



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA  
Y CIENCIAS DE LA SALUD**

**ESCUELA PROFESIONAL DE  
TECNOLOGÍA MÉDICA**

**ÁREA DE LABORATORIO CLÍNICO  
Y ANATOMÍA PATOLÓGICA**

**“COMPARACIÓN DE MEDIOS NO SELECTIVOS PARA  
AISLAMIENTO DE CAMPYLOBACTER USANDO DISCO DE  
AZTREONAM-VANCOMICINA Y FILTRO DE MEMBRANA EN  
CENTRO MÉDICO NAVAL, LIMA 2018”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO  
TECNÓLOGO MÉDICO EN EL ÁREA DE LABORATORIO  
CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA**

**TANIA ROSMERY ROSALES TAYPE**

**ASESOR:**

**LIC.TM. CARLOS JOSÉ PAICO VARGAS  
Lima-Perú**

**2018**

# HOJA DE APROBACIÓN

TANIA ROSMERY ROSALES TAYPE

## **“COMPARACIÓN DE MEDIOS NO SELECTIVOS PARA AISLAMIENTO DE CAMPYLOBACTER USANDO DISCO DE AZTREONAM-VANCOMICINA Y FILTRO DE MEMBRANA EN CENTRO MÉDICO NAVAL, LIMA 2018”**

Esta tesis fue evaluada y aprobada para la obtención del Título de Licenciado en Tecnología Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica por la Universidad Alas Peruanas

---

---

---

LIMA – PERÚ

2018

Se dedica este trabajo:

A mi madre y hermanos que siempre confiaron en mis logros, metas, con un inmenso orgullo para ellos.

A mi hijo Mathias quien es mi mayor motivación, para esforzarme en mis estudios y ser un ejemplo para él.

Se agradece por su contribución para el desarrollo de esta Tesis:

Al personal del servicio de Microbiología del CEMENA.

A mis tutores, Licenciado Wilber Riveros Quintana y el Doctor Claudio Rocha Calderón por su entero compromiso, apoyo, dedicación y asesoría.

A mi asesor Licenciado Carlos José Paico por su asesoría.

**EPÍGRAFE:**

El éxito es ese viejo trío: habilidad, oportunidad  
y valentía.

LUCKMAN, CH.

## RESUMEN

**Objetivo:** Comparar métodos en medios no selectivos para aislamiento de *Campylobacter* usando disco de aztreonam-vancomicina (PAS-AV) y filtro de membrana (FM).

**Materiales y Métodos:** En el aislamiento de *Campylobacter* se utilizó filtro de membrana (Milipore: 47 mm, 0.45um), placa de agar sangre (5%) y discos de antibióticos: aztreonam (30 µg) y vancomicina (30 µg), se prepara una suspensión con solución salina 0.9 % (1:10). Para el cultivo PAS-AV, se toma la suspensión con una torunda y se inocula en medio de agar sangre, secar a temperatura ambiente y luego colocar los discos de antibióticos separados por 2 cm. El cultivo FM, se toma 100 µl de la suspensión y se inocula en medio de agar sangre, previamente colocar el filtro de membrana, después de 30 minutos a 42°C se retira dicho filtro. El PAS-AV y FM se incubaron en condiciones de microaerofilia a 37°C por 72 horas y 42°C por 48 horas, respectivamente. Los medios de cultivos con crecimientos de colonias, fueron identificados para género *Campylobacter*, con la tinción de Gram-Hucker, oxidasa y catalasa.

**Resultados:** Se evaluaron 132 muestras fecales al comparar PAS-AV y FM tienen el mismo rendimiento. La concordancia de índice Kappa fue 97.4% ( $k=0.94$ ,  $p<0.001$ ) entre los cultivos PAS-AV y FM. La proporción de aislamiento para *Campylobacter* fue 44 (33.3%) y 40 (30.3%) para PAS-AV y FM respectivamente ( $P$ -McNemar=0.1). Además la proporción de contaminación por flora fecal fue 7 (5.3%) y 10 (7.6%) para PAS-AV y FM respectivamente ( $P$ -McNemar=0.3). El tiempo de incubación para aislamiento de *Campylobacter* por PAS-AV y FM tiene la misma mediana 48 horas.

**Conclusión:** En esta investigación, se demostró el mismo rendimiento para los cultivos PAS-AV y FM. Además tiene una concordancia muy buena entre PAS-AV y FM. En la proporción de aislamiento para *Campylobacter* y la contaminación por flora fecal no hay diferencias significativas al comparar PAS-AV y FM. El tiempo de incubación para aislamiento de *Campylobacter* por PAS-AV y FM fue lo mismo 48 horas. Por esta razón se recomienda el cultivo PAS-AV como una alternativa para aislamiento de *Campylobacter*.

**Palabras Clave:** *Campylobacter*, Flora fecal, aztreonam, vancomicina, filtro de membrana.

## ABSTRACT

**Objective:** To compare non-selective media for the isolation of *Campylobacter* using aztreonam-vancomycin disk (PAS-AV) and membrane filter (FM).

**Materials and Methods:** Isolation of *Campylobacter* membrane filter (Milipore: 47 mm, 0.45µm), blood agar plate (5%) and antibiotic discs were used: aztreonam (30 µg) and vancomycin (30 µg), then a suspension was prepared with 0.9% saline solution (1:10). For the PAS-AV culture, the suspension is taken with a swab and inoculated it in blood agar medium, dry at room temperature and then place the antibiotic discs separated by 2 cm. The FM cultured, take 100 µl of the suspension and inoculate in blood agar medium, previously place the membrane filter, after 30 minutes at 42°C, remove said filter. The PAS-AV and FM were incubated under microaerophilic conditions, at 37°C for 72 hours and 42°C for 48 hours, respectively. Culture media with colony growths were identified for the *Campylobacter* genus, with Gram-Hucker, oxidase and catalase staining.

**Results:** We evaluated 132 fecal samples when comparing PAS-AV and FM have the same performance. The agreement of the Kappa index was 97.4% ( $k = 0.94$ ,  $p < 0.001$ ) between the PAS-AV and FM cultures. The isolation rate for *Campylobacter* was 44 (33.3%) and 40 (30.3%) for PAS-AV and FM respectively ( $P$ -McNemar = 0.1). In addition, the proportion of contamination by fecal flora was 7 (5.3%) and 10 (7.6%) for PAS-AV and FM respectively ( $P$ -McNemar = 0.3). The incubation time for isolation of *Campylobacter* by PAS-AV and FM has the same median 48 hours.

**Conclusión:** In this research, the same performance was demonstrated for PAS-AV and FM cultures. It also has a very good match between PAS-AV and FM. In the proportion of isolation for *Campylobacter* and contamination by fecal flora there are no significant differences when comparing PAS-AV and FM. The incubation time for isolation of *Campylobacter* by PAS-AV and FM was the same 48 hours. For this reason, PAS-AV culture is recommended as an alternative for *Campylobacter* isolation.

**Keywords:** *Campylobacter*, Fecal flora, aztreonam, vancomycin, membrane filter.

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| CARÁTULA.....                                | 01 |
| HOJA DE APROBACIÓN.....                      | 02 |
| DEDICATORIA.....                             | 03 |
| AGRADECIMIENTO.....                          | 04 |
| EPÍGRAFE.....                                | 05 |
| RESUMEN.....                                 | 06 |
| ABSTRACT.....                                | 07 |
| ÍNDICE.....                                  | 08 |
| LISTA DE TABLAS.....                         | 09 |
| LISTA DE GRÁFICOS.....                       | 10 |
| INTRODUCCIÓN.....                            | 11 |
| <b>CAPITULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b> |    |
| 1.1. Planteamiento del Problema.....         | 12 |
| 1.2. Formulación del Problema.....           | 13 |
| 1.2.1. Problema General.....                 | 13 |
| 1.2.2. Problemas Específicos.....            | 13 |
| 1.3. Objetivos.....                          | 14 |
| 1.3.1. Objetivo General.....                 | 14 |
| 1.3.2. Objetivos Específicos.....            | 14 |
| 1.4. Justificación.....                      | 14 |
| <b>CAPITULO II: MARCO TEÓRICO</b>            |    |
| 2.1. Bases Teóricas.....                     | 16 |
| 2.2. Antecedentes.....                       | 29 |
| 2.2.1. Antecedentes Internacionales.....     | 29 |
| 2.2.2. Antecedentes Nacionales.....          | 32 |
| <b>CAPITULO III: METODOLOGÍA</b>             |    |
| 3.1. Diseño del Estudio.....                 | 34 |
| 3.2. Población.....                          | 34 |
| 3.2.1. Criterios de Inclusión.....           | 34 |
| 3.2.2. Criterios de Exclusión.....           | 34 |
| 3.3. Muestra.....                            | 35 |
| 3.4. Operacionalización de Variables.....    | 37 |
| 3.5. Procedimientos y Técnicas.....          | 38 |
| 3.6. Plan de Análisis de Datos.....          | 42 |
| <b>CAPITULO IV: DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>  |    |
| 4.1. Resultados.....                         | 43 |
| 4.2. Discusión.....                          | 46 |
| 4.3. Conclusiones.....                       | 48 |
| 4.4. Recomendaciones.....                    | 48 |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....      | 49 |
| <b>ANEXOS</b> .....                          | 56 |
| <b>MATRIZ DE CONSISTENCIA</b> .....          | 65 |



## LISTA DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Característica bioquímicas de algunas especies de <i>Campylobacter</i> .....                      | 21 |
| <b>Tabla 2.</b> Rendimiento en cultivos PSA-AV y FM.....  | 43 |
| <b>Tabla 3.</b> Concordancia en cultivos PAS-AV y FM.....   | 43 |
| <b>Tabla 4.</b> Comparación de resultado para aislamiento de <i>Campylobacter</i><br>en cultivos PAS-AV y FM..... | 44 |
| <b>Tabla 5.</b> Comparación de resultado para cultivos contaminados por<br>flora fecal en PAS-AV y FM. ....       | 45 |
| <b>Tabla 6.</b> Tiempo de incubación en cultivos PSA-AV y FM. ....  | 46 |

## LISTA DE GRAFICOS

|   |    |
|---|----|
| <b>Gráfico 1.</b> Aislamiento de <i>Campylobacter</i> ..... | 44 |
| <b>Gráfico 2.</b> Contaminación por flora fecal.....        | 45 |

## INTRODUCCIÓN

*Campylobacter spp.*, es un bacilo curvo Gram negativo, es causante de enfermedad diarreica aguda en niños, las más importante son *C. jejuni* y *C. coli*, asociado a enfermedad humana y son aislada a partir de heces humana en condiciones de microaerofilia a 42°C.

El aislamiento de *Campylobacter* en muestras de heces humanas, son incubados en microaerofilia. Los medios selectivos, tiene la característica de reducir derivados tóxicos como el oxígeno y los antibióticos para inhibir el crecimiento de flora fecal. Por ejemplo medio Skirrow, Karmali, Preston, Butzler, CDA, etc.

El medio de cultivo no selectivo con filtro de membrana (FM), elaborado por Steele y McDermott (1984) evita la necesidad de utilizar medios selectivos y es muy útil para el aislamiento de *Campylobacter*, por lo tanto son medios de bajo costo para los laboratorios de pocos recursos económico.

El medio de cultivo no selectivo con discos de aztreonam y vancomicina (PAS-AV), es una técnica novedosa para aislamiento de *Campylobacter*, donde se utiliza medio agar sangre y discos de antibióticos en vez de un filtro de membrana. El PAS-AV, es una tecnología rápida, sencilla y aplicable en todos los establecimientos de salud donde realicen cultivo coprológico. La finalidad de este proyecto es comparar el PAS-AV con FM para medir la concordancia, la proporción de aislamiento para *Campylobacter*, determinar la proporción de contaminación por flora fecal y el tiempo de incubación para el aislamiento de *Campylobacter*.

## CAPITULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

### 1.1. Planteamiento de Problema

En el Perú algunos laboratorios que realizan cultivo coprológico no están implementado para aislamiento de *Campylobacter*, algunos utilizan métodos de observación microscópica como la tinción de Gram-Hucker porque es rápido, sencillo y de bajo costo pero la desventaja es su sensibilidad de 37.5 %(1).

Otros realizan aislamiento de *Campylobacter jejuni* y *C. coli*, a partir de muestras de heces humana, la cual requiere incubación en condiciones microaerofilia a 42°C por 48 horas en un medio de cultivo. Además para la inhibición de la flora fecal humana, utilizan medios selectivos. Los medios selectivos tienen antimicrobiano como cefazolin en el medio CDA(2), cefoperazona en medio CDA modificado(3) o también un “Cóctel” de antimicrobiano como el medio Skirrow(4), por lo tanto estos medios cultivos son de alto costo económico y no está al alcance de los laboratorios con pocos recursos.

El método de filtro de membrana(5), se utiliza en un medio no selectivo como el agar sangre de oveja al 5%, es de bajo costo y sirve para aislar *Campylobacter*, a través de un filtro de triacetato de celulosa de 0.45  $\mu\text{m}$ , que se coloca en la placa de agar sangre. Aunque este método es efectivo, consume mucho tiempo en la fase analítica.

Por tales motivos tenemos la necesidad de mejorar en la fase analítica para la inhibición de la flora fecal y a la vez el aislamiento de *Campylobacter*, con una

tecnología rápida, sencilla, bajo costo económico y aplicable en todos los establecimientos de salud donde realicen cultivo coprológico.

## **1.2. Formulación de Problema**

### **1.2.1. Problema General**

- ¿Qué rendimiento tiene al comparar métodos en medios no selectivos para aislamiento de *Campylobacter* usando disco de aztreonam-vancomicina (PAS-AV) y filtro de membrana (FM)?

