UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS, RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE

CARRERA MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TEMA:

ANÁLISIS DE SUSCEPTIBILIDAD A FLUOROQUINOLONAS DE *ARCOBACTER* AISLADOS A PARTIR DE QUESOS FRESCOS, OBTENIDOS DE LOS MERCADOS MUNICIPALES DE GUARANDA.

Proyecto investigativo previo a la obtención del Título de Médico Veterinario y Zootecnista, concedido por la Universidad Estatal de Bolívar a través de la Facultada de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

AUTOR:

LUIS ISRAEL GOYES GUERRA

DIRECTOR:

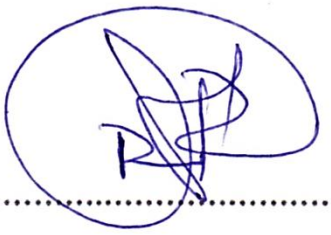
Dr. EDISON RIVELIÑO RAMÓN CURAY M.Sc.

GUARANDA – ECUADOR

2020

ANÁLISIS DE SUSCEPTIBILIDAD A FLUOROQUINOLONAS DE ARCOBACTER AISLADOS A PARTIR DE QUESOS FRESCOS, OBTENIDOS DE LOS MERCADOS MUNICIPALES DE GUARANDA.

ADMITIDO POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL.



.....

Dr. RAMON RIVELIÑO MsC.

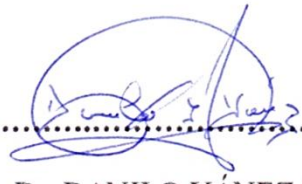
DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.



.....

Ing. FAVIÁN BAYAS MOREJÓN. Ph.D.

ÁREA DE BIOMETRIA



.....

Dr. DANILO YÁNEZ SILVA. Ms.c.

ÁREA DE REDACCIÓN TÉCNICA

CERTIFICADO DEL AUTOR

Yo, LUIS ISRAEL GOYES GUERRA, ensayista expreso que el presente trabajo investigativo es de mi autoría, este documento no ha sido previamente publicado para ningún grado o calificación profesional; que las citas bibliográficas que se muestran han sido estudiadas con sus respectivos autores.

La Universidad Estatal de Bolívar puede usar de los derechos de publicación proporcionados a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y normativa institucional.

.....

LUIS ISRAEL GOYES GUERRA CI: 0604321646

.....

Dr. EDISON RAMON RIVELIÑO CURAY MsC.
DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.

.....

Ing. ISIDRO FAVIÁN BAYAS MOREJÓN. Ph.D.
BIOMETRÍSTA.

.....

Dr. DANILO FABIAN YÁNEZ SILVA. Ms.c.
REDACCIÓN TÉCNICA

LUIS ISRAEL GOYES GUERRA declaro bajo juramento: **1.-** Que previo a la obtención del Título de Médico Veterinario y Zootecnista, otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar, manifiesto que los criterios e ideas emitidas en el presente proyecto investigativo Titulado: **"ANALISIS DE SUCEPTIBILIDAD A FLUOROQUINALONAS DE ACROBACTER AISLADOS A PATIR DE QUESOS FRESCOS OBTENIDOS DE LOS MERCADOS MUNICIPALES DE GUARANDA",** es de mi exclusiva responsabilidad en calidad de autor.- Es todo cuanto el declarante manifiesta en honor a la verdad.-La cuantía por su naturaleza se la fija como indeterminada.- Leída que fue al compareciente por mí la Notaría, se ratifica y firma conmigo en unidad de acto.- De todo lo que doy fe.-

LUIS ISRAEL GOYES GUERRA
Nº. U. I. 0600571541

CONSEJO DE LA JUDICATURA
NOTARÍA OCTAVA
CANTÓN RIOBAMBA

Dra. María Elena Zúñiga Silva
NOTARIA OCTAVA DEL CANTÓN RIOBAMBA

DEDICATORIA

A mi madre.

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor incondicional.

A mi esposa y mi hijo

Este triunfo se los dedico a ustedes, gracias por ser el apoyo en este duro camino, fueron mi fuerza, mi alegría mis ganas de salir adelante y mi horizonte, se los dedico a ustedes ya que a donde sea que mire siempre están presentes en mi vida.

Mi abuelo

Por inculcarme el amor a los animales, fuiste tú mi ejemplo como profesional, sé que desde el cielo te sentirás feliz por verme hoy como profesional gracias por apoyarme siempre.

AGRADECIMIENTO

Gracias a mi madre por ser la principal promotora de mis sueños, gracias a ella por cada día confiar y creer en mí y en mis expectativas, gracias madre mía por nunca perder la esperanza en mí.

Gracias a mi amada esposa por entenderme en todo, gracias a ella porque en todo momento fue un apoyo incondicional en mi vida, sin ti no podría haber llegado hasta donde hoy en día he llegado.

Gracias hijo mío por ser la fuente de mi esfuerzo y todas las energías requeridas en este, gracias por ser el motor de mi vida, te amo hijo.

Dr. Favian Bayas quiero agradecerle cada detalle y momento dedicado para aclarar cualquier tipo de duda que me surgiera, agradecerle por la caridad y exactitud con la que enseño y por haberme permitido el desarrollo de esta tesis.

RESUMEN

En esta investigación se analizó la susceptibilidad a Fluoroquinolonas de *Arcobacter spp* aislados a partir de quesos frescos, obtenidos de los mercados municipales de Guaranda, así que nos planteamos; aislar microorganismos del género *Arcobacter* a partir de quesos de consumo procedentes de los principales mercados de la Ciudad de Guaranda, identificar colonias del género *Arcobacter* mediante técnicas bioquímicas y microscópicas, extraer ADN de los aislados confirmados morfológica y bioquímicamente a pertenecer al Género de interés, amplificar el ADN obtenido mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), por último análisis de la actividad antimicrobiotica de Levofloxacina y Ciprofloxacina sobre las cepas estudiadas. En la presente investigación , el tipo de análisis utilizado fue un modelo estadístico descriptivo en donde se estudiaran pruebas de análisis de medias, porcentajes y frecuencias, todo esto en correspondencia a los factores que se estudiaron, que fueron 100 muestras de quesos provenientes de los principales mercados de la cuidad de Guaranda, tras un periodo de crecimiento selectivo, se aislaron cepas de *Arcobacter* a partir de 66 de las 47 muestras de quesos analizadas viniendo a obtenerse 25 cepas de las muestras provenientes del mercado Bellavista; mientras que 41 cepas se obtuvieron del Mercado 10 de Noviembre, que fueron extraídos su ADN, se analizó la susceptibilidad a Fluoroquinolonas y de género *Arcobacter* aislados a partir de quesos frescos obtenidos en los mercados municipales de Guaranda, en donde 2/26 casos, resultaron ser resistentes a la bacteria, conformando el 7,69%; 19/26 casos reflejaron una resistencia intermedia para *Arcobacter*, siendo estos el 73,08%; finalmente 5/26 casos resultaron ser susceptibles formando el 19,23% restante.

Palabras claves: *Arcobacter spp*, Quinolonas, PCR, Queso, Ciprofloxacina Levofloxacina.

SUMMARY

In this research the susceptibility to Fluoroquinolones of Arcobacter spp isolated from fresh cheeses, obtained from the municipal markets of Guaranda, was analyzed, so we considered; isolate microorganisms of the genus Arcobacter from consumer cheeses from the main markets of the City of Guaranda, identify colonies of the genus Arcobacter through biochemical and microscopic techniques, extract DNA from isolates morphologically and biochemically confirmed to belong to the genus of interest, amplify DNA obtained by PCR (polymerase chain reaction), finally analysis of the antimicrobiotic activity of Levofloxacin and Ciprofloxacin on the strains studied. In the present investigation, the type of analysis used was a descriptive statistical model where tests of analysis of means, percentages and frequencies were studied, all this in correspondence to the factors that were studied, which were 100 samples of cheeses from the main markets in the city of Guaranda, after a period of selective growth, Arcobacter strains were isolated from 66 of the 47 cheese samples analyzed, resulting in 25 strains obtained from the samples from the Bellavista market; While 41 strains were obtained from the November 10 Market, their DNA was extracted, the susceptibility to Fluoroquinolones and the genus Arcobacter isolated from fresh cheeses obtained in the municipal markets of Guaranda was analyzed, where 2/26 cases were be resistant to the bacteria, making up 7.69%; 19/26 cases showed intermediate resistance to Arcobacter, being 73.08%; finally 5/26 cases turned out to be susceptible, forming the remaining 19.23%.

Keywords: Arcobacter spp, Quinolones, PCR, Cheeses, Ciprofloxacin Levofloxacin.

