

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Detección molecular de *Campylobacter* sp. en una población infantil de zonas rurales del Distrito Metropolitano de Quito

Camila Ivanova Guillén Camacho

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniería en Biotecnología

Quito, 21 de diciembre de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Ambientales y Biológicas

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Detección molecular de *Campylobacter* sp. en una población infantil de
zonas rurales del Distrito Metropolitano de Quito**

Camila Ivanova Guillén Camacho

Nombre del profesor, Título académico

Sonia Zapata, PhD

Quito, 21 de diciembre de 2020

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Camila Ivanova Guillén Camacho

Código: 130911

Cédula de identidad: 1723264444

Lugar y fecha: Quito, 21 de diciembre de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETheses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETheses>.

RESUMEN

Campylobacter es el patógeno responsable de infecciones gastrointestinales como la campilobacteriosis y causa aproximadamente 550 millones de casos en el mundo y el 25% de casos se reportan en América Latina, donde la población más afectada es niños menores de 5 años. A pesar de su importancia, en muchos países no existe una vigilancia epidemiológica de este patógeno, incluido Ecuador. El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de *Campylobacter* en niños de 0 a 5 años de zonas rurales del Distrito Metropolitano de Quito (DMQ) mediante el Sistema de Detección Molecular (MDS) y cultivo tradicional en Agar *Campylobacter* CCDA. Los resultados muestran una prevalencia de 16.67%, solo el 28% tuvo contacto con animales, lo cual sugiere otras vías de transmisión como el consumo de agua o alimentos contaminados. La prevalencia encontrada en este estudio es baja, comparada con otros estudios realizados en el país y fue mayor en niños varones que en mujeres. Se recomienda incluir a *Campylobacter* en la gaceta epidemiológica del Ecuador y realizar futuros análisis con fin de identificar las especies circulantes en la población estudiada.

Palabras clave: *Campylobacter*, MDS, prevalencia, niños, infecciones gastrointestinales, rural

ABSTRACT

Campylobacter is the pathogen responsible for gastrointestinal infections such as campylobacteriosis and causes approximately 550 million cases worldwide and 25% of cases are reported in Latin America, where the most affected population is children under 5 years. Despite its importance, there is no epidemiological surveillance of this pathogen in many countries, including Ecuador. The objective of this study was to determine the prevalence of *Campylobacter* in children from 0 to 5 years old in rural areas of the Metropolitan District of Quito (DMQ) through the Molecular Detection System (MDS) and traditional culture in *Campylobacter* Agar CCDA. The results show a prevalence of 16.67%, only 28% had contact with animals, suggesting other transmission routes such as consumption of contaminated water or food. The prevalence found in this study is low compared to other studies conducted in the country and was higher in male children than in women. It is recommended that *Campylobacter* be included in the epidemiological gazette of Ecuador and that future analyses be conducted to identify the species circulating in the population studied.

Keywords: *Campylobacter*, MDS, prevalence, children, gastrointestinal infections, rural

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	10
MÉTODOS.....	14
1. Obtención de muestras	14
2. Identificación morfológica de <i>Campylobacter</i>	14
3. Identificación molecular de <i>Campylobacter</i>	15
RESULTADOS	18
1. Obtención de las muestras	18
2. Identificación morfológica	18
3. Identificación molecular	18
DISCUSION.....	20
CONCLUSIONES.....	24
BIBLIOGRAFÍA	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 . Datos demográficos de las muestras positivas, la columna S/A hace referencia a individuos sintomáticos (S) con diarrea y asintomáticos (A), sin diarrea	25
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Distribución por parroquia de la prevalencia de <i>Campylobacter</i> sp	26
Figura 2 Distribución por género de la prevalencia de <i>Campylobacter</i> sp	26
Figura 3. Distribución por edad de la prevalencia de <i>Campylobacter</i> sp.....	27

INTRODUCCIÓN

Uno de los cuatro patógenos responsables de gastroenteritis por alimentos es *Campylobacter*, una bacteria Gram negativa con forma espiral, que no forma esporas. El género está comprendido por 17 especies y 6 subespecies, de las cuales *Campylobacter jejuni* y *C. coli* son las más frecuentemente aisladas (OMS, 2020). Muchas de las especies del género crecen bajo condiciones microaerofílicas (Kaakoush et al., 2015). Las especies del género se han asociado a distintas afecciones gastrointestinales como gastroenteritis en humanos (campilobacteriosis), esófago de Barrett, cáncer colorrectal, trastorno intestinal funcional posinfeccioso (SII) y enfermedades que producen inflamación del intestino (EII) (Ming, 2011)

Campylobacter tiene como su reservorio natural a una gran variedad de animales de granja tales como: aves de corral, ovinos, caprinos y porcinos; así como también animales de compañía como los perros y gatos (Hara & Takatori, 2011). La dosis infectiva es de solo 360 UFC (unidades formadoras de colonias) (Hara & Takatori, 2011) causando en su mayoría infecciones esporádicas, no diagnosticadas o asociadas a brotes (Samuel, Vugia, & Shallow, 2004). De todas las especies del género, *Campylobacter jejuni* y *C. coli* se han relacionado principalmente con las infecciones gastrointestinales, aunque en los últimos años se ha reportado también la presencia de *C. upsaliensis* y *C. lari* (Humphrey et al., 2007). La campilobacteriosis es una infección que es transmitida principalmente por los alimentos contaminados como carne de aves de corral poco cocida, leche sin pasteurizar o agua. También se ha reportado que la bacteria se puede transmitir por el contacto directo con animales de granja o sus heces, (Hara & Takatori, 2011). La transmisión directa entre personas es poco común (Ek Dahl & Andersson, 2004).

La campilobacteriosis se caracteriza por presencia de diarrea, fiebre y calambres abdominales como consecuencia de la colonización de la bacteria a nivel el colon y el intestino delgado (Kirkpatrick & Tribble, 2011). Alrededor del mundo, *Campylobacter* es el principal

patógeno bacteriano causante de gastroenteritis en humanos (WHO, 2012), responsable de aproximadamente 550 millones de casos de los cuales 220 millones corresponden a niños menores de 5 años (OMS, 2020). En América Latina, aproximadamente el 25% de los casos de gastroenteritis reportados son a causa de *C. coli* (Fernández, 2011). En los países en desarrollo este patógeno es endémico y las infecciones causadas por el mismo suelen estar presentes, en su mayoría, en niños (Rao et al., 2001). Además, las infecciones asintomáticas son muy comunes y la estacionalidad es baja o ausente, a diferencia de los países industrializados (Platts & Kosek, 2015).