### **1.2.2. Problema Específicos**

- ¿Cuál es la concordancia de los métodos en medios no selectivos PAS-AV y FM para aislamiento de *Campylobacter*?
- ¿Cuál es la proporción de aislamiento para *Campylobacter* en los de los métodos en medios no selectivos PAS-AV y FM?
- ¿Cuál es la proporción de contaminación para la flora fecal en los métodos en medios no selectivos PAS-AV y FM?
- ¿Cuál es el tiempo de incubación para aislamiento de *Campylobacter* en los métodos en medios no selectivos PAS-AV y FM.

### 1.3. Objetivos

#### 1.3.1. Objetivo General

- Comparar métodos en medios no selectivos para aislamiento de *Campylobacter* usando disco de aztreonam-vancomicina (PAS-AV) y filtro de membrana (FM)

#### 1.3.2. Objetivos Especifico

- Determinar la concordancia de los métodos en medios no selectivos PAS-AV y FM para aislamiento de *Campylobacter*.
- Determinar la proporción de aislamiento para *Campylobacter* en los métodos en medios no selectivos PAS-AV y FM.
- Determinar la proporción de contaminación para la flora fecal en los métodos en medios no selectivos PAS-AV y FM.
- Determinar el tiempo de incubación para aislamiento de *Campylobacter* usando los métodos en medios no selectivos PAS-AV y FM.

### 1.4. Justificación

Los medios de cultivo selectivo tienen fuentes de nutrientes específicos para el crecimiento de *Campylobacter*, además utilizan algún tipo de antimicrobiano que inhibe el crecimiento de bacteria Gram negativo y Gram positivo para Aztreonam (30 µg) y Vancomicina (30 µg), respectivamente.

La finalidad de este proyecto es utilizar los discos de aztreonam y vancomicina en medio no selectivo (agar sangre 5%) para inhibir el crecimiento de la flora fecal y tener mejor recuperación de aislamiento para *Campylobacter*, además estos antibióticos se utilizan en cualquier laboratorio donde realizan cultivos microbiológicos para la susceptibilidad microbiana por disco de difusión. Por lo tanto una nueva tecnología en la fase analítica beneficiaría los laboratorios de microbiología de escasos recursos, para implementar en el cultivo coprológico sin necesidad de tener un medio selectivo para aislar *Campylobacter*.

Por estas razones tenemos la necesidad de implementar un método nuevo como PAS-AV en un medio no selectivo, para inhibir la flora fecal y a la vez el aislamiento de *Campylobacter*, con una tecnología rápida de bajo costo económico y sencillo que sea aplicable en todo los establecimientos de salud donde realicen cultivo coprológico.

## CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1. Bases Teóricas

#### 2.1.1. Generalidades y epidemiología

El género *Campylobacter* según la décima edición del Bergey's Manual of Determinative, pertenece al Phylillum Protobacteria, Clase Épsilonprotobacteria, Orden Campylobacterales, Familia Campylobacteraceae. *Campylobacter* es una bacteria Gram negativa de morfología variable: espiral, bacilar o curvo (0.2-0.8µm x 0.5-5 µm) dependiendo de las especies(6). Algunas son aflageladas otros tiene flagelos polar o bipolar. Además posee un movimiento característico que se asemeja a un sacacorchos, que le permite movilizarse(7). Entre sus requerimientos de crecimiento, el más característico es su condición de microaerofilia, ya que crece óptimamente en atmósferas con 5% O<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub> y 10% CO<sub>2</sub>, siendo un microorganismo termófilo con temperaturas óptimas de crecimiento entre 37°C y 42°C, es sensible a las altas temperaturas y no es capaz de sobrevivir en alimentos pasteurizados o adecuadamente cocinados(7,8). Los miembros de la familia Campylobacteraceae no fermenta ni oxida los carbohidratos, sino que obtiene energía de los aminoácidos o de los intermediarios del ciclo ácido tricarboxílico(9). Además tiene actividad oxidasa en los 14 tipos de *Campylobacter* (**Tabla 1**). Los *Campylobacter* termófilos como *C. jejuni*, *C. coli*, *C. laris* y *C. upsaliensis* son asociado con la enfermedad



gastrointestinal en humanos, especialmente *C. coli* y *C. jejuni* la cual cuenta con un reporte de 95% de todo los aislado clínico(10).

**Tabla 1.** Característica bioquímicas de algunas especie de *Campylobacter*

| Característica                | C. jejuni   | C. jejuni    | C. coli | C. lari | C. fetus |
|-------------------------------|-------------|--------------|---------|---------|----------|
|                               | Subsp doyle | Subsp jejuni |         |         |          |
| alfa-hemolisis                | +           | +            | 2       | V       | 2        |
| Oxidasa                       | +           | +            | +       | +       | +        |
| Catalasa                      | V           | +            | +       | +       | +        |
| Hidrolisis de hipurato        | +           | +            | 2       | 2       | 2        |
| Hidrolisis de indoxyl acetato | +           | +            | +       | 2       | 2        |
| Crecimiento en :              |             |              |         |         |          |
| 25°C (Microareofilia)         | 2           | 2            | 2       | 2       | +        |
| 30°C (Microareofilia)         | +           | +            | +       | +       | +        |
| 37°C (Microareofilia)         | +           | +            | +       | +       | +        |
| 42°C (Microareofilia)         | 2           | +            | +       | +       | (+)      |
| Resistencia Ac. Nadilixico    | 2           | 2            | 2       | V       | +        |
| Resistencia Cefalotina        | 2           | +            | +       | +       | 2        |
| Reducción de Nitrato          | 2           | +            | +       | +       | +        |

+ = 90-100% de cepas positivas; (+) = 75-89% de cepas positivas; V = variable; 2 = 11-25% de cepas positivas

La infección con *Campylobacter* es adquirido en humanos por consumo de alimentos contaminados, productos avícolas, leche no pasteurizada y también en contacto con animales, estos son algunos factores de riesgo para la campylobacteriosis(11). El primer reporte de *Campylobacter* se ha realizado en 1886 por Theodore Escherich, quien observo y describió

una bacteria en forma de espiral no cultivable y se encontró en el colon de niños con una enfermedad entérica llamada “cholera infantum”(12).

El género *Campylobacter* es una bacteria que causa una enfermedad diarreica en todo el mundo, afectando principalmente el 1% de la población europea por año(13) y en Estados Unidos afecta 13 de cada 100,000 personas, 13,240 hospitalizaciones y 119 muertes por año(14). La alta incidencia de infección por tipo de *Campylobacter*, *C. jejuni* es 89%, *C. coli* es 8% y otras especies es de 3% esto se da en menores de 5 años(15). En Sudamérica, la frecuencia Campylobacteriosis por *C. jejuni* en niños; 30.1% en Argentina(16), 23% en Ecuador(17) y 18.2% en Perú(18). Además por *C. coli*, 5% en Perú(19).

La distribución geográfica y reservorio de *Campylobacter*, se han encontrado: en África, en países como Kenia y Nigeria, se ha aislado de pollos, cerdos, cabras, ganado vacuno, ovejas, patos y perros domésticos(20,21); En Asia, en países como China, Japón, Malasia e Irán, se ha aislado en aves, vacas, camellos y también alimentos para aves(22–24); en Australia, se ha aislado de perro, gato, bovinos, ovejas y aves(25,26) y en la Antártida se aisló en pingüinos(27).

### 2.1.2. Patogenia y Factores de Virulencia de *Campylobacter*

El tracto gastrointestinal humano está conformado por diferentes bacterias teniendo predominancia *Escherichia*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, and *Klebsiella*(28). Además las especies de *Campylobacter* son hospedero natural de las aves de

corral y de pollos en especial *C. jejuni*, la transmisión en humanos se da por consumo o manipulación de dichas aves corral contaminadas(29).

El ingreso de *C. jejuni* al tracto gastrointestinal humano, lo primero es interactúa con la capa de moco antes de unirse a las células epiteliales del intestino, y esta unión, así como la invasión y transmigración celular, aparecen como requisitos necesarios para la colonización y patogénesis sucesivas de estas bacterias(30–32).

La virulencia y los factores de supervivencia de *Campylobacter* están incluidos en la motilidad, quimiotaxis, adhesión, invasión, la resistencia a múltiples fármacos y los factores de respuesta al estrés(33). Además para la colonización requiere motilidad, adhesión, invasión y producción de toxinas(34).

#### 2.1.2.1. **La Motilidad**

El género *Campylobacter* muestra una motilidad inusual, especialmente en sustancias viscosas. Esto se ha atribuido a la presencia de una o dos flagelos polares y la forma de la célula helicoidal. El primero proporciona un movimiento propulsivo de torque y/o rotación de la celda, mientras que la forma helicoidal facilita la rotación del sacacorchos(35).

El flagelo del *Campylobacter* presenta un cuerpo basal unido a la membrana interna de la bacteria y filamentos extracelular compuesto por la proteína flagelina FlaA y FlaB(36–38). Varios estudios sugieren que el aparato flagelar también funciona como un

sistema de secreción tipo III (T3SS), transportando antígenos de invasión de *Campylobacter* a la célula huésped (39).

#### 2.1.2.2. **Adhesión**

La adherencia de *Campylobacter* a las células epiteliales gastrointestinales del huésped es mediada por varias adhesinas en la superficie bacteriana(40).La adhesión de *Campylobacter* está mediada por una proteína de la membrana externa unión a fibronectina llamada CadF(41).

La fibronectina, es una glicoproteína que se encuentra en las células epiteliales gastrointestinales, unido con CadF, desencadena un proceso de señalización que conduce a la activación de las GTPasas Rac1 y Cdc42 que inducen la internalización de las células de *Campylobacter*(42).

#### 2.1.2.3. **Producción de Toxinas**

*Campylobacter* produce diferente toxinas, dentro de ella la más importante tenemos la toxina de distensión del citoletal (CDT) la cual se caracteriza por la elongación, hinchazón y muerte celular del hospedero(43) y es producido por diferentes especies de *Campylobacter*, incluyendo *C. jejuni*, *C. lari*, *C. coli*, *C. fetus* y *C. upsaliensis*(44).

#### 2.1.2.4. Resistencia Antimicrobiana

Existe evidencia sólida en relación del uso indiscriminado de antimicrobianos con la aparición y propagación de la resistencia a los antimicrobianos en *Campylobacter*(45). El tratamiento de la campylobacteriosis en humanos generalmente tiene tratamiento con antimicrobianos como macrolidos, tetraciclinas o fluoroquinolonas. Sin embargo, la eficacia de tales tratamientos está actualmente comprometida por la creciente resistencia a estos antimicrobianos en *C. jejuni* y *C. coli*(46,47).

#### 2.1.3. Diagnóstico de laboratorio para *Campylobacter*

##### 2.1.3.1. Colección, transporte y conservación de la muestra para aislamiento de *Campylobacter*

El diagnóstico de *Campylobacter* en pacientes con síntoma gastrointestinal aguda, es preferible las muestras fecales(15); sin embargo los hisopados rectales son aceptados en infantes cuando hay dificultad en la toma de muestra(48).

La muestra de heces es colectada durante la fase aguda de la enfermedad diarreica y antes de iniciar un tratamiento antimicrobiano. Además se puede conservar a temperatura ambiente dentro las 2 horas. En medio de transporte Cary-Blair se utiliza cuando es mayor de 2 horas y se puede almacenar a 4°C si el proceso no se realiza de inmediato(15).

#### **2.1.3.2. Métodos microscópicos para el diagnóstico de *Campylobacter*.**

Las pruebas microscópicas por lo general son presuntiva la finalidad es visualizar la morfología bacteriana a partir de una muestra fecal diarreica con diferente coloración.

Tenemos el método Gram directo con un valor predictivo de 60%(49), la microscopia de contraste de fase 85.7%(50), la tinción de Gram-Hucker; con una sensibilidad de 37% y especificidad de 100%(1); la tinción de Vago con una sensibilidad de 3.63%(19).

#### **2.1.3.3. Cultivo microbiológicos para el diagnóstico de *Campylobacter*.**

La selección de medios cultivos para aislamiento de *Campylobacter* a partir de muestras de heces en las que presenta microorganismo competidores, se debe utilizar método de filtración o medios selectivos(51). Aunque no existe un Gold estándar para el aislamiento rutinario de todas las especies de *Campylobacter*(52).

Los medios selectivos tienen componentes de enriquecimientos y antimicrobiano parece ser más importante para el aislamiento inicial debido a que el tiempo de incubación es de 24 a 48 h. Sin embargo la inhibición de la microflora fecal es más importante dentro las 24 h de aislamiento de *Campylobacter*(53). El primer aislamiento de *Campylobacter* en heces fue llevado a cabo por Skirrow, que desarrollo un medio selectivo como medio base agar sangre

suplementado con trimetoprim, polimixina B y vancomicina(54). Blaser et al. desarrollo el medio Campy-BAP, es un medio selectivo que se emplea en laboratorio clínico(55). El medio CCDA, contiene cefazolina y deoxicolato de sodio. Luego se demostró siendo más selectivo al reemplazar cefalotina por cefoperazona(2). Después tenemos medio Karmali que incluye vancomicina, ciclohexamida y cefoperazona para aislamiento de *Campylobacter*(56). Además hay medio selectivo libre de sangre (CAT) para aislamiento de *Campylobacter* a 37°C, este medio contiene cefoperazona, amfoterecina B y teicoplanina como agente selectivo(57).

El método de filtración de membrana fue inicialmente diseñado para el aislamiento de *C. fetus* en ganado y luego en humanos. A diferencia de muchas bacterias, *Campylobacter* suele pasar a través de filtros de 0.45 µm. Se han probado varios tamaños de poro de membrana, medios de cultivo y técnicas de aislamiento. Por lo general, se coloca una suspensión de 10% de heces sobre la superficie de un filtro de membrana durante algún tiempo y la muestra filtrada se siembra sobre una placa que contiene un medio selectivo(58).