ÍNDICE DE CONTENIDOS **Pag.**

I.INTRODUCCIÓN 1

II. PROBLEMA 2

III.MARCO TEÓRICO 3

3.1Generalidades 3

3.2Clases de Microorganismos 3

3.3Género del Arcobacter 4

3.3.1 Antecedentes históricos.....4

3.3.2 Taxonomía de Arcobacter 6

3.3.3 Trasmisión y enfermedades 6

3.3.4 Contaminación en alimentos.....7

3.4 Queso fresco 8

3.4.1 Características del Queso fresco 8

3.4.2 Proceso de elaboración 9

3.4.3 Composición química y valor nutritivo.....10

3.4.4 Conservación y almacenamiento.....10

3.4.5 Características sensoriales del queso fresco.....11

3.4.6 Producción de leche a nivel Mundial.....11

3.4.7 Producción de leche a nivel Nacional.....11

3.4.8 Producción de leche a nivel Provincial.....11

3.4.9 Control y prevención de agentes contaminantes.....12

3.4.10 Preparación de la muestra.....12

3.5. Quinolonas 13

3.5.1 Clasificación Quinolonas 15

3.5.2 Resistencia bacteriana.....17

3.5.3 Aislamiento y detección 17

3.6 La sanidad en los mercados municipales.....17

3.7 Métodos moleculares de detección de patógenos.....18

IV. MARCO METODOLOGICO 20

4.1 Materiales 20

4.1.1 Ubicación de la Investigación 20

4.1.2 Localización de la investigación 20

4.1.3 Situación Geográfica y Climática de la Provincia de Bolívar.....20

4.1.5 Material Experimental.....21

4.1.6 Materiales y equipos de laboratorio.....21

4.1.7 Materiales de oficina 22

4.2 Métodos 22

4.2.1 Factores en estudio.....22

4.2.2 Combinación de tratamientos.....23

4.2.3. Características del experimento.....23

4.2.4 Análisis Estadísticos y funcional.....24

4.2.5 Manejo del Experimento.....24

4.2.6 Análisis de la sensibilidad antibiótica.....26

4.2.7 Preparación del inóculo y aplicación de los discos.....27

4.2.8 Lectura de las placas e interpretación de los resultados 27

V.RESULTADOS Y DISCUSIÓN 28

5.1Detección de Arcobacter en muestras de quesos.....28

5.1.1 Aislamiento de Arcobacter mediante cultivo en placa 28

5.2. Extracción de ADN y análisis molecular.....35

5.3.1. Concentración de ADN mediante Micro-espectrofotometría.....36

5.3.2. Calidad de ADN mediante Electroforesis en Gel.....38

5.5. Análisis actividad Antimicrobiana de Levofloxacino y Ciprofloxacino sobre las cepas obtenidas.....42

VI. COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS.....51

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....52

7.1 Conclusiones 52

7.2. Recomendaciones 53

LISTA DE TABLAS

TABLA N°	DESCRIPCIÓN	PÁG.
1	Taxonomía del Género *Arcobacter*……..	6
2	Localización de la investigación……..	20
3	Situación Geográfica y Climática de la Provincia de Bolívar	20
4	Descripción de factores para el cultivo de *Arcobacter* spp	22
5	Combinación de factores……..	23
6	Detalle del experimento…….	23
7	Esquema para el análisis de Varianza……	24
8	Reactivos a utilizar PCR……	27
9	Condiciones para la PCR……...	27
10	Muestras de quesos frescos mercados municipales……..	29
11	Detección por cultivo en muestras de quesos…….	31
12	Procedencia y porcentajes de muestras de quesos positivas por muestras……..	32
13	Concentración de ADN determinado por el micro-espectrofotómetro……..	35
14	ADN extraído de aislados de queso y analizado por PCR.	38
15	Tabla de frecuencias y porcentajes para casos positivos de PCR……	39

16	Concentración mínima inhibitoria de la susceptibilidad de *Arcobacter*……	39
17	Tabla de actividad antimicrobiana de levofloxacino y ciprofloxacino frente a aislados de *Arcobacter* spp……	40
18	Tabla de frecuencias y porcentajes acerca de la susceptibilidad antimicrobiana de levofloxacino frente a aislados de *Arcobacter* spp…….	41
19	Tabla de frecuencias y porcentajes acerca de la susceptibilidad antimicrobiana de Ciprofloxacino frente a aislados de *Arcobacter* spp…….....…….	41
20	Tabla de prueba de Hipótesis Chi- cuadrado.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura	DESCRIPCIÓN	PÁG
1	Aislados realizados a partir de quesos frescos en medio selectivo de Agar sangre.....	32
2	Muestras positivas para Arcobacter extraídas de quesos frescos en medio selectivo de Agar sangre.……..	33
3	Microscopía de Arcobacter mediante tinción de Gram.…….....	34
4	Electroforesis de aislados de Arcobacter con gel de Agarosa.....	36
5	Electroforesis resultados PCR de aislados de Arcobacter spp.....	37

I. INTRODUCCIÓN

En el transcurso de los años la contaminación en alimentos se debe por diferentes factores mediante su preparación, proceso o transformación, etc. de no contar un manejo adecuado se puede proliferar agentes microbiológicos (Luz y Roy, 2017). Por ende, la prevención de estos agentes patógenos es primordial para evitar daños severos en un futuro no distante, y promover la seguridad alimentaria antes de que el alimento sufra una alteración (FAO y OPS, 2017).

Existen numerosas bacterias con diferentes estructuras, metabolismo, adaptación, etc. Según la bacteria del género *Arcobacter* se caracteriza por poseer microorganismos de vida libre que se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente como también formando parte de la microbiota intestinal de diversas especies animales (Rojas, 2011).

La contaminación que causa esta bacteria son diferentes cuando el ser humano consume alimentos que estén contaminados con presencia de este género según (Rivera, 2015) los síntomas que se hallan presente en el organismo son diarreas constantes y húmedas, dolor ventral, arcadas y espasmos o fiebre. La enteritis producida por *Arcobacter* en la mayor parte de veces no tiene consecuencias graves, no obstante, esto varia debido a la gravedad, el tiempo que presente los síntomas y el estado del sistema inmune de la persona.

El avance de la ciencia y la tecnología ha llevado al hombre a realizar diferentes estudios sobre la detección y aislamiento de este microorganismo para fines del cuidado de salud de ser humano y las industrias generando metodologías, proceso de aplicación en diferentes áreas y también promueve para otros estudios posteriores (Bayas 2016, Mansilla 2006, Rojas 2011, Rivera 2015).

Para el siguiente proyecto de investigación nos propusimos; Analizar la susceptibilidad a fluoroquinolonas de género *Arcobacter* aislados a partir de quesos frescos obtenidos en los mercados municipales de Guaranda.

II. PROBLEMA

El estudio que se realizará en el campo de productos lácteos como el queso fresco que se obtendrán de los mercados centrales municipales de la cuidad de Guaranda, se determinará el aislamiento de *Arcobacter* en este producto y la capacidad de fluoroquinolona para inhibir este microorganismo que estará presente en la muestra que será estudiada.

Se pretende aplicar un proceso antimicrobiano in vitro mediante pruebas de difusión disco placa Kirby-Bauer utilizando aislados de *Arcobacter* obtenidos de quesos frescos que han sido contaminados por diferentes actividades del mal manejo o procesamiento de este, para lo cual, se realizará muestreos semanales en los mercados céntricos de la ciudad de Guaranda perteneciente en la provincia Bolívar.

El valor muestral por alícuota de análisis será tomado de 20 muestra durante cinco semanas con un peso de 1 kilogramos. Al utilizar este proceso se puede disminuir la contaminación producida bacterias del género *Arcobacter* y de esta forma reducir el costo del proceso aplicado y darle una alternativa en la industria alimentaria como un conservante y darle una vida anaquel el producto.

Conforme lo previamente mencionado, se pretende desarrollar una metodología y aplicación de la misma mediante la utilización de fluoroquinolonas con el principal objetivo de recuperar la calidad de vida del producto lácteo, la cual puede ser una referencia para estudios similares en método de conservación del producto lácteo que se encuentra presente en el cantón Guaranda de la provincia de Bolívar, contribuyendo con la seguridad alimentaria y posibilitando la realización de estudios posteriores.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades.

La contaminación de alimentos se debe por las condiciones higiénicas del lugar donde se expenden alimentos y estos sean inocuos para la salud los puntos de venta deben estar ubicados en un ambiente aislado de cualquier foco de contaminación o insalubridad, sus alrededores libres de basura, evitar lugares donde se observen aguas estancadas, mantener los alimentos en buen resguardo y un lugar libre de plagas (Montesdeoca, 2016).

Desde el ordeño hasta que llega al consumidor en la leche caen diferentes microorganismos que con una conservación duradera aumenta la microflora y puede provocar cambios como el aumento de acidez, y coagulación. (Arias, 2015)

Una correcta higiene en los alimentos está determinada por una multitud de factores: condiciones para su obtención, características de los medios empleados para su transportación, temperaturas y condiciones de conservación, estructura de los lugares donde los alimentos se manipulan, etcétera, destacando las prácticas de higiene de los manipuladores de éstos. (Romero *et al*., 2015)

La contaminación alimenticia estudia factores que, transgrediendo sobre alimentos y bebidas, incitan alteraciones o condiciones de riesgo en las personas tras el consumo de dichos alimentos. Dependiendo de los factores causantes de la contaminación se diferencian dos clases de contaminación: la biótica, incitada por la presencia inadecuada de microbios, parásitos, virus o agentes tóxicos de origen orgánico en los alimentos, y la abiótica, formada por la presencia de productos sintéticos o restos de los mismos, así como contaminantes radioactivos. (Campos, 2014)

3.2 Clases de Microorganismos

Las bacterias aerobias mesófilas (BAM), son la flora total incluida en el alimento detallado. La determinación de microorganismos puede aportar una imagen acerca

de la calidad sanitaria e higiénica de la materia prima y de cómo ha sido manejada a través del proceso productivo.

Son una imagen de valor limitado ya que su cálculo no muestra el género de bacterias contenidas, si son nocivas o si hay de toxinas bacterianas en el producto; sin embargo, cálculos altos de BAM son poco ansiados en todos los alimentos que no sean hechos a través de fermentación (Alfaro *et al.*, 2014).

Existen varios tipos de microorganismos que pueden contaminar los alimentos y causar enfermedades.