Para la identificación de especies de *Campylobacter* involucradas en gastroenteritis, se ha utilizado varios métodos presuntivos como Gram directo, tinción de Hooker, microscopía de contraste de fase y tinción de Vagó. Sin embargo, solo se ha logrado conseguir un valor predictivo de 85,7% para la microscopía de contraste de fase (Fernández & Trabulsi, 1990), y 100% de especificidad para la tinción de Hooker (Chanqueo et al., 2005). En el caso de cultivo, en general se utiliza un medio de agar que contenga aminoácidos, antibiótico para inhibir la flora acompañante y un suplemento del 5% de sangre humana, equina y ovina (Villa et al., 2009). Los medios utilizados pueden ser Skirrow modificado, agar Butzler, CAMPY-BAP, Agar cefoperazona de carbón desoxicolato modificado – mCCDA o Agar Karmali (Zumbado et al., 2014), en donde las condiciones de incubación son de 5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂ (Fitzgerald, 2015). Mientras que las pruebas bioquímicas típicamente utilizadas son catalasa, oxidasa, hipurato, SH₂ e Indoxilacetato (Nachamkin, Engberg, & Arestrup, 2002). Por otra parte, cuando no se posee los medios de cultivo ni los equipos necesarios, se ha utilizado las pruebas de antígenos y las pruebas de amplificación de ácido nucleicos (NAAT) en heces; estas son conocidas como pruebas de diagnóstico independientes del cultivo (CIDT). Este tipo de pruebas son rápidas y eficientes ya que proporcionan el resultado el mismo día (Cronquist et al., 2012). Finalmente, el método molecular típicamente utilizado para la detección de

Campylobacter en heces es una PCR multiplex, en el caso de requerir encontrar más de una especie en una muestra (Fitzgerald, 2015).

Otra de las técnicas moleculares utilizadas para la detección de *Campylobacter* es el Sistema de Detección Molecular (MDS). El cual realiza la detección de patógenos en muestras de alimentos mediante una amplificación isotérmica de ADN más la detección por bioluminiscencia, esto sin el uso de termocicladores filtros o detectores de fluorescencia externos. (3M, 2018).

En América del Sur se han realizado escasos estudios sobre *Campylobacter*; en Perú no existen cifras actualizadas de la prevalencia de *Campylobacter*, se sabe que en Lima aproximadamente el 15% de muestras de diarrea de niños son debido a *Campylobacter* (Grados et al., 1988). Mientras que, en Brasil, hay una tasa de prevalencia del 9.9%. En la mayoría de los países en desarrollo no existen programas nacionales de vigilancia de la campilobacteriosis pese a la alta morbilidad. Esto puede deberse a que en estos países *Campylobacter* no causa graves afecciones intestinales como en los países industrializados (Coker, Isokpehi, Thomas, & Amisu, 2002). El Sistema de Vigilancia Epidemiológica (SIVE) en Ecuador, no proporciona datos sobre campilobacteriosis en las gacetas epidemiológicas de enfermedades transmitidas por alimentos y agua (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2020). Debido a la falta de información sobre casos de campilobacteriosis, mediante datos de vigilancia, brotes y registros se ha estimado que la tasa de mortalidad va desde 0.01% a 8%; varias de estas muertes se encuentran relacionadas con la complicaciones y secuelas de esta infección (WHO, 2012).

En Ecuador se han realizado escasos estudios acerca de la identificación y prevalencia de *Campylobacter* en humanos, y los pocos estudios realizados se han llevado a cabo en hospitales y clínicas de ciudades. Uno de los estudios realizado, es un muestreo de heces de niños de cuatro clínicas de Quito en donde el 50% de los casos de diarrea eran consecuencia de *Campylobacter* (Guderian, Ordóñez, & Bossano, 1987). De igual manera, en Loja (Simaluiza,

Toledo, & Fernández , 2018) y Guayaquil se analizó muestras en los hospitales de cada una de las ciudades respectivamente, en donde se encontró una alta prevalencia de *Campylobacter* en niños ingresados a los hospitales con diarrea (Mendoza, 2017). Se realizó otro estudio de la relación que existe entre el contacto con animales y la presencia de *Campylobacter* en un barrio semi rural de Quito, en donde se evidenció que hay una alta incidencia de *Campylobacter jejuni* tanto en animales de crianza como en niños de la comunidad (Vasco, 2014) . Tomando en cuenta que la información epidemiológica de *Campylobacter* es escasa en Ecuador, esta investigación se basa en establecer la prevalencia de este patógeno en niños menores de 5 años en parroquias rurales Distrito Metropolitano de Quito tomando en consideración distintos factores: edad, género y si existió contacto con animales.

MÉTODOS

1. Obtención de muestras

En el presente estudio, se utilizó muestras de heces de niños de 0 a 5 años colectadas por personal del proyecto PRISA durante siete semanas desde enero hasta marzo del 2020. Las muestras fueron colectadas en 7 parroquias rurales del Distrito Metropolitano de Quito (DMQ). Para análisis de los datos se tomó en consideración los siguientes factores: edad de los niños, el género y si los niños tuvieron o no contacto con animales. Finalmente, se consideró la consistencia de las muestras: contextura sólida, pastosa, líquida o mucosa.

2. Identificación morfológica de *Campylobacter*

Para el aislamiento de colonias sugerentes de *Campylobacter* de muestras de heces se utilizó el medio Agar *Campylobacter* CCDA. Como controles de crecimiento se utilizó dos cepas, *C. jejuni* y *C. coli*. Las dos cepas fueron obtenidas del laboratorio UNITEAR de la Universidad Central del Ecuador. Las condiciones de crecimiento de la bacteria se probaron en fundas gaspack y jarras de microaerofilia con condiciones de 5-10% de O₂ y 5-10 de CO₂.

