Bolton FJ, Hutchinson DN, Coates D. Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. J Clin Microbiol. febrero de 1984;19(2):169-71.
93. Morales Gutiérrez OD. Diagnóstico de *Campylobacter jejuni* en cerdos de abasto a faenarse en el rastro CECARSA a través de cultivos de hisopados rectales [Internet] [Tesis de titulación]. [Guatemala]: Universidad de San Carlos de Guatemala; 2004 [citado 29 de enero de 2020]. Disponible en: <http://www.repositorio.usac.edu.gt/7225/>

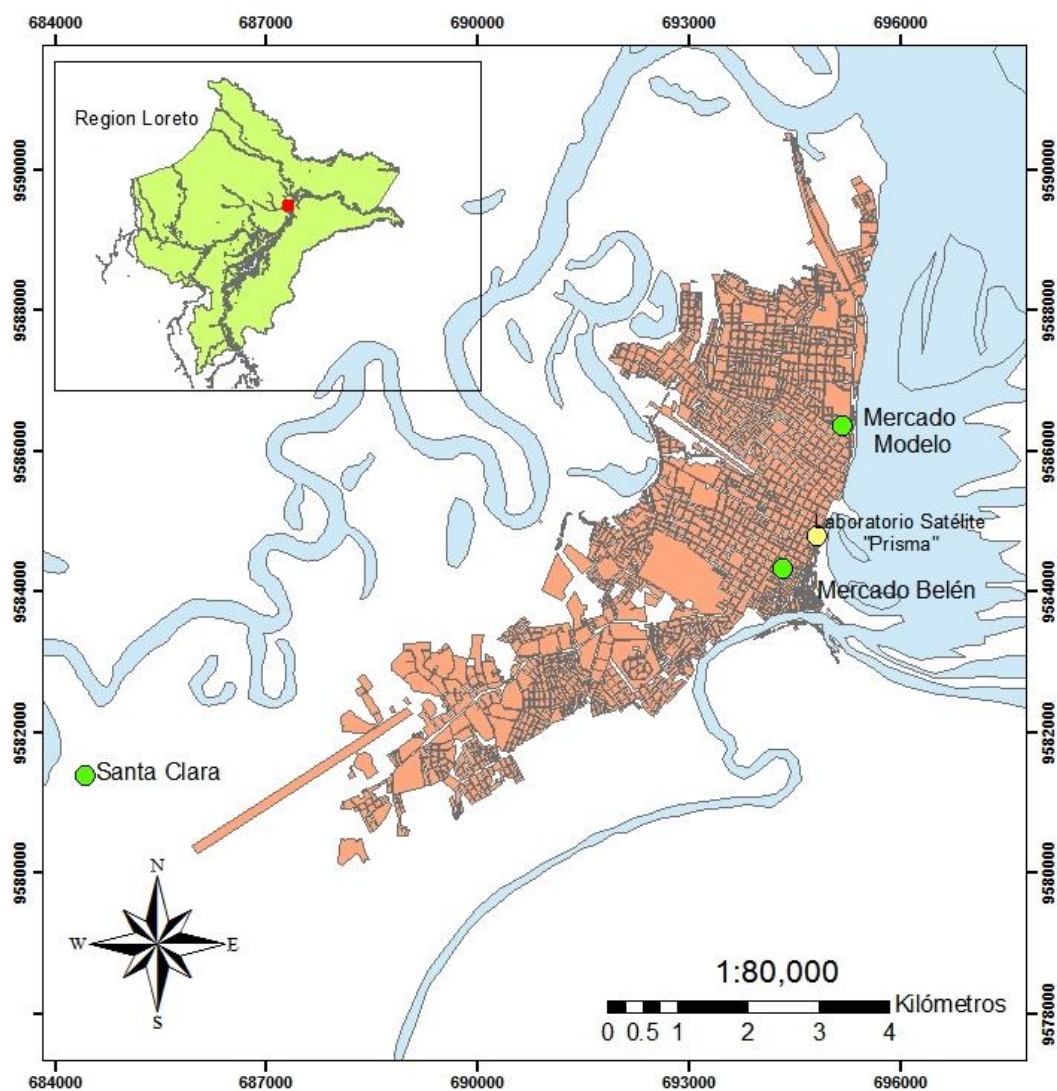
94. Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 1 de mayo de 2004;22(5):299-305.
95. Sacsquispe Contreras RE, Velasquez Pomar J. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión [Internet]. Lima, Perú: Instituto Nacional de Salud; 2002. 64 p. (Ministerio de Salud). Disponible en: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.pdf>
96. CLSI. *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*. 3.^a ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016. 120 p. (CLSI guideline M45; vol. 35).
97. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 29.^a ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019. 320 p. (CLSI supplement M100; vol. 39).
98. Platts-Mills JA, Liu J, Gratz J, Mduma E, Amour C, Swai N, et al. Detection of *Campylobacter* in Stool and Determination of Significance by Culture, Enzyme Immunoassay, and PCR in Developing Countries. *J Clin Microbiol*. 1 de abril de 2014;52(4):1074-80.
99. Hutchinson DN, Bolton FJ. Improved blood free selective medium for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faecal specimens. *J Clin Pathol*. agosto de 1984;37(8):956-7.
100. Oyarzabal OA, Fernández H. Isolation and Identification of *Campylobacter* spp. in Poultry. En: Fonseca BB, Fernandez H, Rossi DA, editores. *Campylobacter* spp and Related Organisms in Poultry: Pathogen-Host Interactions, Diagnosis and Epidemiology [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [citado 17 de junio de 2020]. p. 19-35. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-319-29907-5_2
101. Esson D, Mather AE, Scanlan E, Gupta S, de Vries SPW, Bailey D, et al. Genomic variations leading to alterations in cell morphology of *Campylobacter* spp. *Sci Rep*. 2 de diciembre de 2016;6(1):38303.
102. Abd El-Tawab A, El Hofy F, Ammar A, Ahmed H, Hefny A. Bacteriological and Molecular Identification of *Campylobacter* Species in Chickens and Humans, at Zagazig City, Egypt. *Benha Vet Med J*. 1 de marzo de 2015;28(1):17-26.
103. Skirrow MB, Benjamin J. «1001» *Campylobacters*: Cultural Characteristics of Intestinal *Campylobacters* from Man and Animals. *J Hyg (Lond)*. 1980;85(3):427-42.