- Patógenos; son capaces de causar infecciones en un huésped susceptible. Entre las más frecuentes están: *Cólera, Salmonella, Shigella, Brucilla*, y virus como Hepatitis.
- Toxígenos; son productores de toxinas en el alimento y pueden acusar intoxicaciones como en el caso de las producidas: *Staphylococcus aureus* y *Clostridium botilium*.
- Alteradores (saprofitos); causantes de deterioro o alteración de los alimentos, es el caso de algunas especiales de *Bacillus*, Micrococos, hongos y levaduras. (Torres, 2015)

3.3 Género del *Arcobacter*

Arcobacter es una bacteria Gram negativa y no forma esporas. Es una bacteria móvil y posee un flagelo polar en uno o en ambos lados de la célula. Las condiciones de crecimiento de *Arcobacter* son en condiciones aeróbicas y anaeróbicas y en un amplio rango de temperaturas (15 a 42 °C). El crecimiento óptimo se da en condiciones microaeróbicas, con un rango de 3 a 10% de oxígeno, y no necesitan de la presencia de hidrógeno para poder desarrollarse. (Rivera, 2015).

3.3.1 Antecedentes históricos

Ha resultado dificultoso introducir taxonómicamente al género *Arcobacter* por sus requerimientos de desarrollo y la respectiva inactividad en los análisis bioquímicos tradicionales. El género *Arcobacter* fue presentado por Vandamme (1991) luego de

una investigacion de hibridación de ADN del gen 23S del ARNr para representar dos especies aerotolerantes de campilobacter: *Campylobacter cryaerophila* (conocidas ahora como *Arcobacter cryaerophilus*) y *Campylobacter nitrofigilis* (ahora *Arcobacter nitrofigilis*), que están capacitadas para crecer a 15ºC. En 1991 se admitió la introducción de una nueva familia bacteriana, Campylobacteraceae, acuñada por Vandamme y De Ley (1991) para congregar los géneros *Campylobacter* y *Arcobacter*.

Este agrupamiento se hizo basándose en los caracteres fenotípicos y genotípicos que tenían en común y que a su vez los separaba de otros géneros. Más tarde se incluyeron también las especies *A. butzleri* y *A. skirrowii* (Vandamme *et al.,* 1992). Posteriormente, *A. cibarius* aislado de carcasas de pollo (Houf *et al.,* 2005) y *A. halophilus* aislado de agua procedentes de un lago hipersalino del noroeste de las islas de Hawai (Donachie *et al.,* 2005).

A continuación, se describe la taxonomía actual del género *Arcobacter*, que junto con Campylobacter y Sulfurospirillum se agrupan formando la famila Campylobacteraceae, con sus 17 especies (Calvo *et al*., 2013). Actualmente se encierran 17 especies, 9 de las cuales fueron aisladas de muestras ambientales: *A. nitrofigilis*, de las raíces de *Spartina alternimicrobiota*; *A. halophilus* de lagos supersalinos; *A. mytili*, *A. molluscorum*, *A.*, *A. bivalviorum* y *A. venerupis*, de moluscos; *A. marinus* aislado de agua del mar y de estrellas de mar; y *A. defluvii*, de aguas residuales. Las otras seis especies se han descrito desde fuentes humanas o animales: *A. butzleri* de heces humanas, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowi* y *A. trophiarum* de heces de animales; *A. cibarius* de la carne de pollo y *A. thereius* del aborto porcino. En noviembre, se encontraron dos nuevas especies: *A. cloacae* y *A. suis* aisladas de alimentos y de aguas residuales (Collado y Figueras, 2012)

3.3.2 Taxonomía de *Arcobacter*

Tabla 1.
Taxonomía del Género Arcobacter

Dominio	Bacteria
Phylum BXII	Proteobacteria
Clase V	Epsilonproteobacteria
Orden I	Campylobacterales
Familia I	Campylobacteraceae
Género I	*Arcobacter*
Género II	*Campylobacter*
Género III	*Sulfurospirillum*

3.3.3 Trasmisión y enfermedades.

Las patologías transmitidas por alimentos son un inconveniente a nivel de salud pública, su acontecimiento va en extensión en países en desarrollo y desarrollados. Provocan daños en la salud, muerte y pérdidas económicas. Un gran porcentaje de estos eventos se deba errores en las últimas etapas de la elaboración de alimentos. Los principales factores de riesgo son la presencia de manipuladores enfermos, la contaminación cruzada, el almacenamiento incorrecto de alimentos, las prácticas inadecuadas de cocción y recalentamiento, y las fallas en el manejo luego de la cocción. (Scorza, 2013)

El hábitat de este género varia, reconociéndose como reservorios biológicos animales domésticos, ganado (porcino, ovino, bovino y equino), aves de corral (pollo, gallina y pavo) y salvajes, de donde se ha aislado de órganos reproductores, de fetos abortados y deposiciones. También han sido encontrados en raíces de plantas, en reservas de aguas, alcantarillados, ductos de agua potable y en mariscos filtradores. La vía de traspaso al ser humano es fecal oral, por medio de la ingesta de carnes crudas o insuficientemente cocidas, leche sin tratamiento de pasteurización, aguas y mariscos contaminados, provocando cuadros de diarrea. (Mansilla, 2006).

La vía de transferencia para el hombre es fecal-oral y está dada por el consumo de agua, leche no pasteurizada, alimentos crudos o mal cocidos de origen animal, como carne de bovino, porcino y aves que estén contaminadas con el microorganismo. (Rivera, 2015).

De las cuatro especies que conforman este género, sólo tres de ellas provocan manifestaciones clínicas en el hombre. *A. butzleri* y *A. cryaerophilus*, han sido aisladas de pacientes con bacteremia, apendicitis, endocarditis, peritonitis y diarrea, mientras que *A. skirrowii* sólo ha sido asociada a un caso de diarrea crónica en adulto. (Jara, 2006).

La dificultad del cuadro clínico en las contaminaciones por *Arcobacter* varía mucho, aunque el síntoma primordial es la disentería acuosa e intermitente, diferenciándose de la diarrea inflamatoria descubierta en los casos de contaminación por *Campylobacter jejuni* (Vandenberg *et al*., 2004).

Las revelaciones clínicas, a su vez, empiezan desde infecciones sin sintomatología aparente (Samie *et al*., 2007; Calvo *et al*., 2013) o diarreas mínimas, hasta diarreas crónicas y copiosos, que requieren hospitalización. En un brote por *A. butzleri* que se produjo en un centro de estudios italiana, que afectó a 10 niños en el año 1992, el síntoma principal fue espasmos abdominales periódicos sin diarrea (Bayas, 2016).

3.3.4 Contaminación en alimentos

La leche, desde el momento mismo de su producción está expuesta a que se le agreguen un sin número de agentes microbianos. La cantidad y clase de estos agentes está en función de las prácticas de higiene y sanidad observadas en el manejo del producto durante su producción, transporte, procesamiento y venta.

Las bacterias más importantes de la leche y de los subproductos son: Las bacterias lácticas, bacterias coliformes, bacterias propiónicas, bacterias butíricas, bacterias 6 proteolíticas y las bacterias patógenas. (García, 2000)

Los alimentos más comunes son productos derivados de las aves de corral (con la prevalencia más alta) seguida por carne de cerdo, carne de vacuno, y la leche cruda. Aunque todavía no existen muchos estudios, los moluscos son otra fuente potencial de infección por parte de *Arcobacter spp* (Almenar, 2015).

3.4 Queso fresco

El queso es un alimento de amplio consumo a nivel mundial, cuyas características nutritivas, funcionales, texturales y sensoriales difieren entre cada tipo. Se estiman más de 2000 variedades de queso, entre madurados, semi-madurados y frescos.

No obstante, en nuestro país predomina el consumo de quesos frescos, mismos que forman parte de una enorme variedad de platillos que constituyen nuestro legado gastronómico. (Ramírez y Vélez, 2014)

3.4.1 Características del Queso fresco

El queso fresco se caracteriza por ser un producto poco fermentado, aunque ligeramente ácido (pH en torno a 5,3), muy líquido (actividad del agua de 0,9), con un bajo porcentaje de sal (menor al 3%) y con un potencial de óxido-reducción electronegativo (ausencia de oxígeno). Estas condiciones permiten el desarrollo de muchos microorganismos propios de la leche y de contaminación ambiental. Por este motivo, es esencial que en este producto se realice siempre una pasteurización previa de la leche. Por otra parte, si existen microorganismos patógenos en la masa elaborada, claramente se permitirá su multiplicación, aumentando enormemente el riesgo sanitario (Huamán, 2013).

Tienen un alto contenido en humedad del 60 al 80% de textura relativamente firme, levemente granular, preparado con leche íntegra, semidescremada, cuajada por enzimas o ácidos orgánicos, generalmente sin cultivos lácticos. Son quesos sin corteza o con una corteza muy fina que apenas se prensan, con lo que no eliminan mucho suero. (García, 2000).