Para la preparación del medio se agregó 22.75 g de medio por cada 500 ml de agua estéril y una vez homogenizado se esterilizó en autoclave . Al medio estéril se añadió 1.25 ml de suplemento CDDA, que contiene Anfotericina B y Cefoperazona, y este se dispensó en cajas petri. Las muestras de heces de las diferentes salidas fueron inoculadas en el medio Agar *Campylobacter* CCDA el mismo día de colección, las mismas fueron colocadas en condiciones de microaerofilia se evidenció mejor crecimiento en la prueba y se las incubó a 41.5°C por 48 horas.

Para la identificación de colonias sugerentes de *Campylobacter* se realizó una identificación morfológica y bioquímica. La identificación morfológica fue a nivel macroscópico y microscópico. A nivel macroscópico se terminó la forma, tamaño y color

sugerente a colonias de *Campylobacter*. A nivel microscópico se evidenció la forma de las colonias mediante tinción Gram y microscopía de campo oscuro. Para evidenciar las colonias mediante tinción Gram se usó un microscopio compuesto (Olympus) con un aumento de 1000X. Para la microscopía de campo oscuro se preparó la muestra de la siguiente manera: en un criovial se colocó de 1 a 2 ml de agua estéril a la cual se añadió 1 ó 2 colonias sugerentes que crecieron en el medio Agar *Campylobacter* CCDA. De la mezcla se tomó 10 µl y se colocó en una placa porta objetos . Las muestras fueron observadas en un microscopio de campo oscuro (Olympus) con un aumento de 400X. Para la identificación bioquímica se realizaron pruebas de oxidasa y catalasa.

Las colonias sugerentes de *Campylobacter* fueron sembradas en Agar Nutritivo para realizar la extracción de ADN. Para la extracción de ADN se usó la metodología de ebullición, para lo cual en un eppendorf con 300 µl de agua estéril autoclavada se colocó de 3 a 5 colonias con un palillo estéril. Las muestras se sometieron a ebullición por 10 minutos (Sepp, Szabó, Uda, & Sakamoto, 1994). Finalmente, el ADN se guardó a -20°C para futuros análisis. Las colonias sugerentes de *Campylobacter* se las guardó en skim milk a -80°C para futuras investigaciones.

3. Identificación molecular de *Campylobacter*

El sistema de detección molecular (MDS, por sus siglas en inglés) está diseñado para el análisis de muestras de alimentos. Para la recuperación de *Campylobacter* de la matriz a analizar se necesita el medio de enriquecimiento *Campylobacter* CE250. Para preparar el medio de enriquecimiento se agregó 41 g de medio a 1000 ml de agua estéril. Por cada 25 g de muestra se añadió 225 ml de enriquecimiento y se incubó a 41°C - 42°C por 22 a 24 horas. Además se utilizó solo medio de enriquecimiento como control (3M, 2019). Debido a que el

sistema está diseñado para la detección de *Campylobacter* en alimentos, en el presente estudio el protocolo fue adaptado para la detección de la mencionada bacteria en muestras de heces.

Debido a que la cantidad de muestras de heces obtenidas fue inferior a 25 g de muestra se probó diferentes cantidades de muestra en diferentes volúmenes de medio de enriquecimiento. Para las diferentes pruebas, las cepas de *Campylobacter coli* y *C. jejuni* fueron preparadas en tres diluciones diferentes utilizando la escala MacFarland: i) muestra pura (nivel alto), ii) 50 UFC (nivel medio) y iii) 1-5 UFC (nivel bajo). Para evaluar el nivel de detección de *Campylobacter* mediante MDS, la muestra de heces de un niño libre de *Campylobacter* fue inoculada con las diferentes diluciones antes mencionadas. Para los diferentes ensayos se probó con dos cantidades mínimas de muestras: 0.3 g e hisopados. Finalmente, se probó con diferentes volúmenes de medio de enriquecimiento: 900 µl, 4 ml, 15 ml y 30 ml.

En el primer caso, se trabajó con dos muestras de heces colectadas por el proyecto PRISA. Para esto se dispensó 900 µl de medio de enriquecimiento en crioviales, al mismo que se le agregó 0.3 g de muestra sin inocular. Como muestra control se incluyó un criovial solo con 900 µl de medio de enriquecimiento. Las muestras fueron incubadas a 41.5°C por 22 horas.

En el segundo caso, se incluyó una muestra de un niño, esta muestra fue dividida en 14 submuestras. Las submuestras fueron inoculadas de la siguiente manera: Hisopado de muestra, muestra 0.3 g, *C. coli* hisopado (SI), *C. coli* hisopado (50 UFC), *C. coli* hisopado (1-5 UFC), *C. coli* 0.3 g (SI), *C. coli* 0.3 g (50 UFC), *C. coli* 0.3 g (1-5 UFC), *C. jejuni* hisopado (SI), *C. jejuni* hisopado (50 UFC), *C. jejuni* hisopado (1-5 UFC), *C. jejuni* 0.3 g (SI), *C. jejuni* 0.3 g (50 UFC), *C. jejuni* 0.3 g (1-5 UFC). Cada submuestra se sembró en 4ml de medio de enriquecimiento. Se incluyó solo medio de enriquecimiento como control. Las muestras se incubaron a 29°C por 22 horas.

En el tercer caso, se probó 45 muestras de la semana 1 del Proyecto PRISA. En base a la comparación de los resultados entre la cantidad de muestra utilizada se escogió implementar el hisopado de las muestras. Este proceso se probó sembrar las muestras en 15 ml y 30 ml de medio de enriquecimiento. De las 45 muestras, seis se sembraron con 30 ml; mientras que 39 fueron sembradas en 15 ml. Las muestras se incubaron a 41.5°C por 22 horas.

Se colectaron muestras durante siete semanas, una vez por semana. Desde la semana dos se procesaron las muestras una vez que se estandarizó la metodología. En base a los resultados de los tres diferentes ensayos, se escogió sembrar mediante hisopado de las muestras en un volumen de 30 ml de medio de enriquecimiento. Las muestras de heces fueron procesadas cada semana inmediatamente después de la colección. Por lo tanto, en 30 ml de medio de enriquecimiento se colocó un hisopado de la muestra de heces y se incubó a 41.5°C por 22 horas. Adicionalmente, se incubó solo medio de enriquecimiento como control.