104. Van TTH, Elshagmani E, Gor MC, Scott PC, Moore RJ. *Campylobacter hepaticus* sp. nov., isolated from chickens with spotty liver disease. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016;66(11):4518-24.
105. Oncul O, Zarakolu P, Oncul O, Gur D. Antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter jejuni*: a comparison between Etest and agar dilution method. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1 de enero de 2003;45(1):69-71.
106. Uaboi-Egbenni PO, Okolie PN, Adesanya OD, Omonigbehin E, Sobande AO. Epidemiological studies of the incidence of pathogenic *Campylobacter* spp. amongst animals in Lagos metropolis. *Afr J Biotechnol [Internet].* 2008 [citado 25 de junio de 2020];7(16). Disponible en: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/59208>
107. Jošić D, Petković J, Bunčić O, Lepšanić Z, Pivić R, Rašić Z, et al. Typing of Indigenous *Campylobacter* spp. From Serbia by M-PCR and RAPD. *Acta Vet (Beogr).* 1 de junio de 2016;66(2):203-13.
108. Σουλτος NS (ν, Ιωσηφιδου) EI (ε, Ψωμας) EP (ε, Τζηκας) ZT (ζ, Λαζου) TL (θ. Incidence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella*, *Listeria*, and *Campylobacter* spp. in raw "souvlaki" marketed in Thessaloniki (Northern Greece). *J Hell Vet Med Soc.* 2015;66(3):161-8.
109. On SLW. Identification methods for campylobacters, helicobacters, and related organisms. *Clin Microbiol Rev.* julio de 1996;9(3):405-22.
110. Botteldoorn N, Coillie EV, Piessens V, Rasschaert G, Debruyne L, Heyndrickx M, et al. Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken carcass rinse by real-time PCR. *J Appl Microbiol.* 2008;105(6):1909-18.
111. Taroco R, Seija V, Vignoli R. 36 Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. 2008.
112. BSAC. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing. British Society of Antimicrobial Chemotherapy. British Society of Antimicrobial Chemotherapy; 2015. (Versión 12).
113. Rivas-Ruiz R, Castelán-Martínez OD, Pérez M, Talavera JO. Clinical research XVII. X² test, from the expected to the observed. *Rev Médica Inst Mex Seguro Soc.* 2013;51(5):552-7.
114. Flores-Ruiz E, Miranda-Novales MG, Villasís-Keever MÁ, Flores-Ruiz E, Miranda-Novales MG, Villasís-Keever MÁ. El protocolo de investigación VI: cómo elegir la prueba estadística adecuada. *Estadística inferencial. Rev Alerg México.* septiembre de 2017;64(3):364-70.
115. Fernández S de la F. Aplicaciones de la Chi - cuadrado: Tablas de contingencia. Homogeneidad. Dependencia e independencia. Universidad Autónoma de Madrid;

116. Mendivelso F, Rodríguez M. Prueba Chi-Cuadrado de independencia aplicada a tablas 2xN. Rev Médica Sanitas. 30 de junio de 2018;21(2):92-5.
117. Díaza SP, Fernández SP. Asociación de variables cualitativas: El test exacto de Fisher y el test de Mcnemar. Metodol Investig. 2004;1:7.
118. Código Deontológico del Colegio Médico Veterinario del Perú. Sec. De la Deontología Profesional en I Docencia e Investigación p. 18.
119. Ley de protección a los animales domésticos y a los animales silvestres mantenidos en cautiverio. 27265 p. 3.
120. Resolución Jefatural N° 102-2012-J-OPE/INS de Aprobación del Procedimiento para el Uso de Animales en Investigación.
121. Resolución Jefatural N° 114-2012-J-OPE/INS de aprobación del reglamento del Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales de Investigación.

ANEXOS

Anexo N° 1. Ubicación geográfica de los puntos de muestreo y sede del laboratorio.



Anexo N° 2. Lugares de muestreo y tipo de poblaciones de pollos en el trabajo de investigación.



Foto N° 1. Mercado Belén



Foto N° 2. Mercado Modelo



Foto N° 3. Comunidad de Santa Clara de Nanay



Foto N° 4. Pollos de granja



Foto N° 5. Pollos de vida libre

Anexo N° 3. Composición química del medio de transporte Cary – Blair.

Fórmula típica *	gm / litro
Hidrogenofosfato disódico	1.1
Tioglicolato de sodio	1,5
Cloruro de sodio	5.0
Cloruro de calcio	0,09
Agar	5.6

pH 8.4 ± 0.2 @ 25 ° C

* Ajustado según sea necesario para cumplir con los estándares de rendimiento

Fuente:

1. Thermo Scientific. Oxoid Microbiology Products. Dehydrated Culture Media. Cary – Blair Medium.

NOTA: Adicionar 250µL de rojo de fenol como indicador de actividad antimicrobiana.

Anexo N° 4. Composición química del medio selectivo sin sangre para *Campylobacter* modificado con suplemento CCDA.

Formula típica*	gm/litro
Caldo Nutriente N° 2	25,0
Carbón bacteriológico	4,0
Hidrolizado de caseína	3,0
Desoxicolato de sodio	1,0
Sulfato ferroso	0,25
Piruvato sódico	0,25
Agar	12,0

pH 7.4 ± 0.2 @ 25°C

* Ajustado según sea necesario para cumplir con los estándares de rendimiento.

Suplemento selectivo CCDA

Contenido del vial (cada vial es suficiente para 500mL de medio)	por vial	por litro
Cefoperazona	16 mg	32 mg
Anfotericina B	5 mg	10 mg

Fuente:

1. Thermo Scientific. Oxoid Microbiology Products. Culture Media Supplements. *Campylobacter* Blood – Free Selective Medium (Modified CCDA – Preston).

Anexo N° 5. Características fenotípicas básicas de especies de *Campylobacter*.

Características	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>
Hidrolisis de hipurato	+*	-	-
Hidrolisis de acetato de indoxil	+	+	-

Clave: + = positivo; - = negativo; * = no todas las cepas

Fuente:

- OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 8va Edition. World Organisation for Animal Health, 2018.

Anexo N° 6. Lista de primers y sondas usadas para la detección de *Campylobacter* termotolerantes.

Detección	Gen	Secuencia	Fuente
<i>Campylobacter</i> (genero)	ARNr 16S	Primer F 5'- CAC GTG CTA CAA TGG CAT AT -3' Primer R 5'- GGC TTC ATG CTC TGG AGT T -3' Sonda 5'- /56-FAM/CAG AGA ACA /ZEN/ ATC CGA ACT GGG ACA /3IABkFQ/ -3'	1
<i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i>	<i>CadF</i>	Primer F 5'- CTG CTA AAC CAT AGA AAT AAA ATT TCT CAC -3' Primer R 5'- CTT TGA AGG TAA TTT AGA TAT GGA TAA TCG -3' Sonda 5'- /56-JOEN/CAT TTT GAC /ZEN/ GAT TTT TGG CTT GA/3IABkFQ/ -3'	2

Fuente:

- Botteldoorn N, Coillie EV, Piessens V, Rasschaert G, Debruyne L, Heyndrickx M, et al. Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken carcass rinse by real-time PCR. Journal of Applied. Microbiology, 2008.
- Platts-Mills JA, Liu J, Gratz J, Mduma E, Amour C, Swai N, et al. Detection of *Campylobacter* in Stool and Determination of Significance by Culture, Enzyme Immunoassay, and PCR in Developing Countries. Journal of Clinical Microbiology, 2014.