Desde el punto de vista fisicoquímico, el queso se define como un sistema tridimensional tipo gel, formado básicamente por la caseína integrada en un

complejo caseinato fosfato cálcico, el cual por coagulación, engloba glóbulos de grasa, agua, lactosa, albúminas, globulinas, minerales, vitaminas y otras sustancias menores de la leche, las cuales permanecen adsorbidas en el sistema o se mantienen en la fase acuosa retenida (Ramírez y Vélez, 2014)

3.4.2 Proceso de elaboración

El proceso de elaboración del queso es bastante simple, no obstante, involucra fenómenos físicos y químicos muy complejos. Se trata esencialmente de un proceso de concentración, a partir de la coagulación de la proteína mayoritaria de la leche (caseína) por la acción enzimática (cuajo) u otro coagulante de tipo ácido (comúnmente ácido láctico). Esquema para la elaboración de queso fresco. Para el caso de quesos suaves (panela, fresco, blanco y crema), la coagulación se desarrolla a temperatura de aproximadamente 38ºC, mientras que para el queso tipo Oaxaca la temperatura debe alcanzar los 42ºC, además algo distintivo es que se requiere una pre acidificación de la leche, la cual se logra por la adición de cultivos iniciadores. (Ramírez y Vélez, 2014)

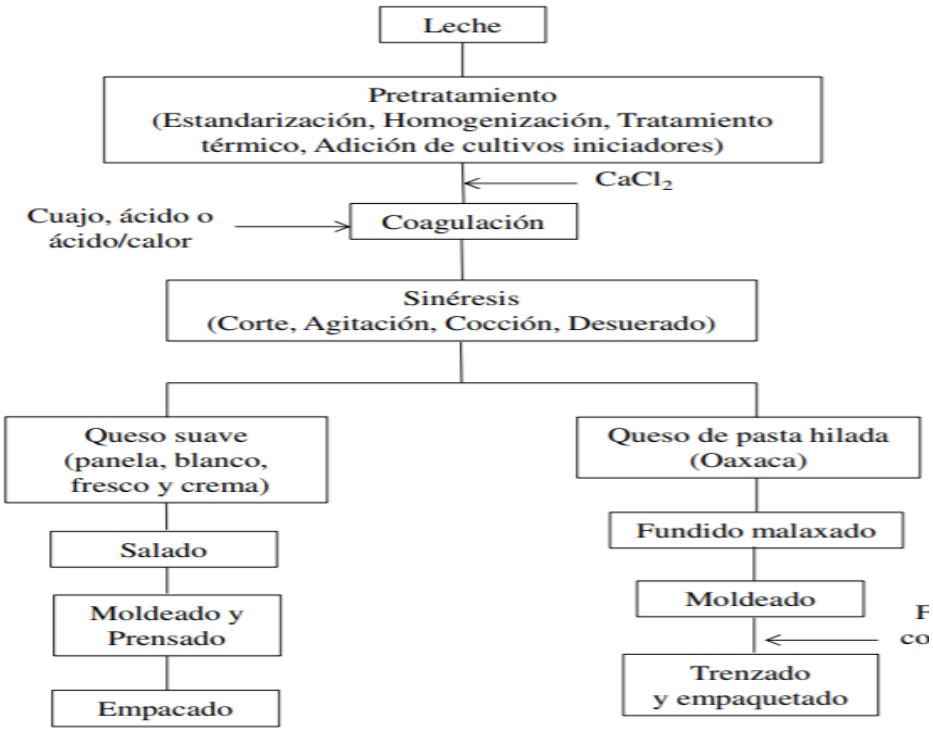


Figura 1. Proceso de la elaboración de quesos frescos. Tomado de Gunasekaran y Ak, 2003.

El paso indispensable en la elaboración de los quesos, es la coagulación de la caseína, provocada mediante la acción combinada de enzimas proteolíticas (cuajos de distintos tipos) y calcio. El proceso de formación del coágulo incluye 2 etapas. En la primera, se desarrolla un proceso enzimático modulado por la quimosina, la cual rompe los enlaces entre los aminoácidos fenilalanina y metionina (Fen-105 y Met-106) presentes en la κ-caseína, liberándose el glicomacropéptido en la solución. En la segunda etapa, los agregados de para-κ-caseína producen el coágulo. Hasta la etapa de coagulación, los procedimientos básicos en la elaboración de los diferentes tipos de quesos son muy similares; sin embargo, las etapas siguientes varían de acuerdo con el tipo de queso a producir.(Ramírez y Vélez, 2014)

3.4.3 Composición química y valor nutritivo

El queso comparte casi las mismas propiedades nutricionales con la leche; a excepción de la lactosa, los otros componentes se encuentran más concentrados. Además de brindar un excelente aporte de proteínas de alto valor biológico, el queso se destaca por ser una fuente importante de calcio y fósforo.

3.4.4 Conservación y almacenamiento

El mejor sistema de conservación es el papel parafinado a temperatura no superior a los 14º y con una humedad entre el 70 y 80 por ciento. El queso es de los pocos alimentos que no pueden congelarse. El queso fresco precisa de una temperatura de 4º C, por lo que se conservara siempre en la nevera, en la parte alta.

El queso blando se conserva poco tiempo, por lo que es aconsejable consumirlo lo antes posible. Se conserva menos que el curado debido a que tiene más contenido en agua por lo que aumentan las posibilidades de crecimiento de bacterias y hongos. Es preferible comprar el queso entero ya que un queso abierto pierde cualidades.

Para conservar los quesos una vez empezados, cubrir la cara del corte con papel transparente. Si está en su punto, guardarlo en el cajón de la verdura en la nevera, bien cubierto y sacarlo un rato antes de consumirlo. Cuando le falta curación, dejarlo en un lugar oscuro, cubierto y a temperatura ambiente. (Lemus, 2006)

3.4.5 Características sensoriales del queso fresco

La apariencia, la textura, el color, el olor y el sabor de los quesos no madurados deberán ser los característicos para el tipo de queso que corresponda y deberán estar libres de los defectos indicados a continuación.

- Defectos del sabor: Fermentado, rancio, agrio, quemado, o cualquier otro sabor anormal o extraño.
- Defectos en el olor: Fermentado, amoniacal, fétido, rancio, mohoso, o cualquier olor anormal o extraño.
- Defectos en el color: Anormal; no uniforme, manchado o moteado, provocado por crecimiento de mohos o microorganismos que no correspondan a las características del queso de que se trate.
- Defectos en la textura: No propia o con cristales grandes de lactosa con consistencia ligosa acompañada de olor desagradable
- Defectos en la apariencia: No propia, con cristales grandes de lactosa, sucia o con desarrollo de mohos u otros hongos. (Lemus, 2006)

3.4.6 Producción de leche a nivel Mundial

La producción mundial de leche alcanzó 811 millones de toneladas en 2017, 1.4 por ciento más alto que en 2016. En todas las regiones geográficas, el producto se expandió en Asia, América y Europa; estancado en África; y declinó en Oceanía (FAO, 2018).

3.4.7 Producción de leche a nivel Nacional

En Ecuador se producen alrededor de 5’300.000 litros de leche diarios que abastecen la demanda local. “Tenemos un excedente de alrededor de 250.000 litros de leche al día, que es justamente lo que tratamos de exportar. (El telégrafo, 2018).

3.4.8 Producción de leche a nivel Provincial

La provincia Bolívar con 26.703 UPAS posee 196.524 ejemplares bovinos, de ellos 154.732 son criollos, 40.970 mestizos y 386 son pura sangre y un total de 53.111

vacas de ordeño, para una producción total de 270.139 litros de leche para el año 2013. (Jiménez *et al.*, 2016).

3.4.9 Control y prevención de agentes contaminantes

La quimioterapia antimicrobiana comenzó en los años treinta con las sulfonamidas y durante el siglo veinte, se produjeron grandes cambios, tanto en los tipos de infecciones observadas como en la susceptibilidad y resistencia de los gérmenes a los antimicrobianos.

Lo anterior significó no sólo una búsqueda de fármacos que fuesen más efectivos, sino que también una mayor preocupación por perfeccionar métodos, técnicas y procedimientos que hicieran más eficiente la terapéutica antimicrobiana. Entre los nuevos fármacos aparecidos, las quinolonas, y más tarde las fluoroquinolonas, enriquecieron y fortalecieron la terapia antimicrobiana.

Sin duda alguna, las fluoroquinolonas, con un mecanismo de acción único, un amplio espectro de actividad y con una menor posibilidad de desarrollo de resistencia, han resultado de gran utilidad.

La evolución observada durante el transcurso del siglo veinte, permitió a los antimicrobianos salvar millones de vidas, reduciendo la morbilidad y la mortalidad de enfermedades que, previo a su aparición, se pensaba que eran incurables. (Barrientos, 2006)

3.4.10 Preparación de la muestra.

Para reducir la diferencia de tiempo de incubación entre las muestras, es posible preparar una micro placa de 96 pocillos que contenga las muestras a valorar y los controles, y después transferirlos a la micro placa ELISA con una pipeta multicanal.

3.4.10.1. Preparación de la solución de lavado.

Es necesario equilibrar la solución de lavado concentrada (20X) a temperatura ambiente (20°±5°C) y agitar correctamente para obtener la dilución de los cristales.

Preparar la solución de lavado (20X) anterior al (1X) diluyéndola con agua destilada/desinonizada.

3.4.10.2. Procedimiento.

Mantener los reactivos a temperatura ambiente (20°C±5°C). Muestra de suero o plasma.

- Diluir:
- 90uL Diluyente 2 en todos los pocillos
- 10uL Control negativo en todos los pocillos A1 Y B1.
- 10uL Control positivo en los pocillos C1 y D1.
- 10uL de cada muestra a valorar en los pocillos.
- Incubar 45 minutos ± 4 minutos a 21°C (±5°C)
- Lavar todos los pocillos 3 veces con aproximadamente 300uL de solución de lavado. Evitar que los pocillos se sequen entre los lavados.
- Preparar el conjugado 1X diluyendo el conjugado 10X al 1:10 con el diluyente Distribuir 100uL del conjugado 1X a todos los pocillos
- Incubar 30 minutos ± 3 minutos a 21°C (±5°C)
- Lavar todos los pocillos 3 veces con aproximadamente 300uL de solución de lavado. Evitar que los pocillos se sequen entre los lavados
- Distribuir 100uL de solución de revelación a todos los pocillos
- Incubar 15 minutos ± 2 minutos a 21°C (±5°C) en la oscuridad.
- Distribuir 100uL de Solución de parada a todos los pocillos para detener la reacción.
- Leer la densidad óptica a 450nm.

3.5. Quinolonas

Las primeras cuatro quinolonas, derivadas del Ácido nalidíxico y con estructuras similares, fueron el Ácido pipemídico (piridopirimidina), el Ácido oxolínico, la Flumequina (fluoroquinolona) y el Cianoxacino (cinolona), y como su predecesor se emplearon para el tratamiento de las infecciones urinarias por Gram negativos.