Después del enriquecimiento de las muestras, se tomó 20 µl de cada una de las muestras incubadas y se colocó en un tubo de lisis del Kit del Sistema Detección Molecular (MDS) de *Campylobacter*. Los tubos de lisis se colocaron en baño de arena a 100°C durante 15 minutos. Debido a la temperatura, los tubos de lisis cambian de color de rosado a amarillo. Después del proceso de lisis, se dejó enfriar los tubos durante 15 minutos. Una vez que el tubo de lisis estaba a temperatura ambiente, se transfirió 20 µl del lisado a los tubos que contienen los reactivos liofilizados. Para esto se transfirió el lisado en un ángulo de 60° y se mezcló el lisado con el liofilizado. En el proceso se incluyó controles positivos y negativos, para esto se transfirió 20 µl del control (medio de enriquecimiento) a cada tubo. Los tubos se colocaron en el equipo del sistema de detección molecular y se dejó correr el programa para *Campylobacter* durante 1 hora.

RESULTADOS

1. Obtención de las muestras

En total, el proyecto PRISA entregó 249 muestras de heces de niños menores de 5 años, de las cuales, 45 muestras sirvieron para la estandarización del método y 204 muestras fueron incluidas en el estudio. Las cuales fueron colectadas en siete parroquias rurales del DMQ: Checa, El Quinche, Pifo, Puembo, Tababela, Yaruquí y Tumbaco. Una de las muestras fue de una parroquia no identificada a la cual se le asignó como S/N (sin identificar). De las muestras colectadas, el 13% correspondió a niños de entre 0 a 2 años, 54% 2 a 4 años y 30% fueron niños mayores de 4 años. La mayoría de las muestras recibidas presentaron aspecto normal (82%), sin aspecto líquido o pastoso

2. Identificación morfológica

De acuerdo con la morfología de las colonias sugerentes para *Campylobacter* sp, se identificó colonias pequeñas color gris metálico brillante y de color gris oscuro. Las colonias fueron catalasa y oxidasa positivo. A nivel microscópico, no se logró identificar colonias sugerentes de *Campylobacter* mediante tinción Gram, pero sí por microscopía de campo oscuro en donde se identificó la presencia de bacilos curvados característicos del género.

3. Identificación molecular

En el primer y segundo ensayo, las muestras fueron negativas. En el tercer ensayo, al utilizar 30 ml de medio de enriquecimiento, se produjo un mejor enriquecimiento. Además, se evidenció la detección de *Campylobacter* en muestras inferiores a 0.3 g o hisopados. Como resultado del tercer ensayo, se obtuvieron 6 muestras positivas.

De las 204 muestras analizadas se obtuvieron 32 muestras positivas para *Campylobacter* sp. De las muestras analizadas se encontró una prevalencia de 16.67% (n= 32) de *Campylobacter* sp (**Tabla 1**). Se encontró un 28% de prevalencia en Checa, 25 % en Pifo, 16% en Puembo, 13% en Yaruquí, 6% en El Quinche, 6% en Tumbaco, 3% Tababela y 3%

S/N (**Figura 1**). Por sexo se encontró 66% de prevalencia para hombres y 34% para mujeres (**Figura 2**). Mientras que, en la prevalencia por edad se obtuvo 66% en niños de 2-4 años, 19% en niños de 0-2 años y 16% de 4 años en adelante (**Figura 3**). Adicionalmente, el 28% de las muestras positivas tuvieron contacto con animales. De las muestras positivas, se evidenció que el 75% presentaron contextura sólida o pastosa. No se observó la presencia de diarrea.

DISCUSION

En este estudio, la prevalencia de *Campylobacter* fue de 16.67% en niños menores de cinco años de 7 parroquias rurales del Distrito Metropolitano de Quito. Esta prevalencia es baja comparada con otros estudios reportados tanto a nivel país como con otros países (Kaakoush et al, 2015). En el Ecuador las investigaciones son escasas, en donde reportan prevalencias entre 23% (Guderian, Ordóñez, & Bossano, 1987), 6.3% (Simaluiza, Toledo, & Fernández, 2018), 19% (Mendoza, 2017) y 17.2% (Vasco, 2014). Mientras que en países como Colombia y Perú, la prevalencia es de 14.4% (Ordóñez, 1985) y 13% (Perales, Camiña, & Quiñonez, 2002) respectivamente. En el Ecuador, no existe una vigilancia o control en la salud pública para que la prevalencia de *Campylobacter* disminuya (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2020). La campilobacteriosis está presente a nivel mundial debido a la infección más común reconocida como zoonosis bacteriana (Havelaar et al., 2009). De acuerdo a Wagenaar (2013) existe una diferencia en la incidencia de casos y la prevalencia de *Campylobacter* en diferentes países lo cual puede deberse a: la sensibilidad de las tecnologías de detección usadas, población, disponibilidad de reservorios naturales, sesgo de vigilancia o debido a la falta de notificación de las infecciones causadas.

Del total de muestras positivas, la mayor parte se encontró en la parroquia de Checa con una prevalencia del 28%. Esta prevalencia para *Campylobacter* sp. en estas comunidades rurales puede darse por el consumo de carne de animales que son reservorios de esta bacteria, ya que en la mayoría de los hogares rurales o semirurales de la sierra ecuatoriana se da la crianza de animales destinados para el consumo local. En los últimos años han aumentado los estudios de prevalencia de *Campylobacter* para este tipo de casos. Se reporta que la mayoría de los hogares en una comunidad semi rural de Quito posee cuyes y pollos de crianza para consumo humano, los cuales tuvieron una prevalencia de 74.5% y 59.7% para *C. jejuni* respectivamente (Graham, Vasco, & Trueba, 2016). Por otra parte, la presencia de

Campylobacter también se ha visto en fincas destinadas al engorde de pollos, en donde 97 granjas en la provincia de Pichincha fueron positivas para el patógeno (Vinueza, y otros, 2017). Además, se reportado que en mataderos de pollos se puede tener una alta contaminación por *Campylobacter* en el producto final, ya que durante los procesos en el matadero muchas veces no se usa la cantidad suficiente de agua o de detergente (Vinueza, Cevallos, Cisneros, Van Damme, & De Zutter, 2018). Por lo tanto, esto puede incidir en que el consumidor final ingiera un alimento contaminado, si este no recibe un tratamiento térmico adecuado o por contaminación cruzada.