Anexo N° 7. Composición química del agar Müller – Hinton.

Fórmula típica *	gm / litro
Carne de res, infusión deshidratada de	300,0
Hidrolizado de caseína	17,5
Almidón	1,5
Agar	17,0

pH 7.3 ± 0.1 @ 25 ° C

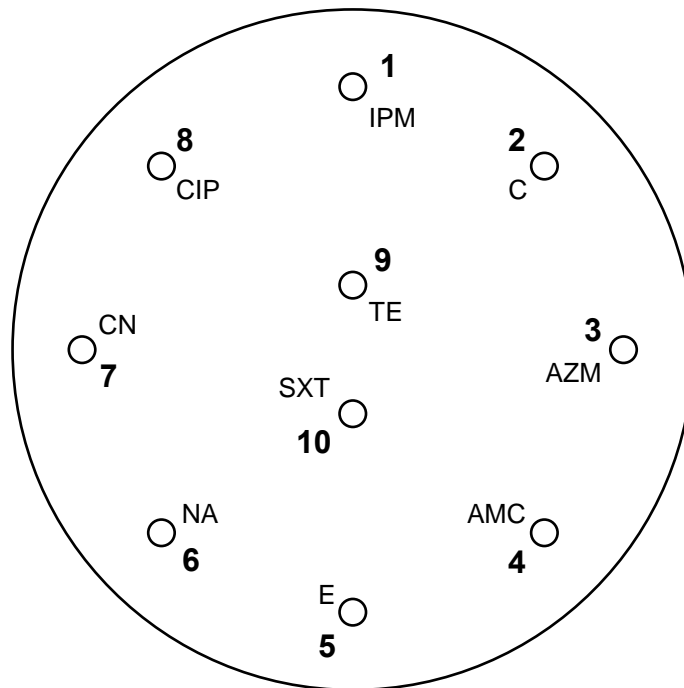
* Ajustado según sea necesario para cumplir con los estándares de rendimiento

Nota: Se adicionó 50mL de sangre de carnero.

Fuente:

1. Thermo Scientific. Oxoid Microbiology Products. Dehydrated Culture Media. Mueller – Hinton Agar.

Anexo N° 8. Modelo de ubicación de los sensidiscos en el agar Mueller – Hinton.



1. Imipenem.
2. Cloranfenicol.
3. Azitromicina.
4. Amoxicilina + Ácido Clavulanico.
5. Eritromicina.
6. Ácido Nalidixico.
7. Gentamicina.
8. Ciprofloxacina.
9. Tetracilina.
10. Trimetoprima – sulfametoxazol.

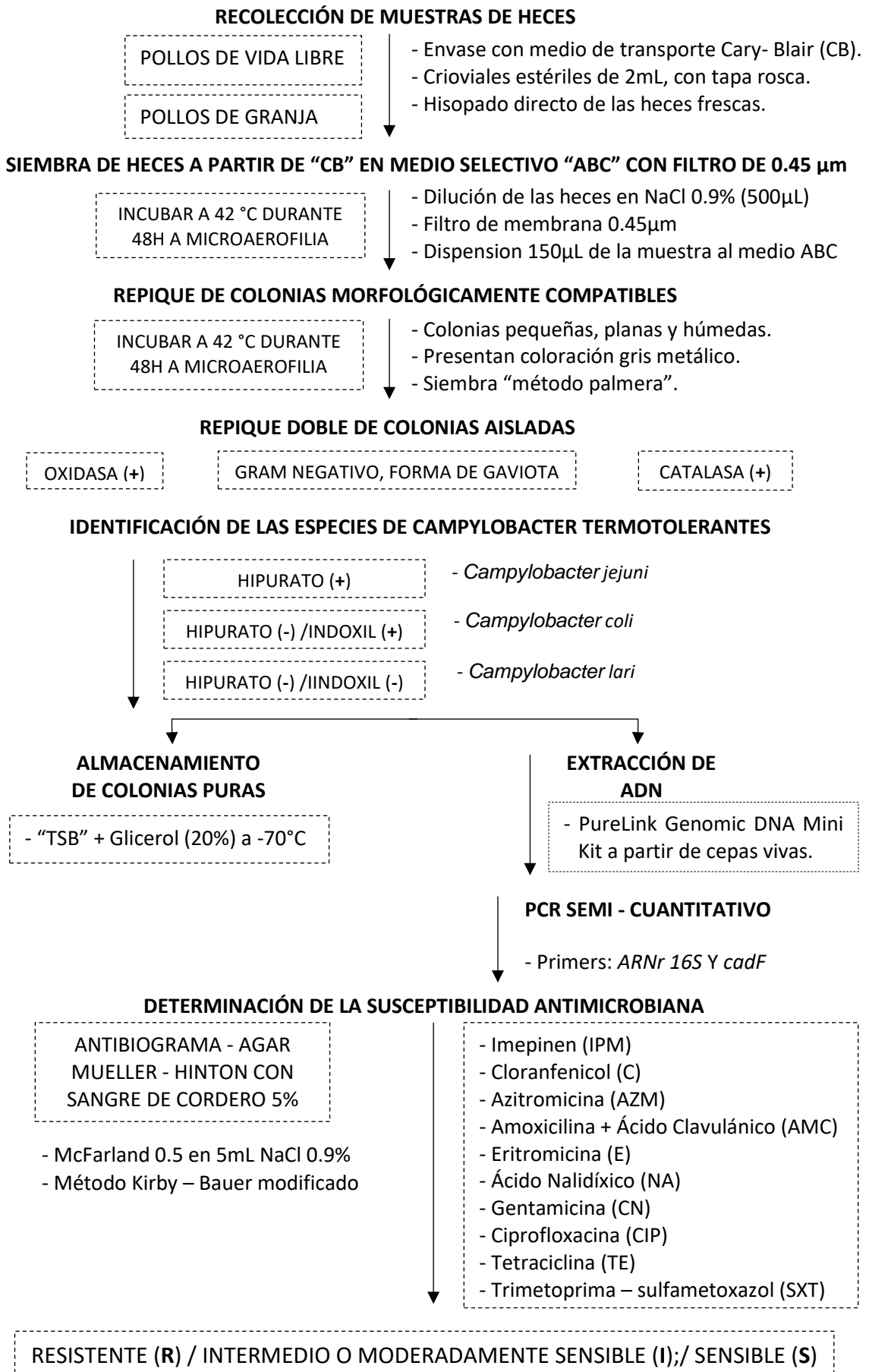
Anexo N° 9. Discos de sensibilidad y patrones de susceptibilidad.