En la década del 1980 se observó que la presencia de un anillo piperacínico en posición 7 y la presencia de un átomo de flúor en posición 6 del doble anillo mejoran la absorción oral y la actividad antimicrobiana. Surgen así las fluoroquinolonas, derivadas de naftiridinas o de quinolinas. (Barrientos, 2006)

Las fluoroquinolonas están contenidas en un grupo de antibacterianos sintetizados que estimulan alto interés en medicina veterinaria también como en medicina humana. Confrontados con distintos fármacos antimicrobianos, las fluoroquinolonas exhiben, a más de poseer de un amplio espectro, una buena permeabilidad luego de su administración vía oral, además de un alto volumen de distribución, llegando a casi todos los tejidos y células del cuerpo y un tiempo de vida prolongado, aprobando ciclos de administración de 1-2 veces al día. Por ello se describen como agentes excelentes para el tratamiento de infecciones producidas por microorganismos intracelulares. Además, son ventajosos en el tratamiento de inoculaciones del aparato respiratorio y tejidos blandos. (Titos, 2010)

Son un grupo de antimicrobianos sintéticos de amplio espectro, cuyo "blanco" es la síntesis del ADN. Se han utilizado ampliamente para el tratamiento de infecciones intra y extra-hospitalarias, convirtiéndose en un recurso de suma importancia para países en vías de desarrollo debido a la gran disponibilidad de genéricos que reducen drásticamente el costo del tratamiento.

Su efectividad se debe a su alta disponibilidad en el organismo, el nivel de seguridad que posee y su modo de administración que puede ser enteral como parenteral. Aunque se han empleado sin distinción en el campo de la ganadería y en el proceso de alimentos, lo que ocaciona que el incremento de resistencia farmacologica sea un inconveniente frecuente, coligado a la constante exhibición de varios microorganismos. (Álvarez *et al*., 2015).

3.5.1 Clasificación Quinolonas

Primera generación

Derivados de la naftiridina

No fluoradas: Ácido nalidíxico.

Fluoradas: Enoxacino, Tosufloxacino.

Derivados de la cinolina: Cinoxacino

Derivados de la piridopirimidina: Ácido piromídico, Ácido pipemídico.

Derivados de la quinoleína

Quinolonas no fluoradas: Ácido oxolínico, Acroxoxacino (antes rosoxacino), Droxacino, Miloxacino, Tioxacino.

Monofluoroquinolonas: Flumequina.

SEGUNDA GENERACIÓN (derivados de la quinoleína)

Monofluoroquinolonas: Amifloxacino, Ciprofloxacino, Irloxacino o pirfloxacino, evofloxacino, Norfloxacino, Ofloxacino ,Pefloxacino.

TERCERA GENERACIÓN

Monofluoroquinolonas (derivados de la quinoleína): Grepafloxacino, Gatifloxacino.

Difluoroquinolonas (derivados de la quinoleína): Sparfloxacino.

Trifluoroquinolonas (derivados de la naftiridina): Tosufloxacino.

CUARTA GENERACIÓN (derivados de la quinoleína)

Monofluoroquinolonas: Clinafloxacino, Moxifloxacino.

(Titos, 2010)

Existe tendencia de usar nomenclatura similar a las cefalosporinas, por lo que actualmente se clasifica a las fluoroquinolonas en generaciones. De primera generación son las moléculas históricamente más antiguas y que definen los núcleos básicos de las quinolonas como ácido nalidíxico, ácido piromídico, ácido oxolìnico, cinoxacina, ácido pipemìdico y flumequina. Caracterizadas estructuralmente por la ausencia de un radical 6-fluoro, con excepción de la flumequina.

Estas moléculas se caracterizan por su reducido espectro de actividad y en términos generales, como agentes quimioterápicos sólo son útiles en infecciones del tracto urinario. (Barrientos, 2006).

La segunda generación fluoroquinolonas se identifica fundamentalmente por la presencia de flúor y de piperazina o metil piperazina. La molécula principal de esta generación el ciprofloxacino y otros integrantes son norfloxacino, enrofloxacino, entre otros.

La actividad biológica de estas moléculas es utilizada para una serie de infecciones graves que incluyen cuadros osteoarticulares, digestivos, tejidos blandos, infecciones respiratorias e infecciones de transmisión sexual. (Titos, 2010)

La Sparfloxacina, Levofloxacino, tosufloxacina, gatifloxacina, pazufloxacina y grepafloxacina son fluoroquinolonas de tercera generación que presentan estas características microbiológicas, además de presentar una actividad levemente superior sobre bacterias anaerobias que sus congéneres de segunda generación. (Mella M. *et al*., 2000)

Son una importante alternativa frente *Streptococcus pneumoniae*, incluyendo cepas resistentes a penicilina. Presentan una mayor actividad anti estafilocóccica, pero no son útiles en infecciones producidas por Staphylococcus aureus meticilin resistentes. También presentan una actividad levemente superior a las quinolonas de 2ª generación frente a anaerobios. (Titos, 2010)

La cuarta generación presenta mayor actividad antianaerobia, utilizándose en infecciones polimicrobianas como las abdominales y ginecológicas. Algunas de ellas presentan actividad antitumoral, demostrado en animales de experimentación, lo cual posibilitaría su aplicación en el tratamiento de ciertos procesos tumorales. Otro punto importante es la actividad frente a Gram negativos.

Las nuevas moléculas desarrolladas mejoran discretamente su actividad frente a Enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores, siendo ciprofloxacino la fluorquinolona de elección frente a Pseudomonas aeruginosa. Es por ello que incrementar de forma significativa la actividad frente a Gram negativos es un objetivo deseable a conseguir (Titos, 2010)

3.5.2 Resistencia bacteriana

La resistencia de las bacterias es un fenómeno natural, como parte de la evolución, adaptación y selección de especies. La introducción de los antibacterianos por el hombre ha alterado el delicado y frágil equilibrio de las bacterias con el medio ambiente, al ejercer presión selectiva sobre ellas, es decir, la presencia antimicrobiana mata a las bacterias sensibles y favorece la persistencia de aquellas que son insensibles a él. La combinación de uso, mal uso y abuso de estos fármacos, en distintos ecosistemas, ha favorecido al acelerado surgimiento de diferentes cepas de bacterias patógenas multi resistentes. (Barrientos, 2006)

3.5.3 Aislamiento y detección de *Arcobacter*

La investigación acerca de la prevalencia de *Arcobacter* emparentadas a cuadros clínicos está asiduamente paralizado ya que los dos grandes problemas que enfrentan son: el aislamiento de *Arcobacter* (causado por la no existencia de medios de cultivos, así como de procedimientos para su respectivo aislamiento) y la caracterización de las cepas obtenidas. Pese a que se han manejado distintos tipos de medios de cultivo y varios métodos para aislar *Arcobacter* de varios tipos de muestras, en la actualidad no ha sido planteado un procedimiento imponderable para las especies de dicho género. (Rojas, 2011).

3.6 La sanidad en los mercados municipales

Según el Art. 183.ARCSA, cada comerciante debe receptar su mercadería según los diferentes tipos de alimentos que ofrezca al público, la recepción de los alimentos debe efectuarse en áreas limpias y protegidas, las carnes, el despojo comestible y el pescado se colocaran en bandejas y productos al granel en envases limpios. Los productos y alimentos procesados deben almacenarse en condiciones que impidan el deterioro, eviten la contaminación y reduzcan al mínimo su daño o alteración, deben conservarse refrigerados de acuerdo a las temperaturas recomendadas para cada alimento, como el caso de cárnicos, lácteos y derivados, productos pesqueros y agrícolas.

Los encargados de la recepción de la mercadería deben ser capacitados para que cumplan lo expuesto por las normas Alimentarias como BPM e INEC.

Esto le permite decidir la aceptación o rechazo de los alimentos. De acuerdo al grado de perecida.

La perecida es el tiempo en que tarda un alimento en comenzar a degradarse perdiendo sus propiedades nutricionales. El art.28 del ministerio de Salud Pública se debe tener en cuenta la vida útil del producto. El alimento que primero entra, primero sale.

Es recomendable que los comerciantes lleven un registro de proveedores en caso de alguna anomalía del producto. Los alimentos deben ser cargados y descargados en el menor tiempo posible, con el fin de mantener la cadena de frío y así exponer el menor tiempo a los alimentos a la contaminación. Se deben fijar horarios de recepción que coincidan cuando el local este vacío o con pocos clientes. (Luz y Roy, 2017)

Según el Art.184 resolución ARCSA (Durante las actividades de almacenamiento se debe aplicar el principio PEPS (lo primero que entra es lo primero que sale) o PCPS (próximo a caducar primero en salir) dependiendo de la naturaleza del producto. Los alimentos deben estar separados del piso, paredes y techo de forma que se evite la contaminación, en superficies limpias y buen estado de mantenimiento. (Ministerio de Salud Pública-ARCSA, 2015)

El personal encargado del trasporte debe estar entrenado sobre medidas preventivas adicionales de acuerdo a cada tipo de productos. Es importante mantener la cadena de frío por lo que cárnicos, lácteos, etc. Deben ser trasportados en camiones con sistemas que mantengan bajas temperaturas en su interior. Debe capacitarse al personal de transporte en medidas preventivas para evitar la inocuidad de los alimentos. (Ministerio de Salud Pública-ARCSA, 2015)

3.7 Métodos moleculares de localización de patógenos

Las metodologías moleculares son fundadas en el estudio del ADN genómico microbiano, por eso son fundamentalmente sugestivas en la localización e caracterización de microbios muy sensitivos a las condiciones del medio o a la localización de bacterias que compiten con estas, o cultivo complicado, hasta la fecha no hay metodologías lo competentemente específicas para su detección. La aparición de sus ácidos nucleicos en la muestra podría impedir la escasez del cultivo, produciendo más veloz y especifico el procedimiento de detección (Lara, 2014).