#### 2.1.3.4. **Identificación microbiológica de especies de *Campylobacter***

Las especies de *Campylobacter*, se pueden identificar mediante pruebas bioquímicas por sus características fenotípicas para diferenciar cada especie.

La microscopia óptica nos ayuda a diferenciar la morfología bacteriana característica de la familia Campylobacteraceae (bacilos curvos, punteados o la forma de vuelo de gaviota).

La prueba de la catalasa, es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias, descomponen el peróxido de Hidrogeno en agua y oxígeno. La reacción se detecta por la formación de burbujas.

La prueba de la oxidasa, determina la presencia del citocromo C, este componente oxida NNN´N´, tetrametil, 1,4, fenilendiamina. La oxidación se detecta de como color azul.

La temperatura de incubación para el crecimiento microbiano, hay ciertas especie de *Campylobacter*, que pueden crecer a 30°C y a 42°C.

La prueba de hidrolisis de Hipurato de Sodio, sirve para detectar la enzima hipuricasa que tienen algunos *Campylobacter*. El producto de la hidrolisis de Hipurato da como resultado glicina, que reaccionara con la nihindrina provocando un cambio de color.

Además la susceptibilidad antimicrobiana a cefalotina y ácido nadilixico. Tenemos algunas especies de *Campylobacter*.

#### 2.1.3.5. **Métodos moleculares**

Los ensayos de tipificación para el desarrollo de *Campylobacter*, a través de plásmido basado por reacción de la cadena polimerasa



(PCR). Los plásmidos nos han proporcionado un método de tipificación adecuado para *C. jejuni* y *C. coli* debido a la gran variabilidad en la prevalencia (19-95%), y los tamaños de los plásmidos (2-208 kbp) se han encontrados en diferentes cepas(59,60).

El esquema de tipificación basado por PCR, amplificación de fragmento de polimorfismo de secuencias repetitivas (RFLP) del genes *flaA* y *flaB*, han sido utilizados en varios estudios de investigación. Sin embargo, la mayoría de los métodos de PCR son de bajo poder discriminatorio, y muy pocos han sido automatizados (por ejemplo, REP-PCR). Además, algunos de estos métodos de PCR carecen de un protocolo estandarizado para asegurar la repetitividad(61).

La electroforesis de campo pulsado (PFGE), fue descubierto en 1980, se ha convertido en una importante herramienta para la aplicación en sistemas de vigilancia en todo el mundo. PFGE, es un método de tipificación en el que todo el genoma de un organismo se corta utilizando enzimas de restricción, y luego los fragmentos de ADN se separan en base a sus tamaños. Además puede resolver moléculas de ADN de hasta 12 Mb de tamaño y se ha convertido en un importante método molecular para la tipificación de patógenos bacterianos transmitidos por los alimentos, especialmente *C. jejuni* y *C. coli*(62). La PFGE es adecuado para establecer relaciones epidemiológicas a corto plazo de *C. jejuni* / *C. coli*. Además permite

un rápido intercambio de resultados para una identificación rápida, eficiente y respuesta a brotes asociados a *Campylobacter*. Existen varios protocolos estandarizados para realizar PFGE en aislados de *Campylobacter*(63,64).

Los cebadores más comunes para *C. jejuni* y *C. coli* en ensayos de PCR multiplex

| <b>Especie identifica da</b> | <b>Genes blanco</b>               | <b>Nombre del cebador</b> | <b>Secuencias (5'-3')</b>                                      | <b>Tamaño del producto (bp)</b> |
|------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|--|---------------------------------|
| C. coli y C. jejuni          | gen CadF (adhesina, fibronectina) | CadF2B<br>CadR1B          | TTGAAGGTAATTTAGATATG<br>CTAATACCTAAAGTTGAAAC                   | 400                             |
| C. coli                      | gen Aspartokinasa                 | CC18F<br>CC519R           | GGTATGATTTCTACAAAGCGA<br>G<br>ATAAAAGACTATCGTCGCGTG            | 500                             |
|                              | gen CeuE (transporte sideroforos) | COL1<br>COL2              | ATGAAAAAATATTTAGTTTTTG<br>CA<br>ATTTTATTATTTGTAGCAGCG          | 894                             |
|                              | Gen Aspartokinasa                 | ask-F-JK<br>ask-R-JK      | GGCTCCTTTAATGGCCGCAAG<br>ATT<br>AGACTATCGTCGCGTGATTTA<br>GCG   | 306                             |
| C. jejuni                    | gen Hipuricasa                    | HipO-F<br>HipO-R          | GACTTCGTGCAGATATGGATG<br>CTT<br>GCTATAACTATCCGAAGAAGC<br>CATCA | 344                             |
|                              | gen GlyA                          | glyA-F-JK<br>glyA-R-JK    | TGGCGGACATTTAACTCATGG<br>TGC<br>CCTGCCACAACAAGACCTGCA<br>ATA   | 264                             |

#### 2.1.3.6. **Susceptibilidad antimicrobiana**

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados de *Campylobacter* son de gran importancia para las opciones de tratamiento, especialmente en las enfermedades sistémicas(65).

El Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST), propuso recientemente un corte epidemiológico (ECOFF) para un número limitado de compuestos antimicrobianos como macrolidos, tetraciclina y fluoroquinolona para *C. jejuni* y *C. coli*(66).

El método de elección para la susceptibilidad de *Campylobacter* recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) es la dilución en agar, la microdilución en caldo y también por método de disco difusión para los antimicrobianos como eritromicina, tetraciclina, doxiciclina y ciprofloxacino(67).

##### 2.1.3.6.1. **Mecanismo de resistencia**

Las quinolonas inhiben la síntesis de ADN bacteriano que causa la muerte celular. Las dianas de las quinolonas son dos grandes enzimas bacterianas, ADN girasa y topoisomerasa IV(68).

Existen varias modificaciones individuales de GyrA individuales que se han descrito como asociadas con la resistencia a fluoroquinolona en las especies de *Campylobacter* como la secuencia Thr86Ile, Asp90Asn, Thr86Lys, Thr86Ala, Thr86Val y

Asp90Tyr. Sin embargo, la mutación más frecuentemente observada en *Campylobacter* resistente a la quinolonas es el cambio de C257T en el gen *gyrA*, que conduce a la sustitución de Thr86Ile en la girasa y confiere la resistencia de alto nivel a este grupo de antimicrobianos(69).

La bomba de eflujo CmeABC es el sistema de eflujo más común en *Campylobacter* y trabaja en sinergia con mutaciones de GyrA en causar resistencia a la fluoroquinolona(70).

La resistencia a las tetraciclinas en *Campylobacter* es conferida por el gen *tet (0)*, que es ampliamente presente en *C. jejuni* y *C. coli*(71,72). El gen *tet (0)*, que codifica proteínas de protección ribosomal (RPP), se localiza en un plásmido auto-transmisible de un tamaño molecular de 45 a 58 kb(73). Basándose en el contenido de G-C, homología de secuencia, uso de codones y análisis de hibridación, parece que el gen *Campylobacter tet (0)* probablemente fue adquirido por transferencia de genes horizontal de género *Streptomyces*, *Streptococcus* o *Enterococcus* spp.(72,74).

Los macrolidos son ampliamente utilizados agentes antimicrobianos y se consideran fármacos seguros y eficaces. Su espectro antimicrobiano cubre la mayoría de los microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos, incluyendo *Campylobacter*. Además interrumpen la síntesis de proteínas en el ribosoma bacteriano dirigiendo la subunidad 50S e

inhiben la síntesis proteica dependiente de ARN bacteriano(75). La resistencia a macrolidos en *Campylobacter* es el resultado de la modificación del sitio de unión del ribosomas mediante la mutación del ARNr de 23S o cambios en las proteínas resultantes en el sitio por metilación o modificación enzimática del fármaco(74,76).

## 2.2. Antecedentes

### 2.2.1. Antecedentes Internacionales

**Steele et al. (1984)** Compara el uso de filtro de membrana de triacetato de celulosa aplicados en superficie de las placas de agar de sangre no selectivas fueron tan eficaz como el uso de medios antimicrobiano en el aislamiento de *C. jejuni* en pacientes con diarrea. Para evaluar el método se examinaron 1000 muestras fecales de pacientes sospechosos de tener diarrea infecciosa entre enero y octubre de 1982. El aislamiento de *C. jejuni* se realizó mediante en medio selectivo conteniendo agar sangre oveja 10%, vancomicina 10gr/L, trimetoprim 5 mg/L y colistin 2,9 mg/L. En el método filtración de membrana se colocó un filtro de triacetato de celulosa de 47 mm, 0,45 pm sobre un agar de sangre de oveja al 6%. Ambos métodos las placas con medios de cultivos, se incubaron en una atmósfera reducida de oxígeno que contenía 5% de oxígeno, 10% de dióxido de carbono y 85% de nitrógeno a 42°C hasta 5 días. De la muestra se examinadas utilizando ambos métodos el aislamiento de *Campylobacter* es la tasa general del 56 (5,6%) de los cuales 45 (80%)

fueron aislados en el medio antibiótico selectivo y 50 (89%) fueron aislados por el método de filtración de membrana. Todos los *Campylobacter* aislados en el medio selectivo fueron *C. jejuni*. Este método detectó seis cepas de *C. jejuni* que no se aislaron usando el método de filtro. El uso del método filtración de membrana, pueden resultar en la detección de los casos de infección entérica por *Campylobacter* y pueden ser utilizados por pequeños laboratorios con acceso limitado a medios selectivos. También pueden facilitar el aislamiento de *Campylobacter* sensibles a antimicrobiano(5).

**Kulkarni et al. (2002)** Determinar el método óptimo para la detección de *Campylobacter* a partir de muestras de heces comparando diferente métodos del cultivo: En medio selectivo, filtración de membrana y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se recolectaron 343 muestras de heces que fueron investigadas por cada uno de los tres métodos mencionados anteriormente. El medio selectivo se realizó con placas de agar con charcoal, desoxicolato de cefoperazona. El método de filtración en membrana se realizó usando filtros de triacetato de celulosa con poros de 0,45  $\mu\text{m}$  colocados en placas de agar sangre. Los *Campylobacter* enteropatogénicos se detectaron utilizando un algoritmo de identificación por PCR, para detección y identificación de especies utilizando un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas PCR (PCR-ELISA), ambos basados en el gen 16S rRNA. De las 343 muestras analizadas, 23 fueron positivas por uno o más métodos. De éstos, 17 fueron positivos por método selectivo, 12 por el método de filtración de membrana, y 20 por el algoritmo de identificación PCR. Un total de 18 de

los 23 positivos fueron identificados como *C. jejuni* y *C.coli* por el algoritmo de identificación PCR, en comparación con 14 identificados al nivel de género por cultivo selectivo y 10 por filtración por membrana. Entre las cinco muestras positivas restantes; un *C. hyointestinalis*, un *C. upsaliensis* fue detectada sólo por el algoritmo de identificación PCR; un *Campylobacter spp.*, fue detectado por filtración de membrana y en cultivo selectivo y posteriormente identificado como *C. concisus*; un *Campylobacter spp.*, se detectó por filtración de membrana que luego se identificó como *Arcobacter spp*; y un *Campylobacter spp.*, detectado sólo por cultivo selectivo. No hubo diferencias significativas entre la detección por cultivo selectivo y los otros dos métodos. Sin embargo, la detección por PCR fue significativamente mejor que por filtración por membrana. El método óptimo para la detección de *Campylobacter* de muestras de heces en el laboratorio de diagnóstico sigue siendo el cultivo en medio selectivo(77).

**Thomas et al. (2005)** Determinar la inhibición de la contaminación fecal y la temperatura a 37°C en medio selectivo usando aztreonam para *Campylobacter*. Ciento cincuenta muestras fecales hospitalarias se cultivaron rutinariamente y todas las placas se incubaron microaerofilia durante tres días en medio selectivo: Agar base charcol, aztreonam, anfotericina y vancomicina (AAV) a 37°C y en medio agar sangre Columbia(CDA modificada) a 43°C.En el estudio piloto (150 muestras), el medio de AAV (37°C) tenía una mayor sensibilidad para aislar *Campylobacter*. 14 fueron aislados en AAV en comparación con 10 en CDA modificada (43°C) durante tres días, y 9 fueron aislados en AAV

medio en comparación con 5 en CDA modificada (43°C) después de 24 horas de incubación. Las tasas de contaminación siguieron siendo bajas. Este es el primer informe del medio AVV utilizado como medio selectivo capaz de cultivar *Campylobacter* de importancia patogénica a 37°C, por lo tanto, se necesitan estudios adicionales(78).

**Chanqueo et al. (2005)** Evaluaron la tinción de Hucker para la búsqueda rutinaria de *Campylobacter* en muestras de heces en comparación de cultivo microbiológico. Se estudiaron 5750 muestra de coprocultivo de los cuales se siembra en medios de cultivos, se realiza un frotis que fue teñido con partes iguales de cristal violeta de Hucker y bicarbonato de sodio al 1% durante uno a dos minutos. Se observaron bacilos curvos sugerentes a *Campylobacter* en 115 (2%) por la tinción de Hucker teniendo 37.5% de sensibilidad y 100% de especificidad. La búsqueda de *Campylobacter* por medio de cultivo específico es fundamental para el diagnóstico etiológico de un síndrome diarreico agudo(1).