Clase Antimicrobiana y Agentes	Abreviación	Cantidad (µg)	Resistente (mm)	Intermedio o Moderadamente sensible (mm)	Sensible (mm)	(*)
FLUOROQUINOLONAS						
1. Ciprofloxacina	CIP	5	≤20	21-23	≥24	1
2. Ácido Nalidixico	NA	30	≤19	-	≥20	2
MACROLIDOS						
3. Eritromicina	E	15	≤12	13-15	≥16	1
4. Azitromicina	AZM	15	≤12	13-15	≥16	1
TETRACICLINAS						
5. Tetraciclina	TE	30	≤22	23-25	≥26	1
AMINOGLUCOSIDOS						
6. Gentamicina	CN	10	≤12	13-14	≥15	3
BETA – LACTAMICOS						
7. Amoxicilina + Ácido Clavulanico	AMC	20/10	≤13	14-17	≥18	3
CARBAPENEMS						
8. Imipenem	IMP	10	≤19	20-22	≥23	3
FENICOLES						
9. Cloranfenicol	C	30	≤12	13-17	≥18	3
OTROS						
10. Trimetoprima - sulfametoxazol	STX	1.25 – 23.75	≤10	11-15	≥16	3

(*) Fuente:

1. CLSI. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. 3rd ed. CLSI guideline M45. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016.
2. BSAC. British Society for Antimicrobial Chemotherapy. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2015.
3. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019. Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria, 3rd Edition.