En este estudio se evidenció que en la mayoría de las muestras analizadas no existió presencia de diarrea. De acuerdo con Fernández (2011) en América Latina que existan portadores sanos es muy común, se ha evidenciado que una primera exposición a *C. jejuni* produce una respuesta inmune en la mucosa. Aquellas personas que presentan una respuesta inmunitaria específica preexistentes contra *C. jejuni*, tienden a ser menos propensos a desarrollar una infección sintomática después de una re exposición (Havelaar et al., 2009)

Los resultados obtenidos, indican que se obtuvo una mayor prevalencia de *Campylobacter* en niños de 2 a 4 años. Sin embargo, esto puede deberse a que el 54% de las muestras analizadas correspondían a niños de la edad mencionada. Se sabe que *Campylobacter* es más frecuente en niños menores de dos años, disminuyendo su frecuencia a medida que la edad aumenta (Fernandez, 2011). De acuerdo con Araya et al (1986) se evidencia una mayor tasa de contagio por *Campylobacter* sp en niños menores de 2 años, de condiciones socioeconómicas bajas. Esto debido a que viven en áreas que poseen bajas condiciones de saneamiento básico, fuentes de agua potable desprotegidas y al encontrarse en una edad crítica en la que son vulnerables a infecciones

En la presente investigación se obtuvo que un porcentaje mayor de infección por *Campylobacter* en niños varones que en mujeres. No se conocen mecanismos que proporcionen

información para esta diferencia en la incidencia de campilobacteriosis. Sin embargo, se han postulado diferentes hipótesis para explicar esto: factores genéticos (Green, Schwartz, & Peer, 2020), hormonales (Klein, 2000) y de la microbiota (Rizzeto et al., 2018). Con respecto al factor genético en adultos se ha visto que las mujeres poseen una respuesta humoral más fuerte; además de que el cromosoma X posee genes que se encuentran asociados al sistema inmunológico, esto le confiere a la mujer una respuesta inmunitaria más fuerte contra infecciones (Pinheiro, Dejager, & Libert, 2011). Finalmente, en adultos se considera a las hormonas sexuales como un factor importante, ya que se ha evidenciado que la testosterona puede llegar a reprimir las respuestas innata y adaptativa, lo cual puede aumentar las posibilidades de contraer una enfermedad (Trigunaite, Dimo, & Jorgensen, 2015).

El 28% de las muestras positivas tuvieron contacto con animales y pese a que no es una alta cifra, se sabe que uno de los factores de riesgo más importante para las infecciones por *Campylobacter* es el contacto directo con animales domésticos o de granja (Domingues et al., 2012). Esto debido a que los animales domésticos son un reservorio importante de las especies de *Campylobacter* (Blaser et al., 1980). Con este resultado se puede observar que las infecciones por *Campylobacter* en los niños podrían deberse principalmente al consumo de alimentos o agua contaminada, y no necesariamente al contacto con los animales de granja presente en los hogares rurales.

. En este estudio, el cultivo se realizó con el fin de poder obtener colonias aisladas para realizar una extracción de ADN y posteriormente por otros métodos moleculares identificar a nivel de especie el patógeno.

En cuanto a la metodología, se evidenció que la metodología adaptada para muestras de heces funcionó para la rápida identificación de *Campylobacter*. El MDS es un sistema eficiente diseñado para la detección de patógenos en diferentes muestras de alimentos (3M, 2018). Este equipo es económico, rápido y eficiente, ya que se puede realizar el análisis de hasta 96

muestras en simultáneo, no se necesita de un termociclador ni de reactivos externos y se pueden evidenciar los resultados de detección del patógeno en tiempo real. (3M, 2018). A diferencia de otros métodos moleculares como PCR, en este se utiliza directamente la muestra para el análisis y no es necesario la extracción del ADN que involucra más costos y tiempo, por lo cual con este método se puede tener los resultados en 24 horas. Además, es un método en el cual se puede detectar las células viables en una muestra y no solo el ADN. En varios países de Latinoamérica se han buscado métodos de diagnóstico simples y accesibles para el diagnóstico eficiente de *Campylobacter* en aquellos laboratorios que no cuenten con los recursos necesarios (Magalhães, Andrade, & Silva, 1982).

CONCLUSIONES

1. La prevalencia de 16.67% de *Campylobacter* es baja comparada con la reportada en otros estudios realizados en el país, lo cual puede deberse a que muchos de los estudios fueron realizados en clínicas u hospitales.
2. Se determinó que el contacto con animales no es la principal vía de transmisión de *Campylobacter* en niños de zonas rurales a diferencia de otros estudios donde se ha evidenciado una alta prevalencia de *Campylobacter* en animales criados para el consumo humano.
3. Se recomienda futuros análisis con las muestras de ADN guardadas, con el fin de llegar a identificar la prevalencia de especies de *Campylobacter*. Además, se deberían realizar futuras investigaciones con el fin de encontrar cuales son los factores que determinan que se produzca una mayor prevalencia en niños varones que en mujeres.

TABLAS

Tabla 1 . Datos demográficos de las muestras positivas, la columna S/A hace referencia a individuos sintomáticos (S) con diarrea y asintomáticos (A), sin diarrea

ID	Parroquias	Ciclo	Edad	Sexo	S/A	Contacto con animales
38	Pifo	4	5,05	Mujer	A	SI
43	Pifo	4	4,01	Hombre	A	NO
54	Puembo	4	3,02	Hombre	A	SI
60	Puembo	4	3,07	Hombre	A	SI
89	Checa	4	2,06	Hombre	A	NO
114	Yaruquí	4	1,1	Mujer	A	NO
140	Pifo	4	4,03	Mujer	S	NO
167	Pifo	4	3,11	Hombre	A	SI
184	S/N	4	3,04	Hombre	S	NO
195	Pifo	4	0,4	Hombre	A	NO
196	Puembo	4	0,1	Mujer	A	NO
250	Pifo	4	5,02	Hombre	S	NO
263	Yaruquí	4	1,06	Mujer	A	NO
293	Checa	4	2,06	Hombre	A	NO
294	Checa	4	3,11	Mujer	A	NO
297	Checa	4	2	Hombre	A	SI
298	Checa	4	2,03	Hombre	A	NO
309	El Quinche	4	2,11	Hombre	A	NO
351	Tumbaco	4	2,03	Hombre	A	SI
358	Tumbaco	4	4	Hombre	S	NO
427	Pifo	4	5,05	Mujer	A	SI
447	Pifo	4	3,08	Mujer	A	SI
473	Checa	4	2,08	Hombre	S	SI
483	Checa	4	3,01	Hombre	A	NO
483	Checa	4	3,01	Hombre	A	NO
495	Checa	4	2,03	Hombre	A	NO
507	Yaruquí	4	1,06	Hombre	A	NO
530	Tababela	4	3,01	Hombre	S	NO
565	Puembo	4	2,05	Mujer	S	NO
571	puembo	4	2,09	Mujer	A	NO
809	Yaruquí	4	3,06	Hombre	A	NO
818	El Quinche	4	3,04	Mujer	S	NO