En los últimos años se han introducido métodos diagnósticos basados en biología molecular, PCR y multiplex PCR para la identificación de las especies de *Arcobacter* en pollo, cerdos y aguas residuales entre otros. Estos ensayos moleculares son más rápidos que los métodos de identificación convencional y tienen una alta especificidad (Mansilla, 2006).

IV. MARCO METODOLOGICO

4.1 Materiales.

4.1.1 Ubicación de la Investigación

La presente investigación se desarrollará en la Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Carrera de Ingeniería Agroindustrial, instalaciones del Departamento de Investigación.

4.1.2 Localización de la investigación

Tabla 2.
Localización de la investigación.

UBICACIÓN	LOCALIDAD
Provincia	Bolívar
Cantón	Guaranda
Sector campus	Laguacoto II
Dirección	Vía Guaranda – San Simón Km 1 ½

Fuente: GAD cantón Guaranda (2019)

4.1.3 Situación Geográfica y Climática de la Provincia de Bolívar.

Tabla 3.
Situación Geográfica y Climática de la Provincia de Bolívar.

PARAMETRO	VALOR
Altitud	2640 msnm
Latitud	01°34'15" S
Longitud	79°0'02" W
Temperatura mínima	8°C
Temperatura media anual	14.8°C
Temperatura máxima	21°C
Humedad relativa promedio	75%

Fuente: INAMHI (2019)

4.1.4 Zona de Vida.

De acuerdo con la clasificación de la zona de vida, realizado por L. Holdríge, el sitio corresponde a la formación Bosque Húmedo Montano Bajo (Bhmb).

4.1.5 Material Experimental.

- Queso fresco
- Fluroquinolonas

4.1.6 Materiales y equipos de laboratorio

- Estufa
- Material de vidrio y plástico
- Pipetas
- Peras
- pH-metro
- Balanza digital
- Reactivos
- Termómetro
- Cajas Petri
- Asas de siembra
- Mechero
- Torundas
- Gradillas
- Tubos de ensayo
- Tubos eppendorf
- Microtubos eppendorf
- Gradillas de eppendorf
- Medios de cultivo
- Termociclador
- Incubador
- Cuenta colonias
- Cámara de flujo laminar
- Panel de electroforesis
- Transuluninador (fotodocumentador)
- Tampones de carga y reacción en gel
- Reactivos para PCR

- Tampón 1 X
- dNTPs: 0,2 mM/cada
- MgCl2: 1,5 mM
- Iniciadores: 0,5 µM/cada
- Taq polimerasa: 5 U

- Marcadores de pesos moleculares
- Kit de extracción de ADN
- Micropipetas
- Micropuntas
- Nanodrop
- Agitador vortex

4.1.7 Materiales de oficina .

- Libreta de apuntes
- Computadora
- Impresora
- Papel bond
- Esferográficos
- Cámara fotográfica digital
- Memoria flash

4.2 Métodos

4.2.1 Factores en estudio

Tomando como referencia el objetivo 1, para el aislamiento de microorganismos del género *Arcobacter* spp se tomará en cuenta los siguientes factores de estudio.

Tabla 4.
Representación de los factores en estudio para el cultivo de Arcobacter spp.

Factores de estudio	Descriptores
Factor A (Enriquecimiento del medio)	A0 = sin suplemento A1 = CAT (cefoperazona–amphotericina–B-teicoplanina)
Factor B (Temperaturas de incubación)	B0 = 30°C B1 = 37° C

4.2.2 Combinación de tratamientos

A continuación, se describe la combinación de los factores A×B, el cual consta de enriquecimiento del medio y temperatura de incubación.

Tabla 5.
Combinación de factores.

Tratamientos	Código	Descripción de combinación de factores
1	A0B0	Medio sin suplemento + incubado a 30°C
2	A0B1	Medio sin suplemento + incubado a 37°C
3	A1B0	Medio con suplemento + CAT incubado a 30°C
4	A1B1	Medio con suplemento + CAT incubado a 37°C

4.2.3. Características del experimento

Cada unidad experimental está formada por 100 g, bajo el diseño DCA sin arreglo factorial de combinación de 2×2.

Tabla 6.
Detalle del experimento.

Detalle	
Factor en estudio (Fe)	2
Tratamientos (t)	4
Repeticiones (r)	3
Unidades experimentales (t×r)	12
Tamaño unidad experimental	100 g

Modelo matemático DCA

Yijk= μ + Ai + Bj + (AB)ij + Eijk.

μ= Efecto global.

Ai= efecto de i-ésimo nivel del factor A; i = 1,…, a.

Bj= efecto de i-ésimo nivel del factor B; j = 1,…, b.

ABij= efecto de la iteración entre los factores A y B.

Eijk= error experimental de la unidad ji.

4.2.4 Análisis Estadísticos y funcional

Tabla 7.
Esquema para el análisis de Varianza.

Fuentes de variación	Grados de Libertad
Total (a*b*r) – 1	11
Repeticiones (r-1)	2
Factor A (Enriquecimiento del medio)	1
Factor B (Temperaturas de incubación)	1
Error Experimental	7

- Prueba de Tukey para promedio de tratamientos.
- Prueba de Tukey para factores en estudio (A x B).

4.2.5 Manejo del Experimento.

- **Obtención de muestras**

El queso fresco se obtuvo de los mercados céntricos de la ciudad de Guaranda de la provincia de Bolívar, mercado minorista "10 de Noviembre" y mayorista "Bellavista".

- **Aislamiento del patógeno**

Para el aislamiento del patógeno, se tomaron un total de 100 muestras de queso fresco de los mercados municipales 10 de noviembre y Bellavista durante 10 semanas. Las muestras fueron transportadas de forma inmediata al laboratorio y procesadas dentro de un máximo de tres horas.

Las muestras de quesos obtenidas, fueron homogenizadas, este proceso se realizó mediante la adición de 90 mL de agua tampón peptona (ATP) (**VM666728, Merck KGaA**) a 10 gr de muestra de queso recolectada, todo esto se combinó en una bolsa de Stomacher (**BA6141/STR Stomacher®, Seward**), en la que se aplicaron fuerzas mecánicas de aplastamiento y agitación de la muestra para así, extraer sedimentos microbianos para el respectivo análisis (García *et al.*, 2015) (Anexo 3).

Para el procesado individual, se tomaron 10 ul de cada muestra, luego se adicionó a 90 mL de *Arcobacter* Broth (**OXOID, CM0965B, UK**), posteriormente se añadirá suplementos al medio y condiciones de cultivo conforme la combinación de factores de la tabla 5.

Cada uno de los tratamientos fueron incubados a 37 °C durante 48 h conforme lo establecido por Vicente-Martins *et al*. (2017); para posteriormente incubados a 37 °C durante un periodo de 24-48 horas, tras este tiempo, 200 µL de cada caldo fue transferido sobre filtros de membrana (0,45 tamaño de poro) previamente colocados sobre *Arcobacter* Agar suplementado, con 5% de sangre de oveja desfibrilada esto conforme a lo establecido por (Atabay y Corry, 1997). Se dejó en reposo durante 30 minutos, luego las placas fueron llevadas a incubación a 30 °C y 37 °C conforme el diseño previamente descrito, el crecimiento de las muestras se realizó en condiciones de microaerofilia (10 % CO_2, 5 % O_2, y 85 % N_2), con la utilización de un sistema de generación atmosférica Anaerojar™ (**OXOID, AG25, UK**), sumado a un sobre para generar dichas condiciones CampyGen™ (**OXOID, CN0025A, UK**) Tras la incubación se seleccionaron colonias que presenten características aparentes al género *Arcobacter* y se les analizaron mediante microscopía, tinción de Gram, para dar cumplimiento al objetivo 2 de la investigación.

- **Tinción de Gram.**

El análisis microscópico fue mediante morfología celular, luego de la confirmación microscópica, los aislados obtenidos fueron conservados en crioviales, mismos que contendrán caldo nutritivo y glicerol al 10%, y fueron congelados a -20 °C, para su posterior análisis molecular. (Ocampo, 2017)

- **Análisis molecular**

El análisis molecular fue obtenido por diferentes metodologías en las cuales destaca el PCR. Cada uno de los aislados conseguidos se les extrajo su ADN mediante el manejo de un método de aislamiento de ADN específico (**Thermo Scientific™, K0502, USA**).

La concentración del ADN se observó utilizando un micro-espectrofotómetro (**Thermo Scientific™**, **NanoDrop™),** para dar cumplimiento al objetivo 3 y 4 de la investigación.

La reacción de amplificación se ejecutó en un volumen final de 50 µl, conteniendo 45 µl de la mezcla y 5 µl de ADN molde. Los reactivos que se utilizaron para el análisis molecular fueron: Tampón Ultra Pure ™ DNA Typing Grade® 50X TAE Buffer (**INVITROGEN™**, **24710-030, USA**), dNTPs (**U151B, dNTP Mix, PROMEGA**), MgCl2 (**INVITROGEN™**, **Y02028b, USA**), Iniciadores, Taq polimerasa DreamTaq PCR Master Mix 2X (**Thermo Scientific™**, **K1071, USA**), más agua Mill Q. El método se realizó a partir de una solución de trabajo a base de agua Mill Q y adicionada los reactivos antes mencionados. Después se colocó 45ul de la solución de trabajo en un micro tubo eppendorf y adicionamos 5ul de ADN molde previamente extraído de los aislados confirmados; a continuación, procedimos a llevar la solución al termociclador (**Tc-3000, TECHNE, GERMANY**) y corremos los ciclos establecidos para la obtención de la PCR de *Arcobacter* que se establecieron previamente (Tabla 9).