Anexo N° 10. Flujograma de procedimientos



Anexo N° 11. Ficha de encuesta de pollos de vida libre

1. CÓDIGO DE MUESTRAS PV ----- PV ----- PV ----- PV ----- PV -----	11. ANOTE EL AB EN CASO LO VEA A LO MENCIONE EL PROPIETARIO Amoxicilina - 1 <input type="text"/> Amoxicilina + Ac. Clav. - 2 <input type="text"/> Ampicilina - 3 <input type="text"/> Azitromicina - 4 <input type="text"/> Bromhexina - 5 <input type="text"/> Cefalexina - 6 <input type="text"/> Ciprofloxacina - 7 <input type="text"/> Clorafenicol - 8 <input type="text"/> Colistina - 9 <input type="text"/> Doxiciclina - 10 <input type="text"/> Enrofloxacina - 11 <input type="text"/> Eritromicina - 12 <input type="text"/> Estreptomicina - 13 <input type="text"/> Forfenicol - 14 <input type="text"/> Fosfomicina - 15 <input type="text"/> Gentamicina - 16 <input type="text"/> Metronidazol - 17 <input type="text"/> Neomicina - 18 <input type="text"/> Oxitetraciclina - 19 <input type="text"/> Penicilina - 20 <input type="text"/> Sulfametacina- 21 <input type="text"/> Sulfametoxazol - 22 <input type="text"/> Tetraciclina - 23 <input type="text"/> Tiamulina - 24 <input type="text"/> Tiosina – 25 <input type="text"/> Trimetroprima - 26 <input type="text"/> Otro (Especificar) - 27 <input type="text"/> _____ NA - 99 <input type="text"/>	13. ¿CUÁNTOS ADULTOS VIVEN EN EL HOGAR? <i>Adulto es toda persona mayor de 18 años de edad</i> <input type="text"/>
2. CÓDIGO DE CASA CASA -----	Ampicilina - 3 <input type="text"/> Azitromicina - 4 <input type="text"/> Bromhexina - 5 <input type="text"/> Cefalexina - 6 <input type="text"/> Ciprofloxacina - 7 <input type="text"/> Clorafenicol - 8 <input type="text"/> Colistina - 9 <input type="text"/> Doxiciclina - 10 <input type="text"/> Enrofloxacina - 11 <input type="text"/> Eritromicina - 12 <input type="text"/> Estreptomicina - 13 <input type="text"/> Forfenicol - 14 <input type="text"/> Fosfomicina - 15 <input type="text"/> Gentamicina - 16 <input type="text"/> Metronidazol - 17 <input type="text"/> Neomicina - 18 <input type="text"/> Oxitetraciclina - 19 <input type="text"/> Penicilina - 20 <input type="text"/> Sulfametacina- 21 <input type="text"/> Sulfametoxazol - 22 <input type="text"/> Tetraciclina - 23 <input type="text"/> Tiamulina - 24 <input type="text"/> Tiosina – 25 <input type="text"/> Trimetroprima - 26 <input type="text"/> Otro (Especificar) - 27 <input type="text"/> _____ NA - 99 <input type="text"/>	14. ¿CUÁNTOS MENORES VIVEN EN EL HOGAR? <i>Menor es toda persona menor de 18 años de edad</i> <input type="text"/>
3. RAZA DE LOS POLLOS <i>(marque con una X)</i> Criollo – 1 <input type="checkbox"/> Broiler – 2 <input type="checkbox"/> Otras (Especificar) <input type="checkbox"/>	Ampicilina - 3 <input type="text"/> Azitromicina - 4 <input type="text"/> Bromhexina - 5 <input type="text"/> Cefalexina - 6 <input type="text"/> Ciprofloxacina - 7 <input type="text"/> Clorafenicol - 8 <input type="text"/> Colistina - 9 <input type="text"/> Doxiciclina - 10 <input type="text"/> Enrofloxacina - 11 <input type="text"/> Eritromicina - 12 <input type="text"/> Estreptomicina - 13 <input type="text"/> Forfenicol - 14 <input type="text"/> Fosfomicina - 15 <input type="text"/> Gentamicina - 16 <input type="text"/> Metronidazol - 17 <input type="text"/> Neomicina - 18 <input type="text"/> Oxitetraciclina - 19 <input type="text"/> Penicilina - 20 <input type="text"/> Sulfametacina- 21 <input type="text"/> Sulfametoxazol - 22 <input type="text"/> Tetraciclina - 23 <input type="text"/> Tiamulina - 24 <input type="text"/> Tiosina – 25 <input type="text"/> Trimetroprima - 26 <input type="text"/> Otro (Especificar) - 27 <input type="text"/> _____ NA - 99 <input type="text"/>	15. ¿HAY OTROS ANIMALES EN EL HOGAR? No - 1 <input type="checkbox"/> Si - 2 <input type="checkbox"/>
4. ¿CUÁL ES EL TIPO DE CRIANZA? <i>(Marque con una X)</i> Libre - 1 <input type="checkbox"/> Corral - 2 <input type="checkbox"/> Ambos – 3 <input type="checkbox"/>	Ampicilina - 3 <input type="text"/> Azitromicina - 4 <input type="text"/> Bromhexina - 5 <input type="text"/> Cefalexina - 6 <input type="text"/> Ciprofloxacina - 7 <input type="text"/> Clorafenicol - 8 <input type="text"/> Colistina - 9 <input type="text"/> Doxiciclina - 10 <input type="text"/> Enrofloxacina - 11 <input type="text"/> Eritromicina - 12 <input type="text"/> Estreptomicina - 13 <input type="text"/> Forfenicol - 14 <input type="text"/> Fosfomicina - 15 <input type="text"/> Gentamicina - 16 <input type="text"/> Metronidazol - 17 <input type="text"/> Neomicina - 18 <input type="text"/> Oxitetraciclina - 19 <input type="text"/> Penicilina - 20 <input type="text"/> Sulfametacina- 21 <input type="text"/> Sulfametoxazol - 22 <input type="text"/> Tetraciclina - 23 <input type="text"/> Tiamulina - 24 <input type="text"/> Tiosina – 25 <input type="text"/> Trimetroprima - 26 <input type="text"/> Otro (Especificar) - 27 <input type="text"/> _____ NA - 99 <input type="text"/>	16. ¿QUÉ OTRO ANIMAL VIVE EN CASA? <i>Maque con una X</i> 16.1. Perro - No - 1 <input type="checkbox"/> Si - 2 <input type="checkbox"/> 16.2. Número de Perros (NA=99) <input type="text"/> 16.3. Gatos - No - 1 <input type="checkbox"/> Si - 2 <input type="checkbox"/> 16.4. Número de Gatos (NA=99) <input type="text"/> 16.5. Cerdos- No - 1 <input type="checkbox"/> Si - 2 <input type="checkbox"/> 16.6. Número de Cerdos (NA=99) <input type="text"/> 16.7. Patos- No - 1 <input type="checkbox"/> Si - 2 <input type="checkbox"/> 16.8. Número de Patos (NA=99) <input type="text"/> 16.9. Otros- No - 1 <input type="checkbox"/> Si - 2 <input type="checkbox"/> 16.10. Otros especificar <input type="text"/> _____ 16.11. Número de Otros(NA=99) <input type="text"/>
5. ¿DÓNDE ESTÁN LOS POLLOS? <i>(Marque con una X)</i> Huerta - 1 <input type="checkbox"/> Espacio techado - 2 <input type="checkbox"/> Ambos -3 <input type="checkbox"/>	Ampicilina - 3 <input type="text"/> Azitromicina - 4 <input type="text"/> Bromhexina - 5 <input type="text"/> Cefalexina - 6 <input type="text"/> Ciprofloxacina - 7 <input type="text"/> Clorafenicol - 8 <input type="text"/> Colistina - 9 <input type="text"/> Doxiciclina - 10 <input type="text"/> Enrofloxacina - 11 <input type="text"/> Eritromicina - 12 <input type="text"/> Estreptomicina - 13 <input type="text"/> Forfenicol - 14 <input type="text"/> Fosfomicina - 15 <input type="text"/> Gentamicina - 16 <input type="text"/> Metronidazol - 17 <input type="text"/> Neomicina - 18 <input type="text"/> Oxitetraciclina - 19 <input type="text"/> Penicilina - 20 <input type="text"/> Sulfametacina- 21 <input type="text"/> Sulfametoxazol - 22 <input type="text"/> Tetraciclina - 23 <input type="text"/> Tiamulina - 24 <input type="text"/> Tiosina – 25 <input type="text"/> Trimetroprima - 26 <input type="text"/> Otro (Especificar) - 27 <input type="text"/> _____ NA - 99 <input type="text"/>	17. ANOTACIONES
6. ¿CUÁL ES EL PROPÓSITO DE LA CRIANZA? <i>(Marque con una X)</i> Venta - 1 <input type="checkbox"/> Carne – 2 <input type="checkbox"/> Huevos - 3 <input type="checkbox"/> Mascota – 4 <input type="checkbox"/>	12. ¿DÓNDE/CÓMO OBTUVO SUS POLLOS? <i>Escriba la respuesta tal y como responde el propietario</i> 	18. FECHA (DD/MM/AA)
7. ¿CON QUÉ SUPLEMENTA LA ALIMENTACIÓN DE LOS POLLOS? <i>Anote exactamente lo que menciona el propietario.</i> 	Ampicilina - 3 <input type="text"/> Azitromicina - 4 <input type="text"/> Bromhexina - 5 <input type="text"/> Cefalexina - 6 <input type="text"/> Ciprofloxacina - 7 <input type="text"/> Clorafenicol - 8 <input type="text"/> Colistina - 9 <input type="text"/> Doxiciclina - 10 <input type="text"/> Enrofloxacina - 11 <input type="text"/> Eritromicina - 12 <input type="text"/> Estreptomicina - 13 <input type="text"/> Forfenicol - 14 <input type="text"/> Fosfomicina - 15 <input type="text"/> Gentamicina - 16 <input type="text"/> Metronidazol - 17 <input type="text"/> Neomicina - 18 <input type="text"/> Oxitetraciclina - 19 <input type="text"/> Penicilina - 20 <input type="text"/> Sulfametacina- 21 <input type="text"/> Sulfametoxazol - 22 <input type="text"/> Tetraciclina - 23 <input type="text"/> Tiamulina - 24 <input type="text"/> Tiosina – 25 <input type="text"/> Trimetroprima - 26 <input type="text"/> Otro (Especificar) - 27 <input type="text"/> _____ NA - 99 <input type="text"/>	
8. ¿COMPRA ALGO EN LA VETERINARIA? NO - 1 (Si la respuesta es NO, pase a la 12). <input type="checkbox"/> SI - 2 <input type="checkbox"/>	Ampicilina - 3 <input type="text"/> Azitromicina - 4 <input type="text"/> Bromhexina - 5 <input type="text"/> Cefalexina - 6 <input type="text"/> Ciprofloxacina - 7 <input type="text"/> Clorafenicol - 8 <input type="text"/> Colistina - 9 <input type="text"/> Doxiciclina - 10 <input type="text"/> Enrofloxacina - 11 <input type="text"/> Eritromicina - 12 <input type="text"/> Estreptomicina - 13 <input type="text"/> Forfenicol - 14 <input type="text"/> Fosfomicina - 15 <input type="text"/> Gentamicina - 16 <input type="text"/> Metronidazol - 17 <input type="text"/> Neomicina - 18 <input type="text"/> Oxitetraciclina - 19 <input type="text"/> Penicilina - 20 <input type="text"/> Sulfametacina- 21 <input type="text"/> Sulfametoxazol - 22 <input type="text"/> Tetraciclina - 23 <input type="text"/> Tiamulina - 24 <input type="text"/> Tiosina – 25 <input type="text"/> Trimetroprima - 26 <input type="text"/> Otro (Especificar) - 27 <input type="text"/> _____ NA - 99 <input type="text"/>	
9. ¿QUÉ COSA COMPRA EN LA VETERINARIA? <i>Anote exactamente lo que menciona el propietario. (NA=99)</i> 	Ampicilina - 3 <input type="text"/> Azitromicina - 4 <input type="text"/> Bromhexina - 5 <input type="text"/> Cefalexina - 6 <input type="text"/> Ciprofloxacina - 7 <input type="text"/> Clorafenicol - 8 <input type="text"/> Colistina - 9 <input type="text"/> Doxiciclina - 10 <input type="text"/> Enrofloxacina - 11 <input type="text"/> Eritromicina - 12 <input type="text"/> Estreptomicina - 13 <input type="text"/> Forfenicol - 14 <input type="text"/> Fosfomicina - 15 <input type="text"/> Gentamicina - 16 <input type="text"/> Metronidazol - 17 <input type="text"/> Neomicina - 18 <input type="text"/> Oxitetraciclina - 19 <input type="text"/> Penicilina - 20 <input type="text"/> Sulfametacina- 21 <input type="text"/> Sulfametoxazol - 22 <input type="text"/> Tetraciclina - 23 <input type="text"/> Tiamulina - 24 <input type="text"/> Tiosina – 25 <input type="text"/> Trimetroprima - 26 <input type="text"/> Otro (Especificar) - 27 <input type="text"/> _____ NA - 99 <input type="text"/>	
10. ANOTE EL NOMBRE COMERCIAL DEL PRODUCTO EN CASO VEO EL EMPAQUE O EL PROPIETARIO LO MENCIONE (NA=99) 	Ampicilina - 3 <input type="text"/> Azitromicina - 4 <input type="text"/> Bromhexina - 5 <input type="text"/> Cefalexina - 6 <input type="text"/> Ciprofloxacina - 7 <input type="text"/> Clorafenicol - 8 <input type="text"/> Colistina - 9 <input type="text"/> Doxiciclina - 10 <input type="text"/> Enrofloxacina - 11 <input type="text"/> Eritromicina - 12 <input type="text"/> Estreptomicina - 13 <input type="text"/> Forfenicol - 14 <input type="text"/> Fosfomicina - 15 <input type="text"/> Gentamicina - 16 <input type="text"/> Metronidazol - 17 <input type="text"/> Neomicina - 18 <input type="text"/> Oxitetraciclina - 19 <input type="text"/> Penicilina - 20 <input type="text"/> Sulfametacina- 21 <input type="text"/> Sulfametoxazol - 22 <input type="text"/> Tetraciclina - 23 <input type="text"/> Tiamulina - 24 <input type="text"/> Tiosina – 25 <input type="text"/> Trimetroprima - 26 <input type="text"/> Otro (Especificar) - 27 <input type="text"/> _____ NA - 99 <input type="text"/>	