FIGURAS

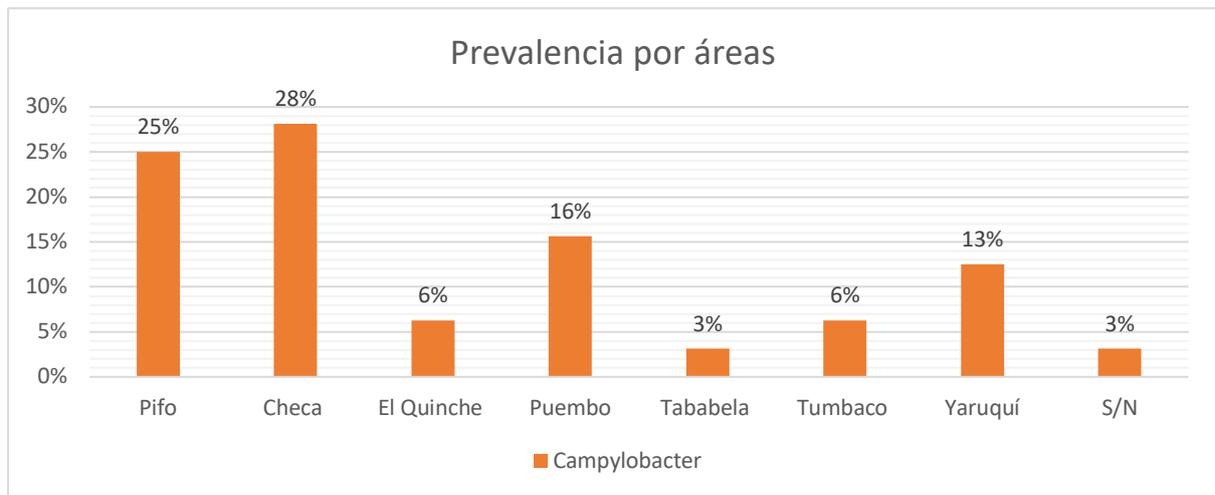
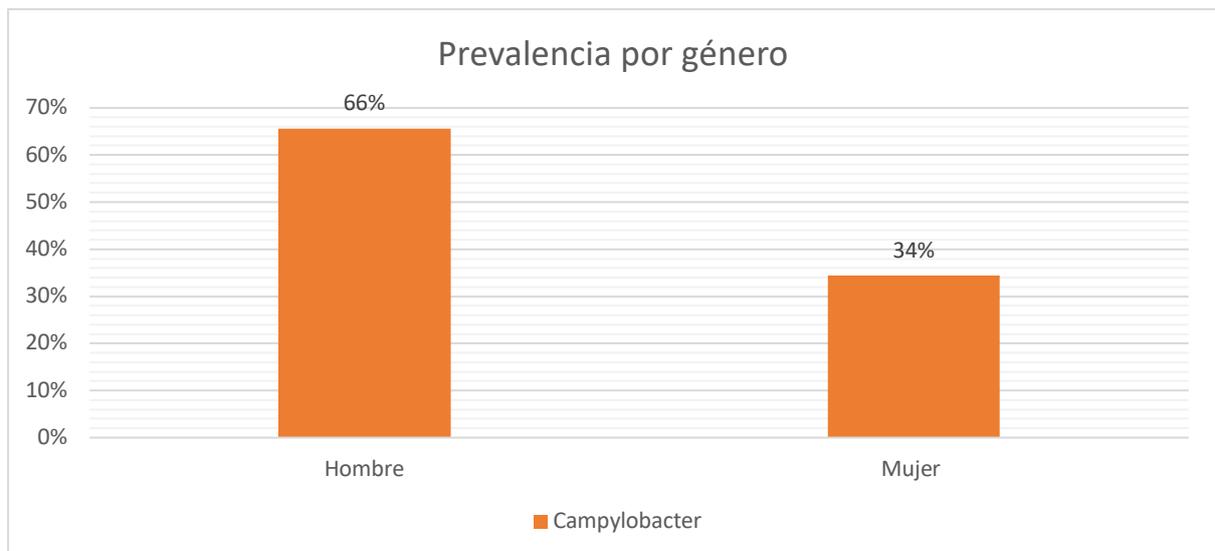
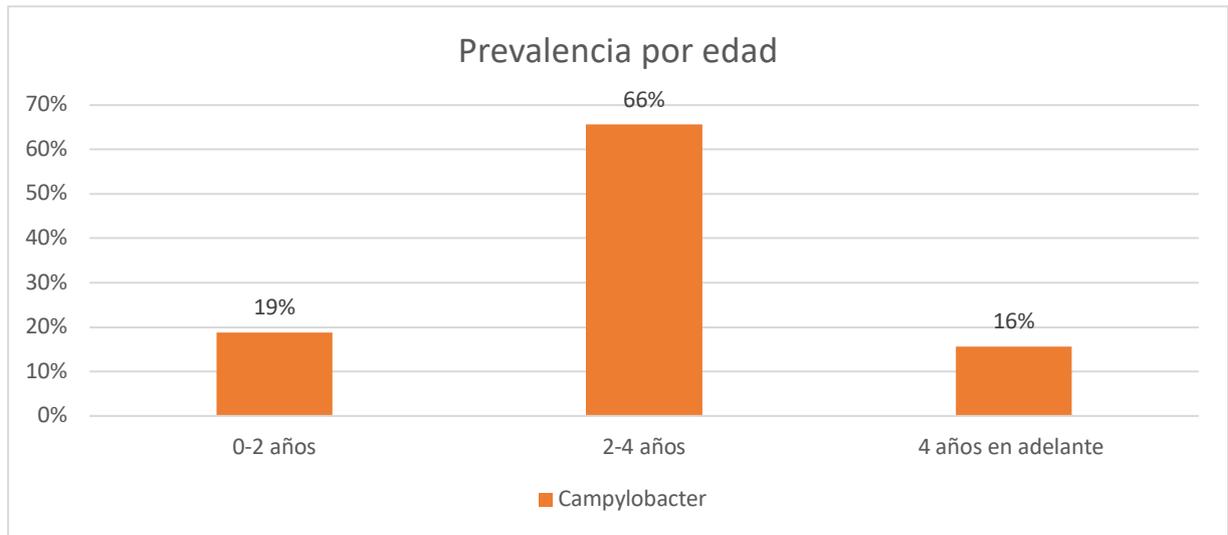
Figura 1 Distribución por parroquia de la prevalencia de *Campylobacter* sp**Figura 2** Distribución por género de la prevalencia de *Campylobacter* sp