### 2.2.2. Antecedentes Nacionales

**Moya-Salazar et al. (2016)** Evaluaron el rendimiento del medio agar sangre con filtro (ASF) en comparación con el agar Karnali (AK) para el diagnóstico de *Campylobacter spp* en coprocultivo. Se recolectaron 287 muestra positiva de neonatos. Las muestras fueron sembradas en ASF y en AK e incubadas hasta 72 horas en microaerofilia. La diferenciación de especies se realizó con la hidrólisis de hipurato. El aislamiento de *Campylobacter* en ASF y AK fue de 78.3% y 21.7% respectivamente. La sensibilidad fue de 90.9% para ASF. El tiempo de crecimiento promedio



fue de  $32.7 \pm 11$  horas y la contaminación de medios de cultivo fue 61.7% para AK. Se aislaron 74.8% de especies de *Campylobacter* no jejuni. En conclusión el Agar Sangre con filtro de membrana presenta un mayor rendimiento diagnóstico que Agar Karmali para el aislamiento de *Campylobacter*, en un tiempo relativamente menor y demostrando ser más costo-efectivo que el medio de aislamiento selectivo(79).

## **CAPITULO III: METODOLOGÍA**

### **3.1. Diseño del Estudio**

Estudio descriptivo, prospectivo y correlacionar de corte transversal.

### **3.2. Población**

Para el siguiente estudio se tomaron en cuenta la población que son atendidos por enfermedades diarreicas agudas (EDA), en el Hospital Centro Médico Naval (CEMENA), ubicado en el distrito de Bellavista de la provincia del Callao, Departamento Lima, Perú. Durante el periodo de Enero – Junio 2018.

#### **3.2.1. Criterio de inclusión:**

- Aislamiento de *Campylobacter* de coprocultivos positivos.
- Muestra adecuadamente conservada en medio de transporte dentro las 72 horas.
- Pacientes con Enfermedad diarreica aguda menores de 5 años.
- Muestra de heces con reacción inflamatoria.

#### **3.2.2. Criterio de exclusión**

- Cultivos de pacientes no provenientes del servicio de microbiología.
- Muestra sin el rotulo adecuado o no legibles.
- Muestras de heces conservadas en pañal.

- Muestra en medio de transporte sin cadena de frío.
- Pacientes que hayan recibido algún tipo de tratamiento antimicrobiano durante la enfermedad diarreica aguda.
- Muestra de heces con conservantes (formalina).

### 3.3. Muestra

La muestra está constituida por todos los aislamientos de *Campylobacter*. El tamaño muestral se calculó por STATA 12, considerando la totalidad de resultado positivo durante el año 2017 (200 coprocultivos positivos) una sensibilidad de 95%, una heterogeneidad de 50% y un margen de error de 5.

Para este proyecto de investigación el número mínimo de la muestra representativa se halló mediante la siguiente formula:

$$n = \frac{N.Z^2_{1-\alpha/2}.P.Q}{(N-1).e^2 + z^2_{1-\alpha/2}. P.Q}$$

**Dónde:**

- Nivel de confianza: 1- $\alpha$ .
- $\alpha$  : Nivel de significancia (ejemplo:  $\alpha= 5\% = 0.05$ )
- Z: valor tabulado de distribución Normal Estandarizada

$$(z_{1-0.05/2} = z_{0.975} = 1.96)$$

- Margen de error permitido por el responsable del estudio ( $e=5%=0.05$ )
- P: probabilidad de éxito que ocurra el suceso  $50%=0.5$
- q: probabilidad que no ocurra el suceso ( $1- p = 50% = 0.5$ )

Por tanto:

$$n = \frac{200(1,95)^2(0,5) (0,5)}{(200-1)(0,05)^2 + (1,95)^2 (0,5) (0,5)}$$

$$n = 132$$

Obteniéndose un tamaño muestral de 132 coprocultivos positivos de pacientes derivados a Servicio de Microbiología del CENEMA durante el periodo de estudio.

### 3.4. Operacionalización de Variables

| VARIABLE  | DEFINICIÓN CONCEPTUAL   | DEFINICIÓN OPERACIONAL   | TIPO         | ESCALA   | FORMA DE REGISTRO    |
|---|---|--|--------------|----------|----------------------|
| <b>PRINCIPAL</b><br>MEDIOS DE CULTIVO                   | Indica la capacidad de aislamiento de <i>Campylobacter</i> por el medio PAS-AV.                     | Resultado positivo por la presencia de <i>Campylobacter</i> o contaminado por flora fecal. | Cualitativo  | Nominal  | Positivo             |
|   |   |  |              |          | Negativo             |
|   | Indica la capacidad de aislamiento de <i>Campylobacter</i> por el medio FM.                         | Resultado positivo por la presencia de <i>Campylobacter</i> o contaminado por flora fecal. | Cualitativo  | Nominal  | Positivo             |
|   |   |  |              |          | Negativo             |
|   |   |  |              |          | Contaminado          |
| <b>SECUNDARIO</b><br>CONCORDANCIA DE MEDIOS DE CULTIVOS | Es la comparación de los resultados por los medios PAS-AV y FM.                                     | El índice de Kappa ( $k$ ), mide el grado de concordancia                                  | Cualitativo  | Ordinal  | Pobre (menor de 0.2) |
|   |   |  |              |          | Débil (0.21-0.40)    |
|   |   |  |              |          | Moderado (0.41-0.60) |
|   |   |  |              |          | Buena (0.61-0.80)    |
|   |   |  |              |          | Muy Buena (0.81-1.0) |
| AISLAMIENTO DE CAMPYLOBACTER                            | Es la razón en cual indica la capacidad de aislar <i>Campylobacter</i> por los medios PAS-AV y FM.  | Es el numero cultivos con <i>Campylobacter</i> entre total de cultivos.                    | Cuantitativo | Continuo | Numérico             |
| CONTAMINACIÓN POR FLORA FECAL                           | Es la razón en cual indica la capacidad de contaminarse por flora fecal por los medios PAS-AV y FM. | Es el numero cultivos con Flora fecal entre total de cultivos.                             | Cuantitativo | Continuo | Numérico             |
| TIEMPO DE INCUBACIÓN                                    | Es el periodo de tiempo para aislamiento de <i>Campylobacter</i> por los medios PAS-AV y FM.        | El tiempo se mide cada 24 horas.   | Cualitativo  | Ordinal  | 24 horas             |
|   |   |  |              |          | 48 horas             |
|   |   |  |              |          | 72 horas             |

### **3.5. Procedimientos y Técnicas**

#### **3.5.1. Solicitud de autorización:**

Aprobado por el comité de Ética y División de Investigación del CEMENA “Cirujano Mayor Santiago Távora”. **Anexo 1.**

#### **3.5.2. Transporte de muestra de heces humanas y la preparación de la suspensión fecal:**

Las muestras de heces humanas, son recolectadas en dos formas en frasco colector o en medio Cary Blair(79). En frasco colector se conserva dentro las 2 horas a temperatura ambiente o en Cary Blair con dos hisopos no mayor de 3 días a 4°C(80). Luego cada muestra se prepara una suspensión con solución salina 0.9 % en proporción de 1:10, en un tubo de vidrio(5).

#### **3.5.3. Método de cultivo en medio no selectivo usando disco de aztreonam-vancomicina (PAS-AV)**

Se toma la suspensión antes mencionada, con un hisopo estéril. Luego presionar el hisopo con la pared interna del tubo y por encima de la suspensión. Luego inocular en toda la superficie del medio agar sangre de oveja al 5 %, secar a temperatura ambiente, agregar un disco de Aztreonam de 30 µg y un disco de Vancomicina de 30 µg, los discos separados a 2 cm. Luego incubar a 37 °C por 72 h a cada placa en condiciones microaerofilia de 5 % de Oxígeno, 10 % de dióxido de Carbono y 85 % de Nitrógeno. La presencia de unidades formadora de

colonias (UFC), dentro los halos de inhibición formados por los discos de aztreonam y vancomicina es una prueba positiva (**Anexo 2**), luego se procede a realizar las pruebas para la identificación de *Campylobacter*. Una prueba negativa es ausencia de UFC dentro del halo de inhibición por los antibióticos (**Anexo 3**).

#### 3.5.4. **Método de cultivo en medio no selectivo usando filtro de membrana (FM)**

Se coloca en la parte central de la placa de agar sangre de oveja al 5 % un filtro de membrana (Milipore: 47 mm, 0.45um) (**Anexo 4**). Luego agregar 100 uL de la suspensión fecal sobre el filtro dejar secar a 42°C por 30 min y luego retirar el filtro de membrana e incubar a 42 °C por 48 horas en condiciones microaerofilia de 5 % de Oxígeno, 10 % de dióxido de Carbono y 85 % de Nitrógeno. La presencia de UFC, dentro de la zona de filtro de membrana se procederá a realizar las pruebas para identificación de *Campylobacter* en ausencia de UFC será un cultivo negativo. Este método fue elaborado por Steele y McDermott(5).

#### 3.5.5. **Identificación de *Campylobacter spp.***

Las UFC que crecen dentro la intersección del halo de inhibición formado por aztreonam-vancomicina en el método PAS-AV y en el método FM, se realiza tinción de Gram-Hucker(1), oxidasa y catalasa.

##### 3.5.5.1. **Tinción de Gram-Hucker**

Se toma una colonia con una asa de siembra ya sea del método PAS-AV o el método FM se coloca en un portaobjeto con una gota

de solución salina. Fijar el frotis microbiano por calor con cuidado de no quemar la preparación. Hacer pases cortos controlando la temperatura del portaobjetos por contacto dorso mano. Cubrir la preparación con Cristal Violeta Oxalato solución Gram-Hucker durante 1 minuto. Luego lavar el exceso de colorante suavemente con agua corriente. Cubrir la preparación con Líquido de lugol durante 1 minuto para volver a lavar con agua. Decolorar, gota a gota y no más de 1 minuto con Alcohol-Acetona. Luego lavar de nuevo con agua. Cubrir la preparación con Safranina O durante un minuto. Lavar con agua y dejar secar. Luego observar al microscopio con objetivo de inmersión. Preparación de los reactivos **(Anexo 5)**.

La tinción de Gram-Hucker es una coloración para diferenciar bacterias Gram positivas y Gram negativas, según la retención que presenta al colorante. Los microorganismos teñidos con el colorante Cristal Violeta son los denominados Gram positivos y los microorganismos teñidos con Safranina O son los Gram-negativos. Además nos proporciona la morfología bacteriana. Por lo tanto *Campylobacter* es una bacteria Gram negativo de cuya morfología es variado: bacilos curvos, punteados o en forma de vuelo de gaviota **(Anexo 6)**.

#### 3.5.5.2. Prueba de Oxidasa

Se toma con un palillo aplicador una colonia de la placa PAS-AV o FM y se agrega sobre un papel filtro impregnado con oxalato de



dimetil-para-fenilendiamina, el cual es el sustrato de la enzima oxidasa. Generalmente dentro el minuto y a temperatura ambiente se detecta los resultados positivos de color rojo-fucsia en *Campylobacter* una reacción lenta pasado los 2 minutos, debe considerarse negativo para otros microorganismos.

#### 3.5.5.3. Prueba de Catalasa

Se toma con un palillo aplicador una colonia de la placa PAS-AV o FM y se agrega sobre la superficie de un portaobjeto. Luego añadir una gota de peróxido de hidrogeno al 30 %. Para una prueba cualitativa, la rápida aparición y producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia indica una reacción positiva. Dado que el peróxido de hidrogeno es descompuesto en agua y oxigeno por la presencia de la enzima catalasa en el *Campylobacter*.

#### 3.5.6. Control de Calidad

Para asegurar la calidad de los resultados en el flujograma de investigación (**Anexo 7**), se consideraron todos los requerimientos necesarios en la preparación del agar Trypticasa de soya (Merck, Darmstadt, Germany). Asimismo, para la validación de los métodos fenotípicos para la identificación de cepas *Campylobacter* se utilizaran cepas ATCC (*American Type Culture Collection*), *Campylobacter jejuni* ATCC 33560. El control de calidad de los discos empleados para los dos métodos se realizara con *E. coli* ATCC 25922 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. El control de calidad ha sido realizado por el Tecnólogo medico de dicha área de microbiología.

### 3.6. Plan de Análisis de Datos

Todos los datos son obtenidos a través de una base de datos establecido por un formato (**ANEXO 8**). Se evalúa la concordancia de los medios PAS-AV y FM por índice Kappa. Para la proporción para aislamiento de *Campylobacter* y contaminación por flora fecal se evalúa por el Test de McNemar. El tiempo de incubación para aislamiento de *Campylobacter* se utiliza la mediana. Toda prueba estadística se realizo por el paquete estadístico STATA 12.

## CAPITULO IV RESULTADOS

### 4.1 Resultados:

#### 4.1.1. Comparación de rendimiento en los cultivos PAS-AV y FM:

Se recolectaron 132 muestras fecales diarreicas de menores de 5 años (mediana de edad =2). Ver **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Rendimiento en cultivos PSA-AV y FM.

| Característica                                | PAS-AV<br>(n=132) | FM<br>(n=132) |
|---|-------------------|---------------|
| <b>Cualitativo*</b>                           |                   |               |
| Aislamiento de <i>Campylobacter</i> , n°.,(%) | 44 (33.3%)        | 40 (30.3%)    |
| Contaminado por Flora fecal, n°.,(%)          | 7 (5.3%)          | 10 (7.6%)     |
| Mediana de tiempo de positividad (horas)      | 48                | 48            |

\*Placas de cultivos con unidades formadoras de colonia (UFC)

#### 4.1.2. Concordancia en los cultivos PAS-AV y FM

Los resultados de los cultivos obtenidos en forma pareada para PAS-AV Y FM, tuvo una concordancia de 97.4% ( $k=0.94$ ,  $p<0.001$ ).**Tabla 3**.