Anexo N° 12. Ficha de resultados de laboratorio

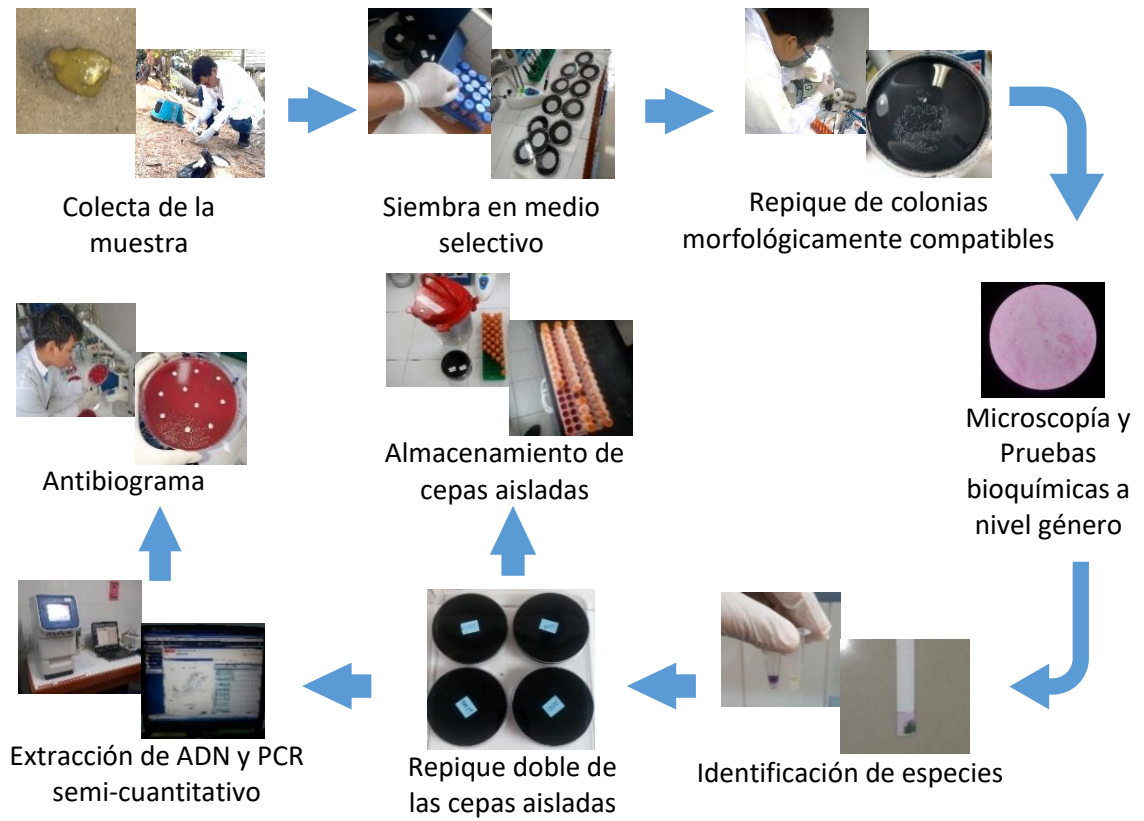
Muestra P_ _ _ _ _		Cepa ID		PCAMP _ _ _ _ _		
Proceso	Descripción	¿Se realizó?	Resultado	Fecha (DD/MM/AA)	Hora (24:00)	Técnico
P.1.0	Colección de la muestra en Cary-Blair y crioviales		NA			
	Almacenamiento de crioviales a -70°C		NA			
P.2.0	Siembra a partir de Cary-Blair		NA			
	Lectura siembra					
P.3.0	Repique de las cepas morfológicamente compatibles				NA	
P.3.1	Tinción de Gram				NA	
	Detección de oxidasa				NA	
	Detección de catalasa				NA	
P.4.0	Repique doble				NA	
P.5.0	Almacenamiento TSB + Glicerol (20%) a -70°C		NA		NA	
P.6.0	Antibiograma		Ver cuadro		NA	
P.7.0	Extracción DNA Purelink Genimic Mini Kit				NA	
P.8.0	PCR <i>ARNr 16S + cadF</i>				NA	
P.9.0	Almacenamiento de ADN a -70 (2 viales)		NA		NA	
P.10.0	Detección del hidrolisis de hipurato		Ver cuadro		NA	
P.11.0	Detección del hidrolisis de acetato de indoxil		Ver cuadro		NA	