Los productos generados se analizaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa (Agarose®) (**Thermo Scientific™**, **BP160-100, USA)** al 1.2%, preparado en tampón, con la adición de 5 µl de colorante SYBR® Safe DNA Gel Stain (**INVITROGEN™, S33102, USA)**, y se sometieron a 100 voltios durante 45 minutos para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados con la utilización de un marcador de pesos molecular 100pb BenchTop 100bp (**G829B, PROMEGA, USA**).

El ADN producto fue amplificado mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) utilizando un par cebadores que amplifican un fragmento de 1026-pb del gen 16S ARNr, los iniciadores utilizados fueron descritos por Figueras *et al*. (2012) cuyas secuencias se detallan a continuación:

CAH1am: 5’ - AACACATGCAAGTCGAACGA - 3’
CAH1b: 5’- TTAACCCAACATCTCACGAC - 3’

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 50 µl, conteniendo 45 µl de la mezcla y 5 µl de ADN molde. Los reactivos a utilizados para la PCR se presentan en la tabla 8.

Tabla 8.
Reactivos a utilizar PCR.

Reactivos	Concentración final
Tampón	1 X
dNTPs	0,2 mM/cada
$MgCl_2$	1,5 mM
Iniciadores	0,5 µM/cada
Taq polimerasa	5 U

El proceso de ampliación se ejecutó persiguiendo las circunstancias que se refieren en la tabla 9. Los productos formados se estudiaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, creado en tampón TAE 1 X, con la adición de 5 µl de RedSafe (**INVITROGEN™, S33102, USA**) y se expuso a 100 voltios durante 45 minutos. Par estimar el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados se utilizó un marcador de pesos molecular 100pb (**TrackIt® 100 bp DNA Ladder, INVITROGEN™**).

Finalmente, los fragmentos se visualizaron en un transiluminador (foto documentador) bajo luz ultravioleta (UV)

Tabla 9.

Condiciones para la PCR.

Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	Fases
1	94	2 minutos	Desnaturalización
30	94	30 segundos	Desnaturalización
	52	30 segundos	Unión de iniciadores
	72	90 segundos	Extensión
1	72	10 minutos	Extensión

4.2.6 Análisis de la sensibilidad antibiótica

Para el análisis de la susceptibilidad antibiótica se estudiaron los aislados obtenidos a dos antibióticos del grupo de las Quinolonas (Ciprofloxacino y Levofloxacino).

Para ambos antibióticos se utilizaron los métodos de difusión en disco (Kirby Bauer). El principio de este método es una expansión de la técnica de difusión en disco que permite, mediante lectura directa, determinar la susceptibilidad o resistencia de micoorganismos a estudiar. Para dar cumplimiento con el objetivo 5 de la investigación.

4.2.7 Preparación del inóculo y aplicación de los discos

Los aislados conseguidos fueron colocados en placas de *Arcobacter* agar + 5% de sangre de oveja desfibrilada, y se incubaron a 30-37 ºC según correspondió durante 48h en microaerofilia. A partir de esta siembra en fase de crecimiento, se preparó una suspensión en agua salina al 10% hasta conseguir turbidez de 0,5 en la escala McFarland (**HARDY DIAGNOSTICS, FU-10560, USA**). Posteriormente, por medio de un hisopo estéril, se realizó la siembra en placas de Muller-Hinton Agar (**Acumedia®, 7101A, USA**) de forma homogénea. A continuación, dejamos reposar el agar, y por medio de una pinza previamente esterilizada, los discos fueron colocados sobre la superficie del mismo. Para finalizar el método, las placas se mantuvieron en incubación bajo condiciones específicas (microaerofilia a 37 ºC), ya que con esta temperatura se obtuvo mejor conteo de colonias, entonces para el el análisis disco-placa se realizó con el mismo método durante 48 horas.

4.2.8 Lectura y análisis de las placas e interpretación de los resultados obtenidos para *Arcobacter spp.*

Se calcularon los diámetros de las franjas de inhibición de los discos, que corresponden a la zona inhibitoria. Ya que los géneros *Arcobacter* y *Campylobacter* corresponden a la misma familia, y que no preexisten criterios o puntos de corte aconsejados para *Arcobacter*, los resultados fueron dilucidados de acuerdo a los juicios instituidos para *Campylobacter* según el Clinical Laboratory and Standards Institute (**CLSI 2010, M45-A2**).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 DETECCIÓN DE *ARCOBACTER* EN MUESTRAS DE QUESOS

5.1.1 Aislamiento de *Arcobacter* mediante cultivo en placa.

Las muestras se recolectaron con una frecuencia de 10 quesos por semana en un periodo comprendido desde septiembre del 2018 hasta enero 2019, de acuerdo a lo establecido en el cronograma planteado, las muestras de quesos fueron obtenidas semanalmente en los lugares previamente codificados, para luego ser trasladadas de manera inmediata al laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Estatal de Bolívar para su procesamiento según la metodología seleccionada. (Anexo 2).

Los extraídos microbianos fueron sometidos al método establecido por Vicente-Martins *et al*. (2017) para el aislamiento de *Arcobacter spp.* y utilizando los tratamientos propuestos en la metodología (Tabla 5) se procedió al aislamiento de bacterias del género en estudio.

Los resultados obtenidos fueron muy claros y concluyentes para el primer objetivo planteado como se observan en la tabla 10; los tratamientos T1 y T3 no presentaron crecimiento mientras que T2 y T4 presentaron un satisfactorio crecimiento bacteriano y presencia de unidades formadoras de colonias con desarrollo significativo, creyendo que se debe a lo facultativo del patógeno en estudio, ya que las muestras cultivadas a 30 °C (T1 y T3) no tuvieron crecimiento significativo, mientras que las muestras cultivadas a 37 °C (T2 y T3) presentaron crecimiento significativo de una misma magnitud, dándonos así una prueba que la temperatura juega un papel fundamental en el creciente de *Arcobacter* ya que la presencia del medio CAT (cefoperazona–amphotericina–B-teicoplanina) como facilitador del crecimiento, no fue un factor significativo para el crecimiento del patógeno; a partir de esto se tomaron hasta 4 colonias con morfología característica de cada muestra.

Tabla 10.
Resultados de los tratamientos en estudio.

			Diseño factorial (2*2)							Diseño factorial (2*2)			
N°	Código	Lugar	T1 (A0B0)	T2 (A0B1)	T3 (A1B0)	T4 (A1B1)	N°	Código	Lugar	T1 (A0B0)	T2 (A0B1)	T3 (A1B0)	T4 (A1B1)
1	Q1	N	-	+	-	+	51	Q51	N	-	+	-	+
2	Q2	N	-	-	-	-	52	Q52	N	-	+	-	-
3	Q3	N	-	+	-	-	53	Q53	N	-	-	-	-
4	Q4	N	-	-	-	-	54	Q54	N	-	-	-	+
5	Q5	N	-	+	-	+	55	Q55	N	-	+	-	-
6	Q6	N	-	+	-	+	56	Q56	N	-	-	-	+
7	Q7	N	-	-	-	+	57	Q57	N	-	-	-	+
8	Q8	N	-	+	-	+	58	Q58	N	-	-	-	+
9	Q9	N	-	-	-	-	59	Q59	N	-	+	-	+
10	Q10	N	-	-	-	-	60	Q60	N	-	+	-	+
11	Q11	B	-	-	-	-	61	Q61	N	-	+	-	-
12	Q12	B	-	-	-	-	62	Q62	N	-	-	-	+
13	Q13	B	-	-	-	-	63	Q63	N	-	-	-	-
14	Q14	B	-	-	-	-	64	Q64	N	-	+	-	-
15	Q15	B	-	-	-	-	65	Q65	N	-	+	-	+
16	Q16	B	-	-	-	-	66	Q66	B	-	-	-	-
17	Q17	B	-	-	-	-	67	Q67	B	-	+	-	-
18	Q18	B	-	+	-	+	68	Q68	B	-	+	-	+
19	Q19	B	-	+	-	-	69	Q69	B	-	+	-	+
20	Q20	B	-	-	-	-	70	Q70	B	-	+	-	+
21	Q21	N	-	-	-	-	71	Q71	B	-	+	-	-
22	Q22	N	-	-	-	-	72	Q72	B	-	-	-	-
23	Q23	N	-	-	-	-	73	Q73	B	-	-	-	-
24	Q24	N	-	+	-	+	74	Q74	B	-	+	-	+
25	Q25	N	-	+	-	-	75	Q75	B	-	-	-	+

26	Q26	N	-	-	-	-	76	Q76	B	-	-	-	-
27	Q27	N	-	-	-	+	77	Q77	B	-	-	-	-
28	Q28	N	-	+	-	-	78	Q78	B	-	-	-	-
29	Q29	N	-	-	-	-	79	Q79	B	-	-	-	-
30	Q30	N	-	-	-	-	80	Q80	B	-	-	-	-
31	Q31	B	-	-	-	-	81	Q81	B	-	-	-	-
32	Q32	B	-	-	-	-	82	Q82	B	-	-	-	-
33	Q33	B	-	-	-	-	83	Q83	B	-	-	-	-
34	Q34	B	-	-	-	+	84	Q84	B	-	-	-	-
35	Q35	B	-	-	-	+	85	Q85	B	-	-	-	-
36	Q36	B	-	-	-	+	86	Q86	B	-	-	-	-
37	Q37	B	-	-	-	-	87	Q87	B	-	-	-	-
38	Q38	B	-	-	-	-	88	Q88	B	-	-	-	-
39	Q39	B	-	-	-	+	89	Q89	B	-	+	-	+
40	Q40	B	-	+	-	-	90	Q90	B	-	-	-	-
41	Q41	N	-	-	-	+	91	Q91	B	-	+	-	-
42	Q42	N	-	-	-	+	92	Q92	B	-	-	-	-
43	Q43	N	-	+	-	-	93	Q93	B	-	-	-	-
44	Q44	N	-	+	-	-	94	Q94	B	-	-	-	+
45	Q45	N	-	-	-	-	95	Q95	B	-	-	-	+
46	Q46	N	-	-	-	-	96	Q96	B	-	-	-	-
47	Q47	N	-	+	-	-	97	Q97	B	-	-	-	-
48	Q48	N	-	+	-	-	98	Q98	B	-	-	-	-
49	Q49	N	-	+	-	+	99	Q99	B	-	-	-	
50	Q50	N	-	+	-	+	100	Q100	B	-	-	-	-

En la tabla 11 se puede observar el conjunto de datos que componen las 100 muestra obtenidas de los mercados "Bellavista" y "10 de noviembre", junto al número de muestra, código, lugar, y cepas obtenidas.