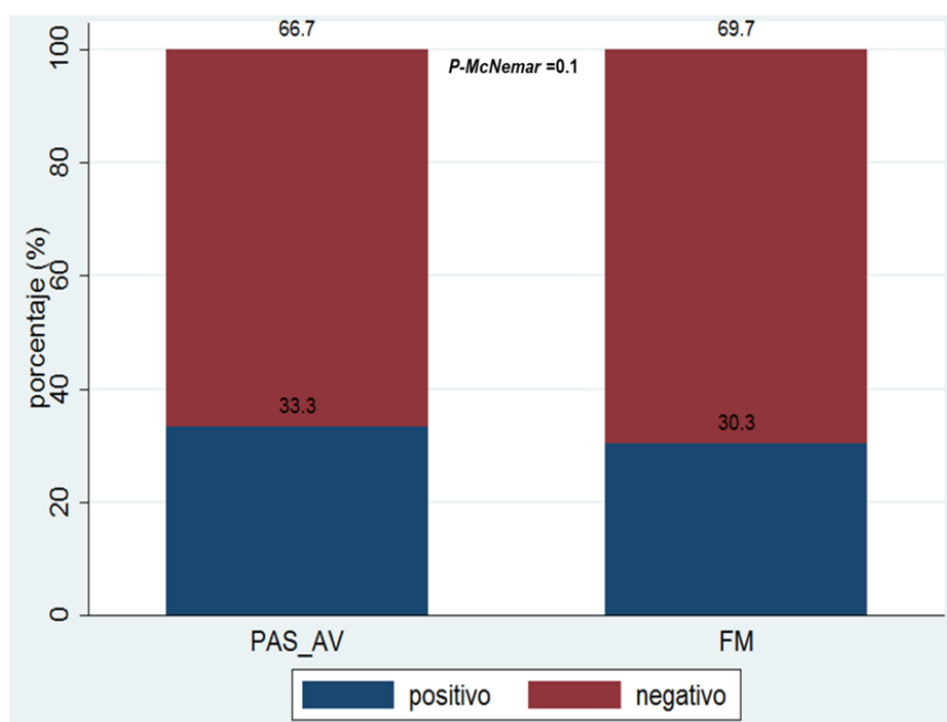
**Tabla 3.** Concordancia en cultivos PAS-AV y FM.

| Concordancia | Concordancia esperada | Kappa  | Std. Err. | Z    | Prob>Z |
|--------------|-----------------------|--------|-----------|------|--------|
| 97.44%       | 56.41%                | 0.9412 | 0.1599    | 5.89 | 0.0001 |

#### 4.1.3. Proporción de aislamiento para *Campylobacter*

El 33.3% del total de la muestras se aislaron *Campylobacter* por el cultivo PAS-AV, mientras que FM es 30.3% ( $P\text{-McNemar}=0.1$ ) (**Grafica 1**), siendo el 3% cultivo positivo para *Campylobacter* por PAS-AV pero negativo en FM (**Tabla 4**).

**Grafico 1.** Aislamiento de *Campylobacter*



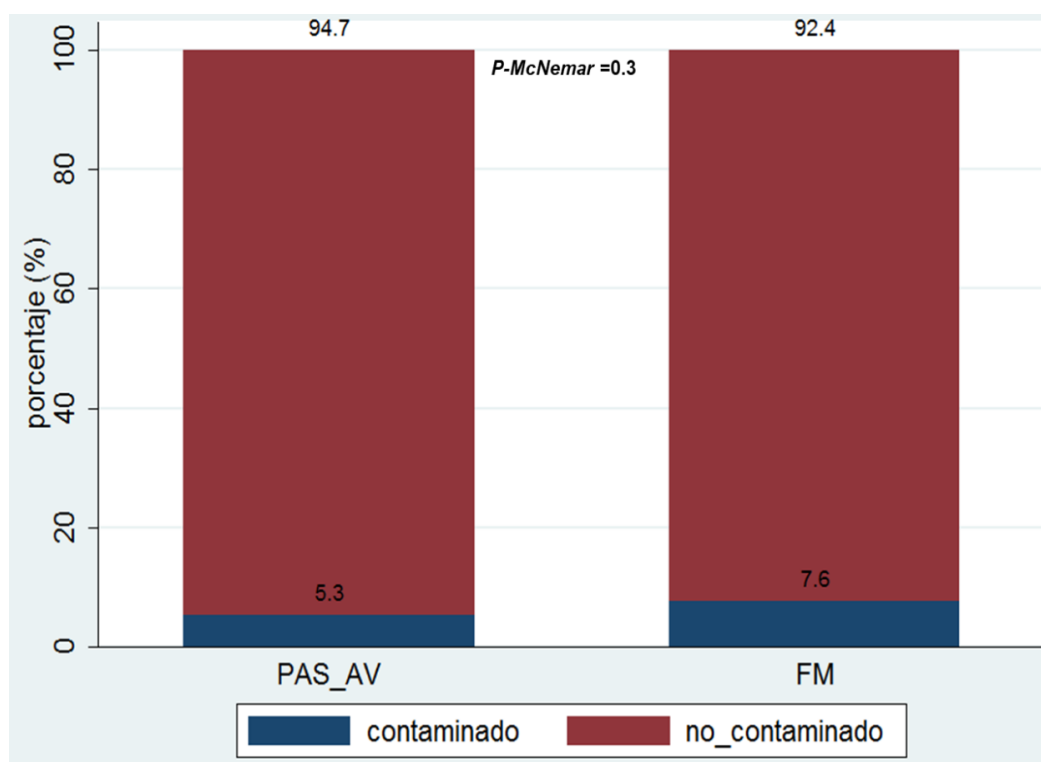
**Tabla 4.** Comparación de resultado para aislamiento de *Campylobacter* en cultivos PAS-AV y FM.

| PAS-AV   | FM         |            | Total      |
|----------|------------|------------|------------|
|          | Positivo   | Negativo   |            |
| Positivo | 40 (30.3%) | 4 (3%)     | 44 (33.3%) |
| Negativo | 0 (0%)     | 88 (66.7%) | 88 (66.7%) |
| Total    | 40 (30.3%) | 92 (69.7%) | 132 (100%) |

#### 4.1.4. Proporción de la contaminación por Flora fecal

El 5.3% del total de la muestra se contaminaron con flora fecal por el medio PAS-AV, mientras que FM es 7.6% ( $P\text{-McNemar}=0.3$ ), (**Grafica 2**), siendo el 92.4% coinciden en los resultados no contaminadas (**Tabla 5**).

**Grafico 2.** Contaminación por flora fecal



**Tabla 5.** Comparación de resultado para cultivos contaminados por flora fecal en PAS-AV y FM.

| PAS-AV         | FM          |                | Total       |
|----------------|-------------|----------------|-------------|
|                | Contaminado | No contaminado |             |
| Contaminado    | 7 (5.3%)    | 0 (0%)         | 7 (5.3%)    |
| No contaminado | 3 (2.3%)    | 122 (92.4%)    | 125 (94.7%) |
| Total          | 10 (7.6%)   | 122 (92.4%)    | 132 (100%)  |

#### 4.1.5. Tiempo de incubación para aislamiento de *Campylobacter* por los cultivos PAS-AV y FM.

El tiempo de incubación por los medios de cultivos, PAS-AV y FM tiene la misma mediana de 48 horas. Ver **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Tiempo de incubación en cultivos PSA-AV y FM.

| Característica   | PAS-AV (n=44) | FM (n=40)  |
|--|---------------|------------|
| Mediana del tiempo (horas) de incubación para aislamiento de <i>Campylobacter</i> (IQR*) | 48 (24-72)    | 48 (24-72) |

\*Rango Intercuartil

## 4.2. Discusión

En este estudio de 132 muestras fecales diarreicas en niños menores de 5 años, tiene el mismo rendimiento para aislamiento de *Campylobacter* en cultivos PAS-AV y FM. Además se determinó el índice kappa ( $k= 0.94$ ), según la tabla de valoración de kappa es muy buena concordancia. **Steele et al. (1984)**. Realizaron un estudio al comparar el uso de filtro de membrana de triacetato de celulosa aplicados en medio no selectivo (Agar sangre) y un medio selectivo con antimicrobiano (vancomicina 10gr/L, trimetoprim 5 mg/L y colistin 2,9 mg/L) para aislamiento de *Campylobacter* en pacientes con diarrea. Para ambos métodos los medios de cultivos, se incubaron en una atmósfera de microaerofilia (5% de oxígeno, 10% de dióxido de carbono y 85% de nitrógeno) a 42°C hasta 5 días. Las muestras han sido examinadas utilizando por los dos métodos para aislamiento de *Campylobacter* cuyo resultados en tasa general del 56 (5,6%) de las cuales 45 (80%) fueron

aislados en medio selectivo y 50 (89%) fueron aislados por el método de filtro de membrana. En nuestro estudio se aislaron 44 (33.3%) y 40 (30.3%) por PAS-AV y FM respectivamente ( $P=0.1$ ). Por lo tanto podemos decir el cultivo FM a 42 °C y PAS-AV, a 37 °C y en misma condiciones microaerofilia es superior a un medio selectivo con antimicrobiano.

En otro estudio **Thomas et al. (2005)** Determina la inhibición de la contaminación por flora fecal en medio que contiene agar base charco, aztreonam, amfoterecina y vancomicina (AAV) a 37°C y también en medio agar sangre Columbia (CDA modificado) a 43°C , ambos son medios selectivos. Se obtuvieron 150 muestras fecales hospitalarias se cultivaron por los medios selectivos. La tasa de contaminación para AAV es 8 (5%), 28 (19%) y 21 (14%) para 24, 48 y 72 horas respectivamente. La tasa de contaminación para CDA modificado es 21 (14%), 10 (7%) y 10 (7%) para 24, 48 y 72 horas respectivamente. En nuestro estudio de 132 muestras, se encontró una tasa de contaminación de 7 (5.3%) y 10 (7.6%) para PAS-AV y FM respectivamente ( $P=0.3$ ), hasta las 72 horas. Por lo tanto, podemos deducir que la tasa de contaminación por PAS-AV, es muy baja.

El tiempo de incubación para el aislamiento de *Campylobacter* por PAS-AV y FM para ambos métodos tiene la misma mediana de 48 horas. El estudio realizado por **Moya-Salazar et al. (2016)**. Evaluaron el rendimiento del medio agar sangre con filtro de membrana (ASF) en comparación con medio selectivo agar Karnali (AK) para el diagnóstico de *Campylobacter spp* en coprocultivo. Se recolectaron 287 muestra positiva de neonatos. Las

muestras fueron sembradas en ASF y en AK e incubadas hasta 72 horas en microaerofilia. La lectura de los cultivos se realizó a 12, 48 y 72 horas. El tiempo promedio de crecimiento para *Campylobacter* es 34.56 y 33.13 horas para AK y ASF respectivamente.

#### **4.3. Conclusiones:**

- Los cultivos de 132 muestra fecales en niños menores de 5 años del servicio de microbiología del CEMENA, al comparar PAS- AV y FM tienen el mismo rendimiento para aislamiento de *Campylobacter*.
- La concordancia por el índice kappa ( $k= 0.94$ ), al comparar PAS-AV y FM, es muy buena según la tabla de valoración.
- La proporción de aislamiento de *Campylobacter* al comparar PAS- AV y FM, no tiene diferencia significativa ( $p=0.1$ ).
- La proporción de la contaminación por flora fecal, al comparar PAS-AV y FM, no tiene diferencia significativa ( $p=0.3$ ).
- El tiempo de incubación es de 48 horas para el aislamiento de *Campylobacter* en PAS-AV y FM.

#### **4.4. Recomendaciones**

- Debido al rendimiento de PAS-AV, se debería incluir como rutina en los laboratorios de microbiología (coprocultivos), en la búsqueda de *Campylobacter* proveniente de muestras diarreicas en niños menores de 5 años.



## REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

1. Chanqueo C. L, García C. P, León C. E, Blu F. A. Evaluación de la tinción de Hucker para la búsqueda rutinaria de *Campylobacter* sp en el estudio de un síndrome diarreico agudo. *Rev Chil Infectol*. 2005 Sep;22(3):242–6.
2. Bolton FJ, Hutchinson DN, Coates D. Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *J Clin Microbiol*. 1984 Feb 1;19(2):169–71.
3. Hutchinson DN, Bolton FJ. Improved blood free selective medium for the isolation of *campylobacter jejuni* from faecal specimens. *J Clin Pathol*. 1984 Aug;37(8):956–7.
4. Butzler JP, Skirrow MB. *Campylobacter* enteritis. *Acta Paediatr Belg*. 1979 Jun;32(2):89–94.
5. Steele TW, McDermott SN. The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *Pathology (Phila)*. 1984 Jul;16(3):263–5.
6. Altekruse SF, Stern NJ, Fields PI, Swerdlow DL. *Campylobacter jejuni*--an emerging foodborne pathogen. *Emerg Infect Dis*. 1999;5(1):28–35.
7. Abubakar I, Irvine L, Aldus CF, Wyatt GM, Fordham R, Schelenz S, et al. A systematic review of the clinical, public health and cost-effectiveness of rapid diagnostic tests for the detection and identification of bacterial intestinal pathogens in faeces and food. *Health Technol Assess Winch Engl*. 2007 Sep;11(36):1–216.
8. Vandamme P, Goossens H. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter*: A Review. *Zentralblatt Für Bakteriologie*. 1992 Apr;276(4):447–72.
9. Matsuda M, Moore JE. Urease-Positive Thermophilic *Campylobacter* Species. *Appl Environ Microbiol*. 2004 Aug 1;70(8):4415–8.
10. Kapperud G, Skjerve E, Bean NH, Ostroff SM, Lassen J. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infections: results of a case-control study in southeastern Norway. *J Clin Microbiol*. 1992 Dec 1;30(12):3117–21.
11. Snelling WJ, Matsuda M, Moore JE, Dooley J. Under the microscope - *Campylobacter jejuni*. *Lett Appl Microbiol*. 2005;41(4):297–302.
12. Denny, J.; Boelaert, F. Zoonotic infections in Europe: trends and figures - a summary of the EFSA-ECDC annual report [Internet]. 2007 [cited 2017 Aug 20]. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3336>

13. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M-A, Roy SL, et al. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis.* 2011 Jan;17(1):7–15.
14. Fitzgerald C. *Campylobacter.* *Clin Lab Med.* 2015 Jun;35(2):289–98.
15. Giugno S, Oderiz S. Etiología bacteriana de la diarrea aguda en pacientes pediátricos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoam.* 2010 Mar;44(1):63–70.
16. Guderian RH, Ordonez R. G, Bossano R R. Diarrea aguda asociada a *Campylobacter* y otros agentes patogenos en Quito, Ecuador. PAHOWHO Institutional Repos [Internet]. 1987 [cited 2017 Aug 20]; Available from: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/17974>
17. Murga H, Huicho L, Guevara G. Acute diarrhoea and *Campylobacter* in Peruvian children: a clinical and epidemiologic approach. *J Trop Pediatr.* 1993 Dec;39(6):338–41.
18. Fernández H. *Campylobacter* and campylobacteriosis: a view from South America. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2011 Mar;28(1):121–7.
19. Raji null, Adekeye null, Kwaga null, Bale null. Bioserogroups of *Campylobacter* species isolated from sheep in Kaduna State, Nigeria. *Small Rumin Res J Int Goat Assoc.* 2000 Aug 1;37(3):215–21.
20. Turkson PK, Lindqvist KJ, Kapperud G. Isolation of *Campylobacter* spp. and *Yersinia enterocolitica* from domestic animals and human patients in Kenya. *APMIS.* 1988 Jan 1;96(1–6):141–6.
21. Chen X, Naren G-W, Wu C-M, Wang Y, Dai L, Xia L-N, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates in broilers from China. *Vet Microbiol.* 2010 Jul 29;144(1–2):133–9.
22. Baserisalehi M, Bahador N, Kapadnis BP. Isolation and characterization of *Campylobacter* spp. from domestic animals and poultry in south of Iran. *Pak J Biol Sci PJBS.* 2007 May 1;10(9):1519–24.
23. Torralbo Montoro A. *Campylobacter* spp. en grangas y matadero de broilers y en perros domésticos en Andalucía: estudio microbiológico, epidemiológico y de sensibilidad antimicrobiana. 2013 [cited 2017 Oct 7]; Available from: <http://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/11089>
24. Bailey GD, Vanselow BA, Hornitzky MA, Hum SI, Eamens GJ, Gill PA, et al. A study of the foodborne pathogens: *Campylobacter*, *Listeria* and *Yersinia*, in faeces from slaughter-age cattle and sheep in Australia. *Commun Dis Intell Q Rep.* 2003;27(2):249–57.

25. Bates C, Hiatt KL, Stern NJ. Relationship of *Campylobacter* isolated from poultry and from darkling beetles in New Zealand. *Avian Dis.* 2004 Mar;48(1):138–47.
26. Griekspoor P, Olsen B, Waldenström J. *Campylobacter jejuni* in Penguins, Antarctica. *Emerg Infect Dis.* 2009 May;15(5):847–9.
27. Masanta WO, Heimesaat MM, Bereswill S, Tareen AM, Lugert R, Groß U, et al. Modification of Intestinal Microbiota and Its Consequences for Innate Immune Response in the Pathogenesis of *Campylobacteriosis*. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:1–10.
28. Humphrey T, Mason M, Martin K. The isolation of *Campylobacter jejuni* from contaminated surfaces and its survival in diluents. *Int J Food Microbiol.* 1995;26(3):295–303.
29. Alemka A, Corcionivoschi N, Bourke B. Defense and Adaptation: The Complex Inter-Relationship between *Campylobacter jejuni* and Mucus. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2012 [cited 2018 Jan 3];2. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2012.00015/abstract>
30. 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.* 2010 Apr;300(4):205–11.
31. Oyarzabal OA, Backert S, editors. *Microbial food safety: an introduction*. New York: Springer; 2012. 262 p. (Food science text series).
32. Bolton DJ. *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiol.* 2015 Jun;48:99–108.
33. Bang DD, Borck B, Nielsen EM, Scheutz F, Pedersen K, Madsen M. Detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* isolates from Danish turkeys by PCR and cytolethal distending toxin production of the isolates. *J Food Prot.* 2004;67(10):2171–2177.
34. FERRERO RL, LEE A. Motility of *Campylobacter jejuni* in a Viscous Environment: Comparison with Conventional Rod-shaped Bacteria. *Microbiology.* 1988;134(1):53–9.
35. Nachamkin I, Yang XH, Stern NJ. Role of *Campylobacter jejuni* flagella as colonization factors for three-day-old chicks: analysis with flagellar mutants. *Appl Environ Microbiol.* 1993 May;59(5):1269–73.

36. Sommerlad SM, Hendrixson DR. Analysis of the Roles of FlgP and FlgQ in Flagellar Motility of *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol*. 2007 Jan 1;189(1):179–86.
37. Lertsethtakarn P, Ottemann KM, Hendrixson DR. Motility and Chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annu Rev Microbiol*. 2011;65(1):389–410.
38. Fernando U, Biswas D, Allan B, Willson P, Potter AA. Influence of *Campylobacter jejuni* *fliA*, *rpoN* and *flgK* genes on colonization of the chicken gut. *Int J Food Microbiol*. 2007 Sep 15;118(2):194–200.
39. Jin S, Joe A, Lynett J, Hani EK, Sherman P, Chan VL. JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Mol Microbiol*. 2001 Mar;39(5):1225–36.
40. Konkel ME, Garvis SG, Tipton SL, Anderson DE, Cieplak W. Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol*. 1997 Jun;24(5):953–63.
41. Ziprin RL, Young CR, Stanker LH, Hume ME, Konkel ME. The absence of cecal colonization of chicks by a mutant of *Campylobacter jejuni* not expressing bacterial fibronectin-binding protein. *Avian Dis*. 1999 Sep;43(3):586–9.
42. Pickett CL, Whitehouse CA. The cytolethal distending toxin family. *Trends Microbiol*. 1999 Jul;7(7):292–7.
43. Johnson WM, Lior H. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb Pathog*. 1988 Feb;4(2):115–26.
44. Silva J, Leite D, Fernandes M, Mena C, Gibbs PA, Teixeira P. *Campylobacter* spp. as a Foodborne Pathogen: A Review. *Front Microbiol* [Internet]. 2011 Sep 27;2. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3180643/>
45. Alfredson DA, Korolik V. Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 2007 Dec 1;277(2):123–32.
46. Gibreel A, Kos VN, Keelan M, Trieber CA, Levesque S, Michaud S, et al. Macrolide Resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: Molecular Mechanism and Stability of the Resistance Phenotype. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jul 1;49(7):2753–9.
47. Buchino JJ, Suchy FJ, Snyder JW. Bacterial diarrhea in infants and children. *Perspect Pediatr Pathol*. 1984;8(2):163–80.


48. Pavan M de FB, Mamizuka EM, Martinez MB. Diagnóstico rápido (presuntivo) da diarreia aguda causada por *Campylobacter* sp termofílico. Rev Farm Bioquim Univ São Paulo. 1987 Dec;23(2):152–8.
49. Fernández H, Notario R, Gambande T, Borda N, Rivera S. [Evaluation of a new medium using red-cell lysate for the isolation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*]. Rev Argent Microbiol. 1990 Jun;22(2):79–85.
50. Barros-Velázquez J, Jiménez A, Villa TG. Isolation and typing methods for the epidemiologic investigation of thermotolerant campylobacters. Int Microbiol. 2010 Mar 15;2(4):217–26.
51. Nadeem O. Kaakoush. *Campylobacter* - Molecular Medical Microbiology (Second Edition) - Chapter 67 [Internet]. [cited 2017 Aug 9]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123971692000676>
52. Gharst G, Oyarzabal OA, Hussain SK. Review of current methodologies to isolate and identify *Campylobacter* spp. from foods. J Microbiol Methods. 2013 Oct;95(1):84–92.
53. Skirrow MB. *Campylobacter* enteritis: a “new” disease. Br Med J. 1977 Jul 2;2(6078):9–11.
54. Blaser MJ, Berkowitz ID, LaForce FM, Cravens J, Reller LB, Wang WL. *Campylobacter* enteritis: clinical and epidemiologic features. Ann Intern Med. 1979 Aug;91(2):179–85.
55. Karmali MA, Simor AE, Roscoe M, Fleming PC, Smith SS, Lane J. Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. J Clin Microbiol. 1986 Mar 1;23(3):456–9.
56. Aspinall ST, Wareing DR, Hayward PG, Hutchinson DN. Selective medium for thermophilic campylobacters including *Campylobacter upsaliensis*. J Clin Pathol. 1993 Sep;46(9):829–31.
57. Ribeiro CD, Price TH. The use of Preston enrichment broth for the isolation of “thermophilic” campylobacters from water. J Hyg (Lond). 1984 Feb;92(1):45–51.
58. Austen RA, Trust TJ. Detection of plasmids in the related group of the genus *Campylobacter*. FEMS Microbiol Lett. 1980 Aug 1;8(4):201–4.
59. Lee C-Y, Tai C-L, Lin S-C, Chen Y-T. Occurrence of plasmids and tetracycline resistance among *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from whole market chickens and clinical samples. Int J Food Microbiol. 1994 Dec 1;24(1):161–70.

60. Carrillo CD, Kenwell R, Iugovaz I, Oyarzabal OA. Recovery of *Campylobacter* spp. from Food and Environmental Sources. In: *Campylobacter jejuni* [Internet]. Humana Press, New York, NY; 2017 [cited 2017 Oct 7]. p. 9–18. (Methods in Molecular Biology). Available from: [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-6536-6\\_2](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-6536-6_2)
61. Ray M, Schwartz DC. Pulsed-Field Gel Electrophoresis and the Molecular Epidemiology of Foodborne Pathogens. In: Oyarzabal OA, Kathariou S, editors. *DNA Methods in Food Safety* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2014. p. 27–46. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118278666.ch2/summary>
62. Ribot EM, Fitzgerald C, Kubota K, Swaminathan B, Barrett TJ. Rapid Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for Subtyping of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol*. 2001 May 1;39(5):1889–94.
63. Zhou P, Oyarzabal OA. Application of Pulsed Field Gel Electrophoresis to Type *Campylobacter jejuni*. In: *Pulse Field Gel Electrophoresis* [Internet]. Humana Press, New York, NY; 2015 [cited 2017 Oct 7]. p. 139–56. (Methods in Molecular Biology). Available from: [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-2599-5\\_13](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-2599-5_13)
64. Sifré E, Salha BA, Ducournau A, Floch P, Chardon H, Mégraud F, et al. EUCAST recommendations for antimicrobial susceptibility testing applied to the three main *Campylobacter* species isolated in humans. *J Microbiol Methods*. 2015 Dec;119:206–13.
65. EUCAST: Clinical breakpoints [Internet]. [cited 2017 Oct 7]. Available from: [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)
66. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria*. 2016.
67. Wieczorek K, Osek J. Antimicrobial Resistance Mechanisms among *Campylobacter*. *BioMed Res Int* [Internet]. 2013;2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3707206/>
68. Payot S, Bolla J-M, Corcoran D, Fanning S, Mégraud F, Zhang Q. Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Microbes Infect*. 2006 Jun;8(7):1967–71.
69. Luo N, Sahin O, Lin J, Michel LO, Zhang Q. In Vivo Selection of *Campylobacter* Isolates with High Levels of Fluoroquinolone Resistance Associated with *gyrA* Mutations and the Function of the CmeABC Efflux Pump. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Jan;47(1):390–4.

70. Connell SR, Trieber CA, Dinos GP, Einfeldt E, Taylor DE, Nierhaus KH. Mechanism of Tet(O)-mediated tetracycline resistance. *EMBO J*. 2003 Feb 17;22(4):945–53.
71. Taylor DE, Garner RS, Allan BJ. Characterization of tetracycline resistance plasmids from *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1983 Dec;24(6):930–5.
72. Taylor DE, Courvalin P. Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988 Aug;32(8):1107–12.
73. Batchelor RA, Pearson BM, Friis LM, Guerry P, Wells JM. Nucleotide sequences and comparison of two large conjugative plasmids from different *Campylobacter* species. *Microbiol Read Engl*. 2004 Oct;150(Pt 10):3507–17.
74. Poehlsgaard J, Douthwaite S. The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Nov;3(11):870–81.
75. Guerry P, Yao R, Alm RA, Burr DH, Trust TJ. [37] Systems of experimental genetics for *Campylobacter* species. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Academic Press; 1994. p. 474–81. (Bacterial Pathogenesis Part A: Identification and Regulation of Virulence Factors; vol. 235). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687994351635>
76. Kulkarni SP, Lever S, Logan JMJ, Lawson AJ, Stanley J, Shafi MS. Detection of campylobacter species: a comparison of culture and polymerase chain reaction based methods. *J Clin Pathol*. 2002 Oct;55(10):749–53.
77. Thomas GD. Pilot study for the development of a new campylobacter selective medium at 37°C using aztreonam. *J Clin Pathol*. 2005 Apr;58(4):413–6.
78. 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*. 2016 Jul;16(3):58–65.
79. Cary SG, Blair EB. New transport medium for shipment of clinical specimens. *J Bacteriol*. 1964 Jul;88(1):96–8.
80. Luechtefeld NW, Wang WL, Blaser MJ, Reller LB. Evaluation of transport and storage techniques for isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from turkey cecal specimens. *J Clin Microbiol*. 1981 Mar 1;13(3):438–43.