Figura 3. Distribución por edad de la prevalencia de *Campylobacter* sp



BIBLIOGRAFÍA

- 3M. (2018). *3M Sistema de Detección Molecular (MDS)*. Obtenido de 3M Ciencia Aplicada a la Vida: [https://www.guialab.com.ar/lanzamientos/3m-sistema-de-deteccion-molecular-mds/#:~:text=Es%20una%20poderosa%20e%20innovadora,\)%20%2B%20la%20detecci%C3%B3n%20por%20bioluminiscencia](https://www.guialab.com.ar/lanzamientos/3m-sistema-de-deteccion-molecular-mds/#:~:text=Es%20una%20poderosa%20e%20innovadora,)%20%2B%20la%20detecci%C3%B3n%20por%20bioluminiscencia).
- 3M. (2019). *Molecular Detection Assay 2 - Campylobacter*. Obtenido de Multimedia 3M: <https://multimedia.3m.com/mws/media/1515665O/3m-molecular-detection-assay-2-campylobacter.pdf>
- Araya, M., Figueroa, G., Espinoza, J., Zarur, X., & Brunser, O. (Jul de 1986). Acute diarrhoea and asymptomatic infection in Chilean preschoolers of low and high socio-economic strata. *Acta Paediatr Scand*, 75(4), 645-651.
- Blaser, M. J., LaForce, F., Wilson, N., & Wang, W. (May de 1980). Reservoirs for human campylobacteriosis. *J Infect Dis*, 141(5), 665-669.
- Blaser, M., Sazie, E., & Williams, L. (1987). The influence of immunity on raw milk associated Campylobacter infection. *Jama*, 257, 43-46.
- Chanqueo, L., García, P., León, E., & Blu, A. (2005). Evaluación de la tinción de Hooker para la búsqueda rutinaria de Campylobacter sp. en el estudio de un síndrome diarreico agudo. *Rev Chilena Infect*, 22(3), 242-246.
- Coker, A., Isokpehi, R., Thomas, B., & Amisu, k. (2002). Human Campylobacteriosis in Developing Countries. *Emerging infectious diseases*, 8(3), 237-244.
- Cronquist, A., Mody, R., & Atkinson, R. (2012). Impacts of culture-independent diagnostic practices on public health surveillance for bacterial enteric pathogens. *Clin Infect Dis*, 54(5), S432-S439.

- Domingues, A., Pires, S., Halasa, T., & Hald, T. (Jun de 2012). Source attribution of human campylobacteriosis using a meta-analysis of case-control studies of sporadic infections. *Epidemiol Infect*, *140*(6), 970-981.
- Ekdahl, K., & Andersson, Y. (2004). Regional risks and seasonality in travel-associated campylobacteriosis. *BMC Infectious Diseases*, *4*(54).
- Fernández, H. (2011). Campylobacter y campylobacteriosis: una mirada desde América del Sur. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, *28*(1), 121-127.
- Fernández, H. (2011). Campylobacter y campylobacteriosis: Una mirada desde América del Sur. *Revista peruana de medicina experimental y salud publica*, *28*(1), 121-127.
- Fernández, S., & Trabulsi, L. (1990). Comparison of two culture media and value of direct microscopic examination for the diagnostic of the intestinal infection due to *Campylobacter jejuni/coli*. *Rev Arg Microbiol*, *21*, 49-53.
- Fitzgerald, C. (2015). Campylobacter. *Clinics in Laboratory Medicine*, *35*(2), 289-298.
- GBD Diarrhoeal Diseases Collaborators. (2017). Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Infect Dis*, 909-948.
- Grados, O., Bravo, N., Black, R., & Butzler, J. (1988). Paediatric campylobacter diarrhoea from household exposure to live chickens in Lima, Peru. *Bulletin of World Health Organization*, *66*(3), 369-374.
- Graham, J., Vasco, K., & Trueba, G. (2016). Hyperendemic *Campylobacter jejuni* in guinea pigs (*Cavia porcellus*) raised for food in a semi-rural community of Quito, Ecuador. *Environmental Microbiology*, *8*(3), 382-387.
- Green, M., Schwartz, N., & Peer, V. (Agust de 2020). Sex differences in campylobacteriosis incidence rates at different ages - a seven country, multi-year, meta-analysis. A potential mechanism for the infection. *MC Infectious Diseases*, 625.

- Guderian, R., Ordóñez, G., & Bossano, R. (1987). Diarrea agua asociada a *Campylobacter* y otros agentes patógenos en Quito, Ecuador. *Bol of Sanit Panam*, 102(4).
- Hara, Y., & Takatori, K. (Oct de 2011). Contamination level and ingestion dose of foodborne pathogens associated with infections. *Epidemiol Infect*, 139(10), 1505-1510.
- Havelaar, A., Ivarsson, S., Lofdahl, M., & Nauta, M. (2009). Estimating the true incidence of campylobacteriosis and salmonellosis in the European Union. *Epidemiol Infect*, 141, 293-302.
- Havelaar, A., Van Pelt, W., & Ang, C. (2009). Immunity to *Campylobacter*: its role in risk assessment and epidemiology. *Crit Rev Microbiol*, 35, 1-22.
- Humphrey, T., O'Brien, S., & Madsen, M. (2007). *Campylobacters* as zoonotic pathogens: A food production perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 117(3), 237-257.
- INEC. (2010). *Censo de Vivienda y Población, y Encuesta de Condiciones de Vida, ECV*. Instituto Nacional Estadísticas y Censos, Quito - Ecuador.
- Kearney, J., Hulshof, K., & Gibney, M. (2001). Eating patterns - temporal distribution, converging and diverging food, meals eaten inside and outside of the home - implications for developing FBDG. *Public Health Nutr*, 4, 693-698.
- Kirkpatrick, B., & Tribble, D. (2011). Update on human *Campylobacter jejuni* infections. *Current Opinion in Gastroenterology*, 21(1), 1-7.
- Klein, S. L. (2000). The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Rev Neurosci Biobehav*, 24, 627-638.
- Magalhães, M., Andrade, M., & Silva, G. (1982). Simple and inexpensive method for culturing *Campylobacter fetus* subsp *jejuni*. *Rev Microbiol*, 13(2), 124-125.