Anexo N° 13. Ficha de registro de muestras ingresadas al laboratorio

CÓDIGO MUESTRA	CÓDIGO CASA	FECHA	HORA	CB	CRIOVIAL	TÉCNICO	CÓDIGO MUESTRA	CÓDIGO GRANJA	FECHA	HORA	CB	CRIOVIAL	TÉCNICO
PV001	CASA _ _ _ _						PA001	AV _ _ _ _					
PV002	CASA _ _ _ _						PA002	AV _ _ _ _					
PV003	CASA _ _ _ _						PA003	AV _ _ _ _					
PV004	CASA _ _ _ _						PA004	AV _ _ _ _					
PV005	CASA _ _ _ _						PA005	AV _ _ _ _					
PV006	CASA _ _ _ _						PA006	AV _ _ _ _					
PV007	CASA _ _ _ _						PA007	AV _ _ _ _					
PV008	CASA _ _ _ _						PA008	AV _ _ _ _					
PV009	CASA _ _ _ _						PA009	AV _ _ _ _					
PV010	CASA _ _ _ _						PA010	AV _ _ _ _					
	CASA _ _ _ _							AV _ _ _ _					
	CASA _ _ _ _							AV _ _ _ _					
	CASA _ _ _ _							AV _ _ _ _					
	CASA _ _ _ _							AV _ _ _ _					
	CASA _ _ _ _							AV _ _ _ _					
	CASA _ _ _ _							AV _ _ _ _					
	CASA _ _ _ _							AV _ _ _ _					
	CASA _ _ _ _							AV _ _ _ _					
	CASA _ _ _ _							AV _ _ _ _					
	CASA _ _ _ _							AV _ _ _ _					
	CASA _ _ _ _							AV _ _ _ _					
	CASA _ _ _ _							AV _ _ _ _					
	CASA _ _ _ _							AV _ _ _ _					
	CASA _ _ _ _							AV _ _ _ _					
	CASA _ _ _ _							AV _ _ _ _					
	CASA _ _ _ _							AV _ _ _ _					
	CASA _ _ _ _							AV _ _ _ _					
	CASA _ _ _ _							AV _ _ _ _					
	CASA _ _ _ _							AV _ _ _ _					
	CASA _ _ _ _							AV _ _ _ _					
	CASA _ _ _ _							AV _ _ _ _					
	CASA _ _ _ _							AV _ _ _ _					
	CASA _ _ _ _							AV _ _ _ _					
	CASA _ _ _ _							AV _ _ _ _					

Clave: PV = pollo de vida libre; PA: pollo de granja.

Anexo N° 14. Resumen de procedimientos empleados.



Anexo N° 15. Registro de la susceptibilidad de *C. jejuni* de pollos de granja

Código	Antibióticos									
	IPM	C	AZM	AMC	E	NA	CN	CIP	TE	SXT
PA001	S	S	R	S	R	R	R	R	R	I
PA002	S	S	R	S	R	R	R	R	R	S
PA004	S	S	R	S	R	R	R	R	R	S
PA006	S	S	R	I	R	R	R	R	R	R
PA009	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R
PA012	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R
PA016	S	S	R	S	R	R	R	R	R	S
PA019	S	S	R	I	R	R	S	R	R	R
PA020	S	S	R	I	R	R	S	R	R	R
PA022	S	S	R	S	R	R	R	R	R	S
PA023	S	S	R	S	R	R	R	R	R	I
PA042	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R
PA046	S	S	S	I	S	R	S	R	R	R
PA049	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R
PA050	S	S	S	I	S	R	S	R	R	R
PA064	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R
PA067	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S
PA069	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
PA074	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R
PA075	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R
PA079	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R
PA092	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R

* R, Resistente; I, Intermedio o moderadamente sensible; S, Sensible.

PA: Pollos de granja.

Anexo N° 16. Registro de la susceptibilidad de *C. coli* de pollos de granja.

Código	Antibióticos									
	IPM	C	AZM	AMC	E	NA	CN	CIP	TE	SXT
PA010	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R
PA013	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R
PA015	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R
PA017	S	S	R	I	R	R	S	R	R	R
PA026	S	S	R	R	R	R	R	R	I	R
PA028	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
PA029	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
PA030	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R
PA044	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
PA048	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R
PA061	S	S	R	R	R	R	R	R	I	R
PA062	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
PA063	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
PA065	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
PA068	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
PA070	S	S	R	R	R	R	R	R	I	R
PA090	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R
PA093	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R
PA096	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R

* R, Resistente; I, Intermedio o moderadamente sensible; S, Sensible.

PA: Pollos de granja.

Anexo N° 17. Registro de la susceptibilidad de *C. jejuni* de pollos de vida libre.

Código	Antibióticos									
	IPM	C	AZM	AMC	E	NA	CN	CIP	TE	SXT
PV011	S	S	R	I	S	R	S	R	R	R
PV012	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
PV022	S	S	R	S	S	R	S	R	R	R
PV048	S	S	S	I	S	R	S	R	R	R
PV071	S	S	R	S	R	R	R	R	R	I
PV072	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
PV075	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
PV076	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
PV077	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
PV093	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R

* R, Resistente; I, Intermedio o moderadamente sensible; S, Sensible.
PV: Pollos de vida libre.

Anexo N° 18. Registro de la susceptibilidad de *C. coli* de pollos de vida libre.