## ANEXOS

### ANEXO 1. Aprobación por el Comité de Ética y División de Investigación CEMENA "Cirujano Mayor Santiago Távara"

|   |             |                              |                                  |  |
|---|-------------|------------------------------|----------------------------------|--|
|  | <b>PERÚ</b> | <b>Ministerio de Defensa</b> | <b>Marina de Guerra del Perú</b> | <b>UAP</b> UNIVERSIDAD ALAS PERUANAS<br>FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD<br>ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA |
|---|-------------|------------------------------|----------------------------------|--|

"DECENIO DE LA IGUALDAD DE OPORTUNIDADES PARA MUJERES Y HOMBRES"  
"AÑO DEL DIÁLOGO Y LA RECONCILIACIÓN NACIONAL"

Bellavista, 26 de marzo del 2018

RECIBIDO 30 ABR. 2018 10:40 FIRMA

V.200- 4359

Señor  
Doctor  
Juan Gualberto TRELLES Yenque  
Director de la Escuela Académica Profesional de Tecnología Médica  
Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud  
De la Universidad Alas Peruanas  
Av. San Felipe N°1109  
Jesús María.-

Tengo el agrado de dirigirme a Ud., para saludarlo cordialmente y en relación a su Oficio N°0378-EPTM-FMHyCS-UAP de fecha 16 de marzo del 2018, hacer de su conocimiento que esta Dirección ha autorizado a la señorita Tania Rosmary ROSALES Taype, para que realice su proyecto de tesis titulado "COMPARACIÓN DE MEDIOS NO SELECTIVOS PARA AISLAMIENTO DE CAMPYLOBACTER USANDO DISCO DE AZTREONAM - VANCOMICINA Y FILTRO DE MEMBRANA", luego de ser evaluados y aprobados por el Comité de Ética y la División de Investigación de este nosocomio, el cual tiene como fecha de inicio a partir del 02 de mayo al 02 de agosto del 2018.

A su vez la Autora del referido trabajo deberá presentar al término de su ejecución UN (01) ejemplar de la tesis en físico y la base de datos en digital en Excel en la Oficina de Apoyo a la Docencia e Investigación.

Asimismo, la referida señorita se deberá presentar a la Oficina de Apoyo a la Docencia e Investigación para registrar sus datos correspondientes.

Hago propicia la ocasión para expresarle los sentimientos de mi especial consideración.

Atentamente,

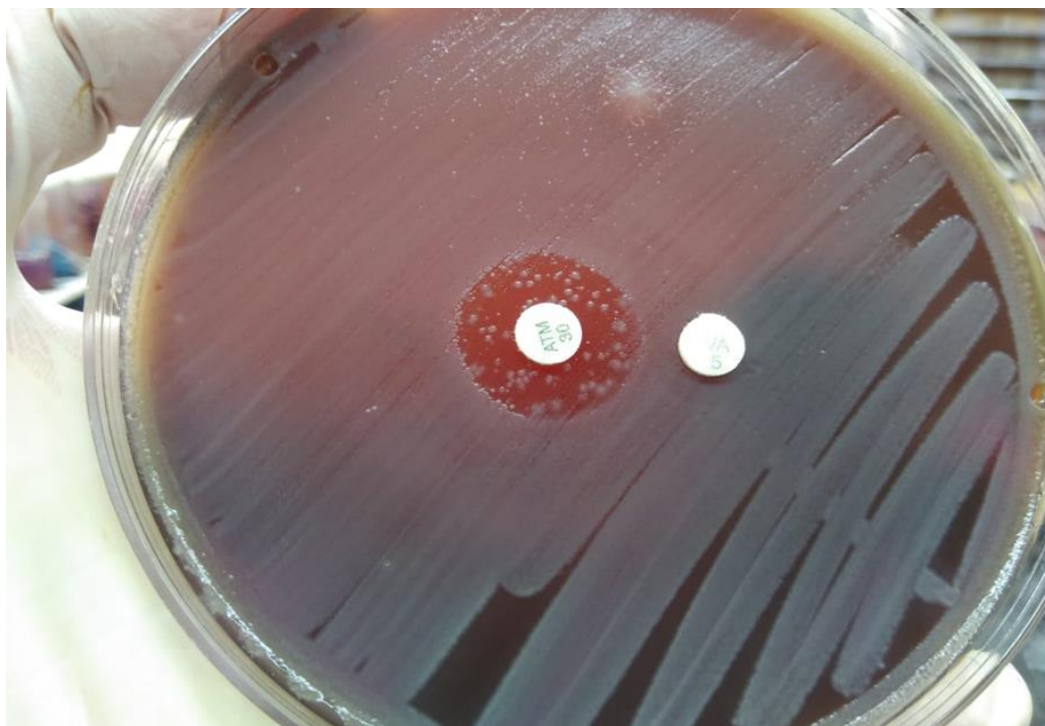
Contralmirante SN. (MC)  
Wilfredo ORDAYA Luey

Director del Centro Médico Naval  
"Cirujano Mayor Santiago Távara"

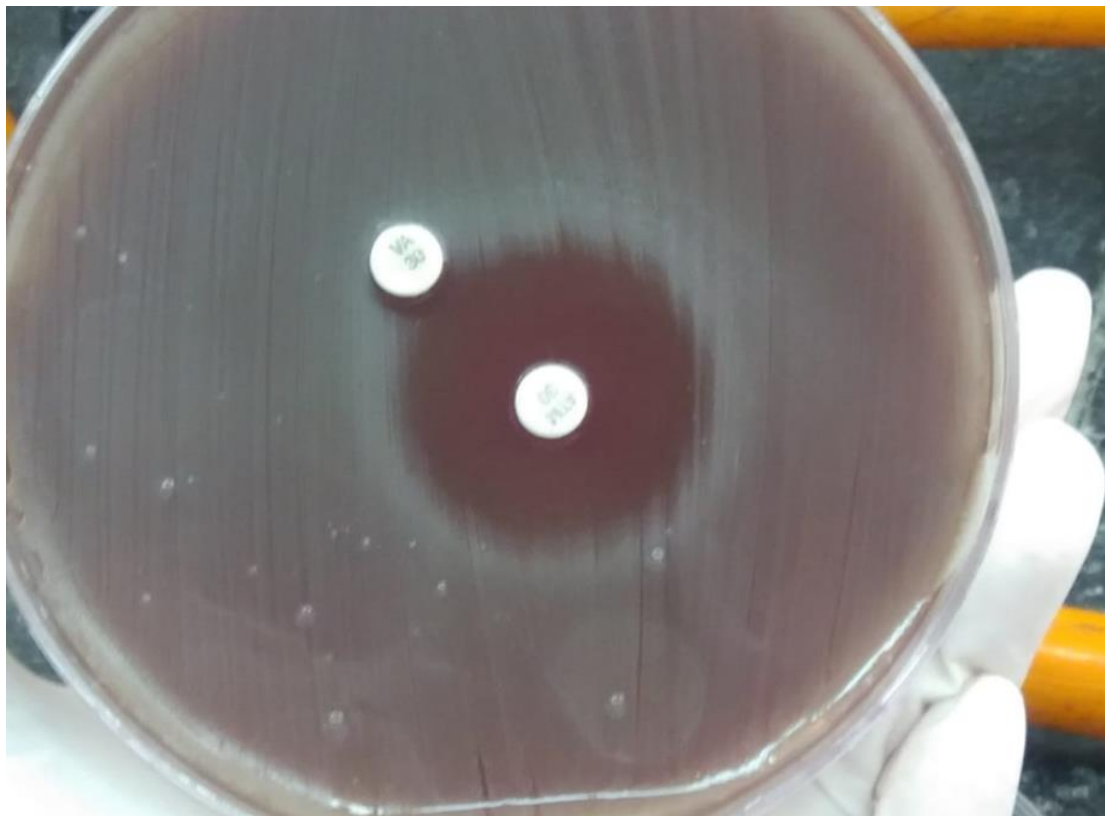
*Capitán de Fragata S. (C) [Firma]*  
Subdele de la Cátedra de Tecnología Médica  
del Centro Médico Naval "Cirujano Mayor Santiago Távara"  
V.200- 4359



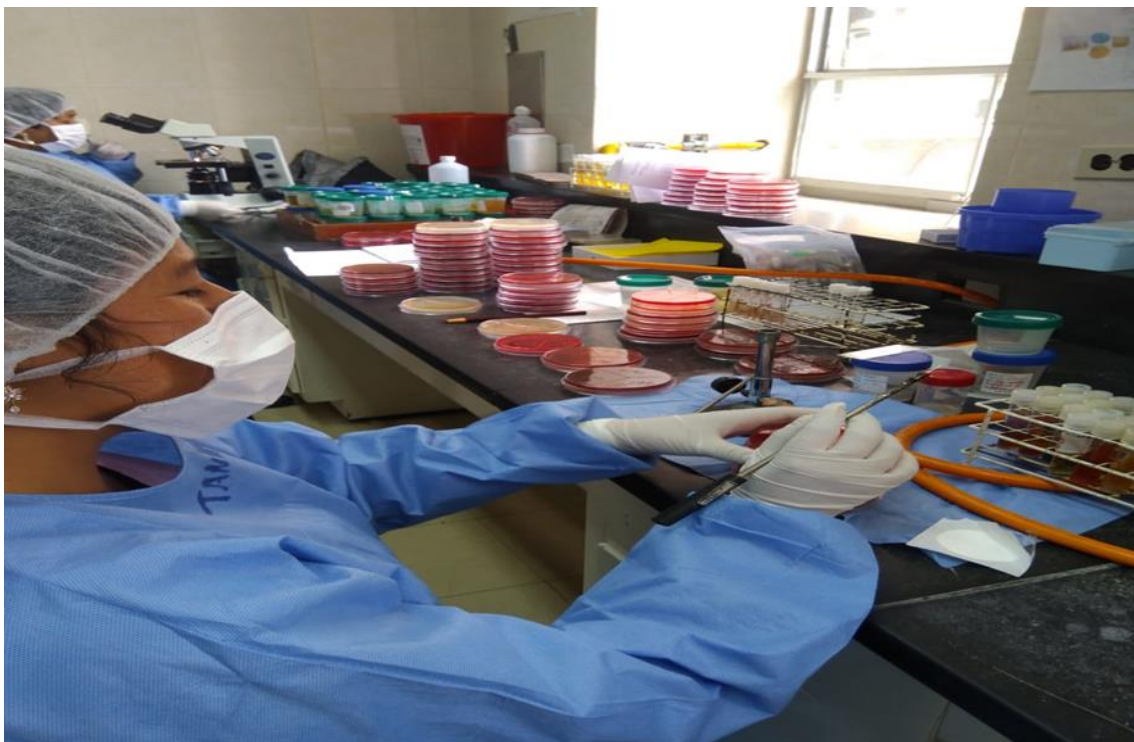
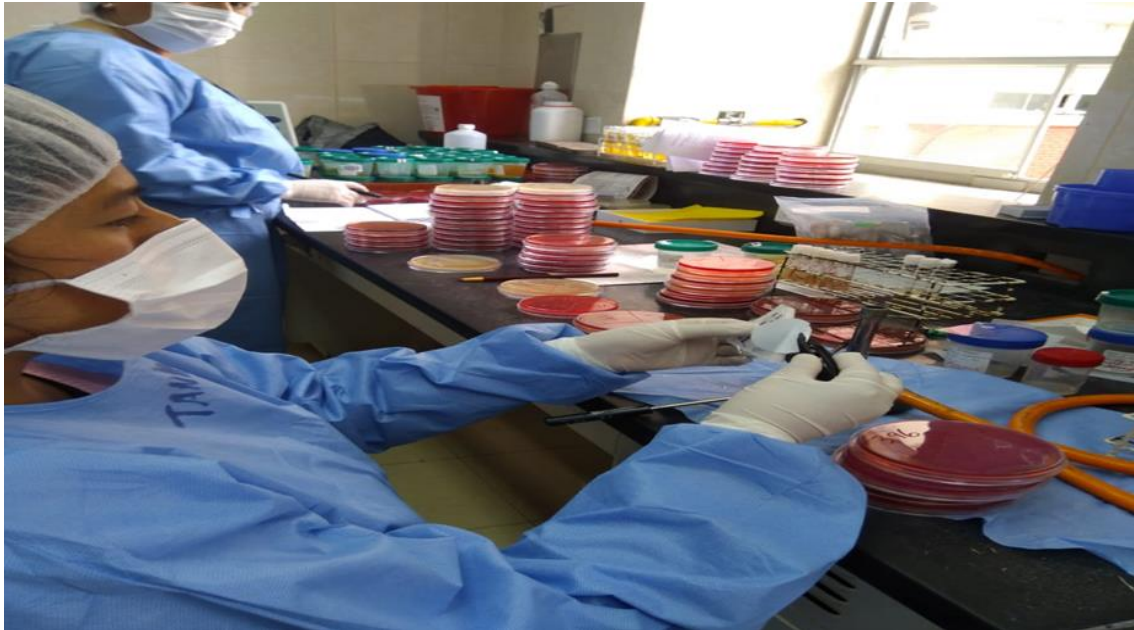
**ANEXO 2. Prueba positiva en cultivo PAS-AV**



**ANEXO 3.** Prueba negativa en cultivo PAS-AV



**ANEXO 4.** Colocación de filtro de membrana en medio no selectivo (agar sangre)



## ANEXO 5. Preparación de los reactivos para la tinción Gram-Hucker:

### a) Cristal violeta y oxalato de amonio. (Reactivo de Hucker)

#### Solución A:

Cristal violeta (pureza del colorante de por lo menos, el 90%)..... 2 g  
Etanol (95%)..... 20 mL

#### Solución B:

Oxalato de amonio..... 0.8 g  
Agua destilada..... 80 mL

#### Preparación:

- Mezclar cada uno de los solutos en su disolvente respectivo.
- Dejar la solución de oxalato de amonio en reposo durante una noche o calentar ligeramente hasta que se solubilice.
- Mezclar las dos soluciones y filtrar.