- Mendoza, R. (2017). *Gastroenteritis en menores de 5 años en Hospital Francisco Icaza Bustamante, período 2014 - 2015*. Tesis de pregrado, Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Médicas, Guayaquil.
- Ming, S. (Oct de 2011). The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nat rev Gastroenterol Hepatol*, 8(12), 669-685.
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2020). Enfermedades transmitidas por agua y alimentos. *Gaceta Epidemiológica 2020. SE -44*, <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2020/11/Indicadores-SE-44.pdf>. Obtenido de <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2020/11/Indicadores-SE-44.pdf>
- Nachamkin, I., Engberg, J., & Arestrup, F. (2002). *Diagnosis and antimicrobial susceptibility of Campylobacter species*. Washington, DC: ASM Press.
- OMS. (May de 2020). *Campylobacter*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>
- Ordóñez, S. (1985). Etiology of bacterial enteritis in humans: frequency of campylobacteriosis. *Rev Colombiana Pediatría*, 36(2), 78-93.
- Palomino, C., & González, Y. (Jul de 2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*, 31(3).
- Perales, M., Camiña, M., & Quiñonez, C. (2002). Infección por *Campylobacter* y *Shillega* como causa de diarrea agua acuosa en niños menores de dos años en el distrito de La Vitoria, Lima - Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 20(3), S6.
- Pinheiro, I., Dejager, L., & Libert, C. (2011). X-chromosome-located microRNAs in immunity: might they explain male/female differences? The X chromosome-genomic context may affect X-located miRNAs and downstream signaling, thereby contributing to the enhanced immune response of females. *BioEssays*, 33, 791-801.

- Platts, J., & Kosek, M. (Oct de 2015). Update on the burden of Campylobacter in developing countries. *Curr Opin Infect Dis*, 27(5), 444-450.
- Rao, S., Naficy, A., Savarino, S., Abu, R., Wierzba, T., Peruski, L., . . . Clemens, J. (Jul de 2001). Pathogenicity and convalescent excretion of Campylobacter in rural Egyptian children. *Am J Epidemiol*, 154(2), 166-173.
- Rizzeto, L., Fava, F., Tuohy, K., & Selmi, C. (2018). Connecting the immune system, systemic chronic inflammation and the gut microbiome: the role of sex. *J Autoimmun*, 92, 12-34.
- Samueal, M., Vugia, D., & Shallow, S. (2004). Epidemiology os sporadic Campylobacter infection in the United State and declining trend in incidence. *Clin Infect Dis*, 38(3), S165-S174.
- Secretaria Nacional de Planificación y Desarrollo. (2019). *Agendas Zonales. Zona 9 - Matriz*. Distrito Metropolitano de Quito.
- Sepp, R., Szabó, I., Uda, H., & Sakamoto, H. (1994). Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. *Clinical Pathology*, 47(4), 318-323.
- Simaluiza, R., Toledo, Z., & Fernández, H. (Abril de 2018). www.sochinf.cl 199Comunicación BrevePrevalencia y caracterización del perfil de susceptibilidad antimicrobiana de Campylobacter jejuni y Campylobacter coli en niños con diarrea de la ciudad de Loja, Ecuador. *Revista chilena de infectología*, 35(2), 213-215.
- Streir, J., Jones, R., Toleman, M., Stratchounski, L., & Fritsche, T. (2006). Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns among gastroenteritis-causing pathogens recovered in Europe and Latin America and Salmonella isolates recovered from bloodstream infections in North America and Latin America: report from the SENTRY Ant. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27, 367-375.

- Trigunaite, A., Dimo, J., & Jorgensen, T. (2015). Suppressive effects of androgens on the immune system. *Cell Immunol*, 294, 87-94.
- Vasco, G. (2014). *A Study to Identify the Etiological Agents Causing Diarrhea in Two Low-Income Ecuadorian Communities*. Tesis de postgrado, Universidad San Francisco de Quito, Quito.
- Villa, J., Álvarez, M., Buesa, J., & Castillo, J. (2009). Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(7), 406-411.
- Vinueza, C., Cevallos, M., Cisneros, M., Van Damme, I., & De Zutter, L. (Jan de 2018). Quantification of the Campylobacter contamination on broiler carcasses during the slaughter of Campylobacter positive flocks in semi-industrialized slaughterhouses. *Int J Food Microbiol*, 23(269), 75-79.
- Vinueza, C., Wautier, M., Mastiny, D., Cisneros, M., Van Damme, I., & De Zutter, L. (2017). Prevalence, antimicrobial resistance and genetic diversity of Campylobacter coli and Campylobacter jejuni in Ecuadorian broilers at slaughter age. *Poultry Science*, 96(7), 2366-2374.
- Wagenaar, J., French, N., & Havelaar, A. (Dec de 2013). Preventing Campylobacter at the source: why is it so difficult? *Clin Infect Dis*, 57(11), 1600-1606.
- Walz, S., BaqarS, & Beecham, H. (2001). Preexposure anti-Campylobacter jejuni immunoglobulin a levels associated with reduced risk of Campylobacter diarrhea in adults traveling to Thailand. *Am J Trop Med Hyg*, 65, 652-656.
- WHO. (2012). *The global view campylobacteriosis: Report of an expert consultation, Utrecht, Netherlands, July 2012*. WHO Document Production Services, World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Zumbado, L., Arévalo, A., Donado, M., & Romero, J. (2014). Diagnóstico molecular de *Campylobacter* en la cadena avícola destinada para consumo humano en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 25(2).