Código	Antibióticos									
	IPM	C	AZM	AMC	E	NA	CN	CIP	TE	SXT
PV004	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R
PV005	S	S	S	I	S	R	S	R	R	R
PV007	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R
PV010	S	S	S	S	S	R	S	R	S	I
PV014	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S
PV016	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R
PV019	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R
PV020	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R
PV021	S	S	R	R	S	R	S	R	R	S
PV025	S	S	R	S	S	R	S	R	R	S
PV029	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S
PV064	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PV065	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PV067	S	S	S	R	S	R	R	R	R	I
PV094	S	S	S	R	S	R	S	R	S	S
PV097	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R
PV098	S	S	S	R	S	R	S	R	R	S
PV099	S	S	S	R	S	R	S	R	S	R

* R, Resistente; I, Intermedio o moderadamente sensible; S, Sensible.
PV: Pollos de vida libre.

Anexo N° 19. Tabla de distribución de Chi – cuadrado X²

P = Probabilidad de encontrar un valor mayor o igual que el chi cuadrado tabulado, v = Grados de Libertad

v/p	0,001	0,0025	0,005	0,01	0,025	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5
1	10,8274	9,1404	7,8794	6,6349	5,0239	3,8415	2,7055	2,0722	1,6424	1,3233	1,0742	0,8735	0,7083	0,5707	0,4549
2	13,8150	11,9827	10,5965	9,2104	7,3778	5,9915	4,6052	3,7942	3,2189	2,7726	2,4079	2,0996	1,8326	1,5970	1,3863
3	16,2660	14,3202	12,8381	11,3449	9,3484	7,8147	6,2514	5,3170	4,6416	4,1083	3,6649	3,2831	2,9462	2,6430	2,3660
4	18,4662	16,4238	14,8602	13,2767	11,1433	9,4877	7,7794	6,7449	5,9886	5,3853	4,8784	4,4377	4,0446	3,6871	3,3567
5	20,5147	18,3854	16,7496	15,0863	12,8325	11,0705	9,2363	8,1152	7,2893	6,6257	6,0644	5,5731	5,1319	4,7278	4,3515
6	22,4575	20,2491	18,5475	16,8119	14,4494	12,5916	10,6446	9,4461	8,5581	7,8408	7,2311	6,6948	6,2108	5,7652	5,3481
7	24,3213	22,0402	20,2777	18,4753	16,0128	14,0671	12,0170	10,7479	9,8032	9,0371	8,3834	7,8061	7,2832	6,8000	6,3458
8	26,1239	23,7742	21,9549	20,0902	17,5345	15,5073	13,3616	12,0271	11,0301	10,2189	9,5245	8,9094	8,3505	7,8325	7,3441
9	27,8767	25,4625	23,5893	21,6660	19,0228	16,9190	14,6837	13,2880	12,2421	11,3887	10,6564	10,0060	9,4136	8,8632	8,3428
10	29,5879	27,1119	25,1881	23,2093	20,4832	18,3070	15,9872	14,5339	13,4420	12,5489	11,7807	11,0971	10,4732	9,8922	9,3418
11	31,2635	28,7291	26,7569	24,7250	21,9200	19,6752	17,2750	15,7671	14,6314	13,7007	12,8987	12,1836	11,5298	10,9199	10,3410
12	32,9092	30,3182	28,2997	26,2170	23,3367	21,0261	18,5493	16,9893	15,8120	14,8454	14,0111	13,2661	12,5838	11,9463	11,3403
13	34,5274	31,8830	29,8193	27,6882	24,7356	22,3620	19,8119	18,2020	16,9848	15,9839	15,1187	14,3451	13,6356	12,9717	12,3398
14	36,1239	33,4262	31,3194	29,1412	26,1189	23,6848	21,0641	19,4062	18,1508	17,1169	16,2221	15,4209	14,6853	13,9961	13,3393
15	37,6978	34,9494	32,8015	30,5780	27,4884	24,9958	22,3071	20,6030	19,3107	18,2451	17,3217	16,4940	15,7332	15,0197	14,3389
16	39,2518	36,4555	34,2671	31,9999	28,8453	26,2962	23,5418	21,7931	20,4651	19,3689	18,4179	17,5646	16,7795	16,0425	15,3385
17	40,7911	37,9462	35,7184	33,4087	30,1910	27,5871	24,7690	22,9770	21,6146	20,4887	19,5110	18,6330	17,8244	17,0646	16,3382
18	42,3119	39,4220	37,1564	34,8052	31,5264	28,8693	25,9894	24,1555	22,7595	21,6049	20,6014	19,6993	18,8679	18,0860	17,3379
19	43,8194	40,8847	38,5821	36,1908	32,8523	30,1435	27,2036	25,3289	23,9004	22,7178	21,6891	20,7638	19,9102	19,1069	18,3376
20	45,3142	42,3358	39,9969	37,5663	34,1696	31,4104	28,4120	26,4976	25,0375	23,8277	22,7745	21,8265	20,9514	20,1272	19,3374
21	46,7963	43,7749	41,4009	38,9322	35,4789	32,6706	29,6151	27,6620	26,1711	24,9348	23,8578	22,8876	21,9915	21,1470	20,3372
22	48,2676	45,2041	42,7957	40,2894	36,7807	33,9245	30,8133	28,8224	27,3015	26,0393	24,9390	23,9473	23,0307	22,1663	21,3370
23	49,7276	46,6231	44,1814	41,6383	38,0756	35,1725	32,0069	29,9792	28,4288	27,1413	26,0184	25,0055	24,0689	23,1852	22,3369
24	51,1790	48,0336	45,5584	42,9798	39,3641	36,4150	33,1962	31,1325	29,5533	28,2412	27,0960	26,0625	25,1064	24,2037	23,3367
25	52,6187	49,4351	46,9280	44,3140	40,6465	37,6525	34,3816	32,2825	30,6752	29,3388	28,1719	27,1183	26,1430	25,2218	24,3366
26	54,0511	50,8291	48,2898	45,6416	41,9231	38,8851	35,5632	33,4295	31,7946	30,4346	29,2463	28,1730	27,1789	26,2395	25,3365
27	55,4751	52,2152	49,6450	46,9628	43,1945	40,1133	36,7412	34,5736	32,9117	31,5284	30,3193	29,2266	28,2141	27,2569	26,3363
28	56,8918	53,5939	50,9936	48,2782	44,4608	41,3372	37,9159	35,7150	34,0266	32,6205	31,3909	30,2791	29,2486	28,2740	27,3362
29	58,3006	54,9662	52,3355	49,5878	45,7223	42,5569	39,0875	36,8538	35,1394	33,7109	32,4612	31,3308	30,2825	29,2908	28,3361