### b) Solución de yodo yodurado. (Lugol) Yodo (químicamente puro)..... 1 g

Yoduro de potasio..... 2 g  
Agua destilada..... 300 mL

#### Preparación:

- Combinar el yodo y el yoduro de potasio con la ayuda de un mortero.
- Lavar el contenido de éste con pequeñas alícuotas de agua destilada.
- Agregar agua suficiente para obtener un total de 300 mL.
- Agitar fuertemente.
- Almacenar la solución en una botella oscura y con tapón de vidrio.

### c) Alcohol acetona.

Alcohol etílico (95%)..... 500 mL  
Acetona..... 300 mL

Preparación:

- Mezclar los ingredientes respectivos de cada combinación para su uso.

d) Safranina.

Safranina (pureza del colorante, 90%)..... 0.25 g

Alcohol etílico (95%)..... 10 mL

Agua destilada..... 1000 mL

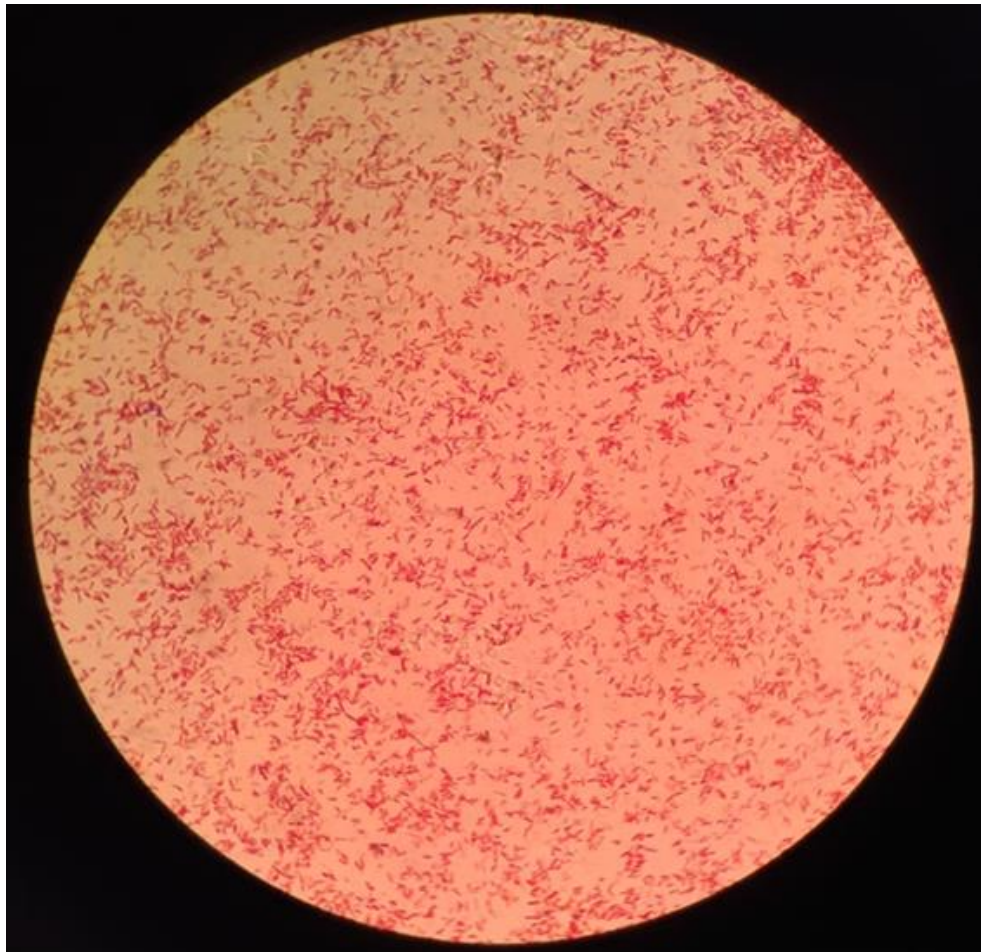
Preparación:

- Disolver el colorante en el alcohol.

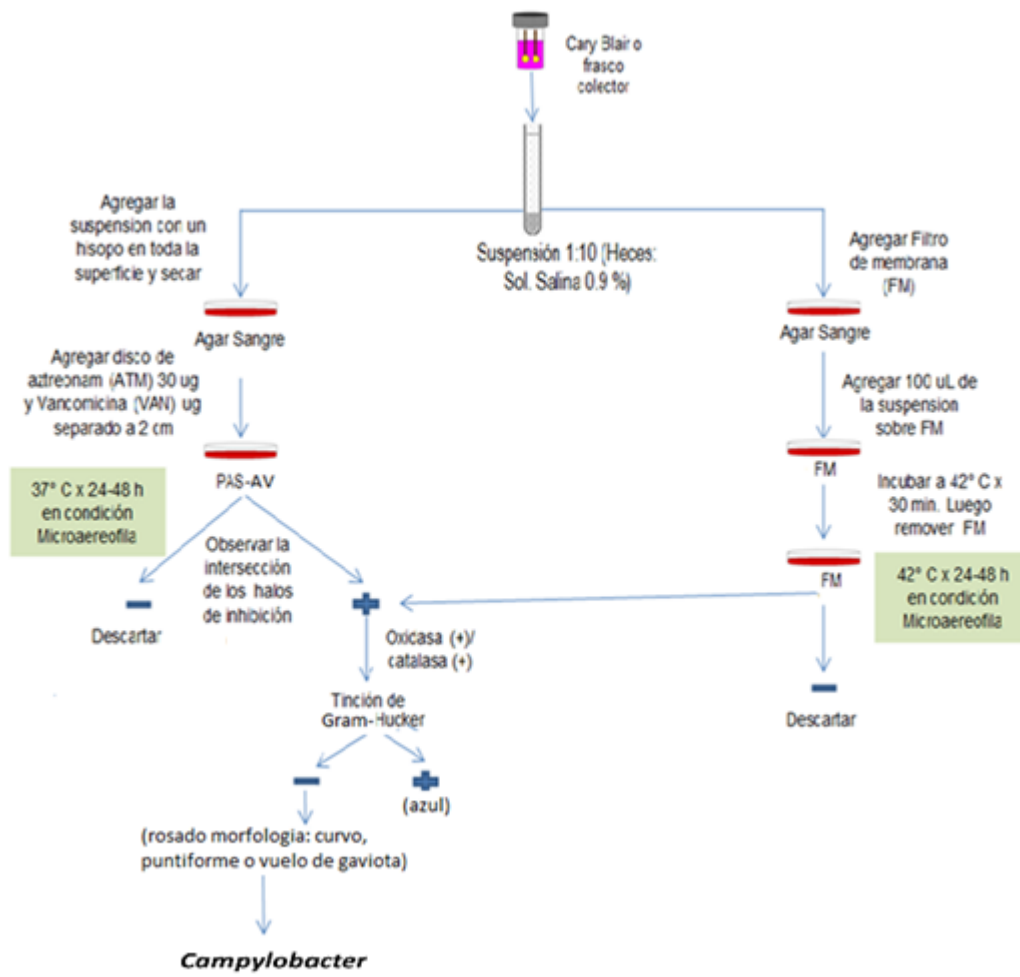
- Agregar el agua destilada.

- Filtrar y almacenar en frasco con tapón de vidrio. Cristal Violeta.

**ANEXO 6.** Observación microscópica (1000x) de bacterias Gram negativa con morfología variada (curvos, punteados y vuelo de gaviota)



**ANEXO 7.** Flujograma de aislamiento de *Campylobacter* por PAS-AV y FM



**ANEXO 8:** Hoja de registro y base de datos del proyecto de investigación



UNIVERSIDAD ALAS PERUANAS  
 FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD  
 ESCUELA PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA  
**REGISTRO Y BASE DE DATOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN :**

**"COMPARACIÓN DE MEDIOS NO SELECTIVOS PARA AISLAMIENTO DE *CAMPYLOBACTER* USANDO DISCO DE AZTREONAM-VANCOMICINA Y FILTRO DE MEMBRANA"**

| N° | COD (MX) | SEXO | EDAD | SOPORTE MX | CONSMX | FECHA RECOLECCIÓN | FECHA DE RECEPCIÓN DE MUESTRA | R. INFLA | MEDIO DE CULTIVO | FECHA CULTIVO | RE. DE CULTIVO | IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA |     |    |      | FLORA FECAL | OBSERVACIÓN |
|----|----------|------|------|------------|--------|-------------------|-------------------------------|----------|------------------|---------------|----------------|---------------------------|-----|----|------|-------------|-------------|
|    |          |      |      |            |        |                   |                               |          |                  |               |                | GRAM                      | CAT | OX | H. H |             |             |
| 1  |          |      |      |            |        |                   |                               |          |                  |               |                |                           |     |    |      |             |             |
| 2  |          |      |      |            |        |                   |                               |          |                  |               |                |                           |     |    |      |             |             |
| 3  |          |      |      |            |        |                   |                               |          |                  |               |                |                           |     |    |      |             |             |
| 4  |          |      |      |            |        |                   |                               |          |                  |               |                |                           |     |    |      |             |             |
| 5  |          |      |      |            |        |                   |                               |          |                  |               |                |                           |     |    |      |             |             |
| 6  |          |      |      |            |        |                   |                               |          |                  |               |                |                           |     |    |      |             |             |
| 7  |          |      |      |            |        |                   |                               |          |                  |               |                |                           |     |    |      |             |             |
| 8  |          |      |      |            |        |                   |                               |          |                  |               |                |                           |     |    |      |             |             |
| 9  |          |      |      |            |        |                   |                               |          |                  |               |                |                           |     |    |      |             |             |
| 10 |          |      |      |            |        |                   |                               |          |                  |               |                |                           |     |    |      |             |             |
| 11 |          |      |      |            |        |                   |                               |          |                  |               |                |                           |     |    |      |             |             |
| 12 |          |      |      |            |        |                   |                               |          |                  |               |                |                           |     |    |      |             |             |
| 13 |          |      |      |            |        |                   |                               |          |                  |               |                |                           |     |    |      |             |             |



**MATRIZ DE CONSISTENCIA**

**TITULO: “COMPARACIÓN DE MEDIOS NO SELECTIVOS PARA AISLAMIENTO DE CAMPYLOBACTER USANDO DISCO DE AZTREONAM-VANCOMICINA Y FILTRO DE MEMBRANA**

| PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN  | OBJETIVO DE INVESTIGACIÓN   | VARIABLES  | DIMENSIONES  | INSTRUMENTO   | METODOLOGÍA   |
|--|---|--|--|---|---|
| <p><b><u>Problema general:</u></b></p> <p>¿Qué rendimiento tiene al comparar métodos en medios de cultivos no selectivos para aislamiento de <i>Campylobacter</i> disco de aztreonam-vancomicina (PAS-AV) y filtro de membrana (FM)?</p> | <p><b><u>Objetivo general:</u></b></p> <p>Comparar métodos en medios no selectivos para aislamiento de <i>Campylobacter</i> usando disco de aztreonam-vancomicina (PAS-AV) y Filtro de Membrana (FM).</p>             | <p><b><u>Variable Principal:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Medios de Cultivos PAS-AV y FM.</li> </ul>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>Positivo</li> <li>Negativo</li> <li>Contaminado</li> </ul>  | Ficha de recolección de datos.  | <p><b><u>DISEÑO</u></b></p> <p>Estudio descriptivo, prospectivo y correlacionar de corte transversal.</p>   |
| <p><b><u>Problemas específicos:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>¿Cuál es la concordancia de los métodos en medios PAS-AV y FM para el aislamiento de <i>Campylobacter</i>?</li> </ul>                                 | <p><b><u>Objetivos específicos:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Determinar la concordancia de los métodos en medios no selectivos PAS-AV y FM para aislamiento de <i>Campylobacter</i>.</li> </ul> | <p><b><u>Variable Secundario:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Concordancia de medios de cultivos</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Pobre (menor de 0.2)</li> <li>Débil (0.21-0.40)</li> <li>Moderado (0.41-0.60)</li> <li>Buena (0.61-0.80)</li> <li>Muy Buena (0.81-1.0)</li> </ul> | Índice de Kappa   | <p><b><u>POBLACIÓN:</u></b></p> <p>Las que son atendidos por enfermedades diarreicas agudas (EDA), en el Hospital Centro Médico Naval (CEMENA), durante el periodo de tiempo Enero –Junio 2018.</p> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>¿Cuál es la proporción de aislamiento para <i>Campylobacter</i> en los métodos en medios no selectivos PAS-AV y FM?</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Determinar la proporción de aislamiento para <i>Campylobacter</i> en los métodos en medios no selectivos PAS-AV y FM.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Aislamiento de <i>Campylobacter</i></li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Numérico</li> </ul>   | Numero de cultivos con <i>Campylobacter</i> entre el total de cultivos. |   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>¿Cuál es la proporción de contaminación para la flora fecal en los métodos en medio no selectivo PAS-AV y FM?</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Determinar la proporción de contaminación para la flora fecal en los métodos en medios no selectivos PAS-AV y FM.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Contaminación por Flora fecal</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Numérico</li> </ul>   | Numero de cultivos con Flora fecal entre el total de cultivos.          | <p><b><u>MUESTRA:</u></b></p> <p>Se determinó el tamaño de muestra mediante fórmula indicada en el ítem de Muestra, resultando un total de 132 muestras.</p>  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>¿Cuál es el tiempo de incubación para aislamiento de <i>Campylobacter</i> en los métodos en medios no selectivos PAS-AV y FM?</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Determinar el tiempo de incubación para aislamiento de <i>Campylobacter</i> usando los métodos en medios no selectivos PAS-AV y FM.</li> </ul>                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>Tiempo de Incubación</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>24 horas</li> <li>48 horas</li> <li>72 horas</li> </ul>   | Ficha de recolección de datos.  |   |