Tabla 11.
Muestras de quesos frescos mercados municipales

Muestras de quesos frescos mercados municipales.						
			Cepas			
N°	**Código**	**Lugar**	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**
1	Q1	N	+	+	-	-
2	Q2	N	-	-	-	-
3	Q3	N	-	+	-	-
4	Q4	N				
5	Q5	N	+	+	+	-
6	Q6	N	+	+	-	-
7	Q7	N	+	-	-	-
8	Q8	N	-	-	-	+
9	Q9	N	-	-	-	-
10	Q10	N	-	-	-	-
11	Q11	B	-	-	-	-
12	Q12	B	-	-	-	-
13	Q13	B	-	-	-	-
14	Q14	B	-	-	-	-
15	Q15	B	-	-	-	-
16	Q16	B	-	-	-	-
17	Q17	B	-	-	-	-
18	Q18	B	+	+	-	-
19	Q19	B	-	+	-	-
20	Q20	B	-	-	-	-
21	Q21	N	-	-	-	-
22	Q22	N	-	-	-	-
23	Q23	N	-	-	-	-
24	Q24	N	+	+	-	-
25	Q25	N	-	+	-	-
26	Q26	N	-	-	-	-
27	Q27	N	+	-	-	-
28	Q28	N	-	+	-	-
29	Q29	N	-	-	-	-
30	Q30	N	-	-	-	-
31	Q31	B	-	-	-	-
32	Q32	B	-	-	-	-
33	Q33	B	-	-	-	-
34	Q34	B	+	-	-	-
35	Q35	B	+	-	-	-
36	Q36	B	+	-	-	-
37	Q37	B	-	-	-	-
38	Q38	B	-	-	-	-
39	Q39	B	+	-	-	-
40	Q40	B	-	+	-	-
41	Q41	N	+	-	-	-
42	Q42	N	+	-	-	-
43	Q43	N	-	+	-	-
44	Q44	N	-	+	-	-
45	Q45	N	-	-	-	-

46	Q46	N	-	-	-	-
47	Q47	N	-	+	-	-
48	Q48	N	-	+	-	-
49	Q49	N	+	+	-	-
50	Q50	N	+	+	-	-
51	Q51	N	+	+	-	-
52	Q52	N	-	+	-	-
53	Q53	N	-	-	-	-
54	Q54	N	+	-	-	-
55	Q55	N	-	-	-	-
56	Q56	N	+	-	-	-
57	Q57	N	+	-	-	-
58	Q58	N	+	-	-	-
59	Q59	N	+	+	+	-
60	Q60	N	+	+	-	-
61	Q61	N	-	+	-	-
62	Q62	N	+	-	-	-
63	Q63	N	-	-	-	-
64	Q64	N	-	-	-	+
65	Q65	N	-	+	+	-
66	Q66	B	-	-	-	-
67	Q67	B	-	+	-	-
68	Q68	B	+	+	-	-
69	Q69	B	+	+	-	-
70	Q70	B	+	+	-	-
71	Q71	B	-	+	-	-
72	Q72	B	-	-	-	-
73	Q73	B	-	-	-	-
74	Q74	B	+	+	+	-
75	Q75	B	-	-	-	-
76	Q76	B	-	-	-	-
77	Q77	B	-	-	-	-
78	Q78	B	-	-	-	-
79	Q79	B	-	-	-	-
80	Q80	B	-	-	-	-
81	Q81	B	-	-	-	-
82	Q82	B	-	-	-	-
83	Q83	B	-	-	-	-
84	Q84	B	-	-	-	-
85	Q85	B	-	-	-	-
86	Q86	B	-	-	-	-
87	Q87	B	-	-	-	-
88	Q88	B	-	-	-	-
89	Q89	B	+	+	-	-
90	Q90	B	-	-	-	-
91	Q91	B	-	+	-	-
92	Q92	B	-	-	-	-
93	Q93	B	-	-	-	-
94	Q94	B	+	-	-	-
95	Q95	B	+	+	-	-
96	Q96	B	-	-	-	-
97	Q97	B	-	-	-	-
98	Q98	B	-	-	-	-
99	Q99	B	-	-	-	-
100	Q100	B	-	-	-	-

B: Bellavista
N: 10 de noviembre
+: Positivo
-: Negativo

Tras un periodo de crecimiento selectivo, se aislaron 66 cepas de *Arcobacter* a partir de 47 de las 100 muestras de quesos analizadas. En total, 17 de las 50 muestras del mercado mayorista "Bellavista" (34%) y 30 de 50 muestras del mercado municipal "10 de noviembre" (60 %) manifestaron contaminación por *Arcobacter spp.*

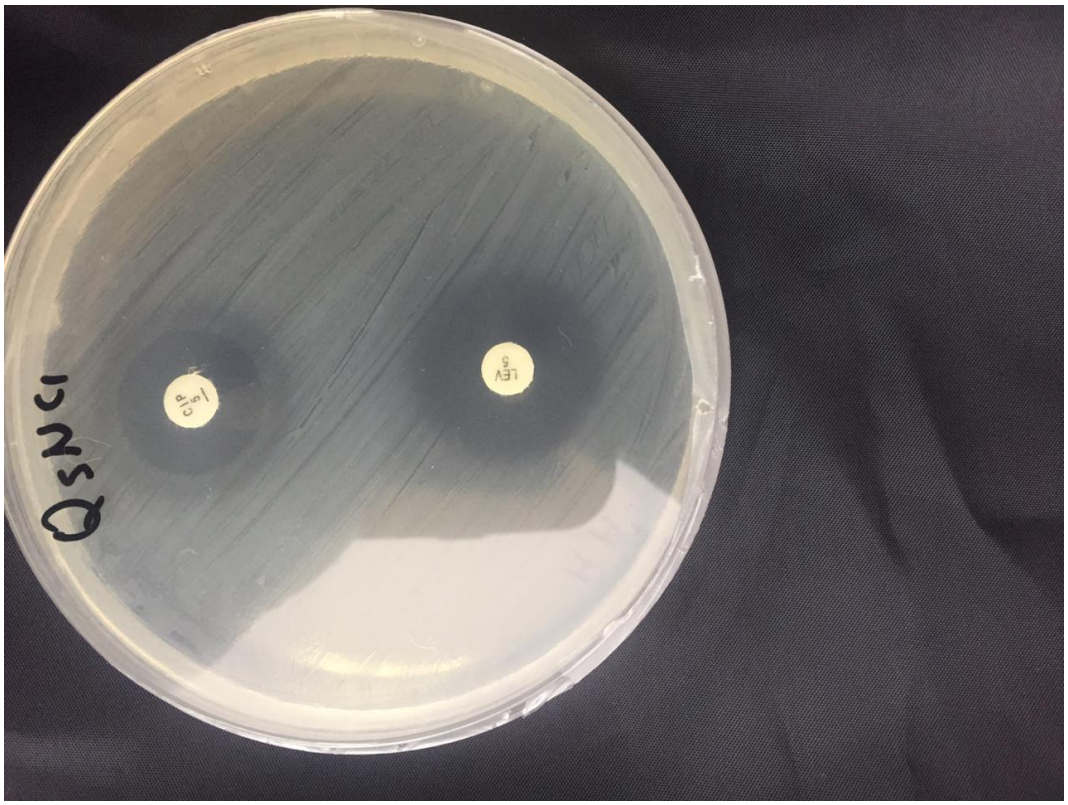


Tabla 12.
Detección por cultivo en muestras de quesos

Tipo de muestra	N° de muestras	N° de muestras positivas	Nº de aislados
Mercado Mayorista "Bellavista"	50	17	25
Mercado Municipal "10 de noviembre"	50	30	41
Total	100	47	66

La tabla 13 evidencia los resultados obtenidos del aislamiento de *Arcobacter* mediante cultivo en placa; en donde las muestras analizadas (100%) procedían de los mercados de la ciudad de Guaranda (B y N). De las 47 muestras positivas por cultivo, 34% pertenecían al mercado mayorista "Bellavista"; mientras que el 60% pertenecían al mercado minorista "10 De noviembre".

Tabla 13.
Procedencia y porcentajes de muestras de quesos positivas por muestras.

MERCADO	**Muestras positivas/número total de muestras**	**Porcentaje %**
Mercado Mayorista "Bellavista"	17/50	36
Mercado Municipal "10 de noviembre"	30/50	63
Total	47/100	100

En las figuras 4 y 5 podemos observar los aislados extraídos de los quesos provenientes de los mercados "Bellavista" y "10 de noviembre"; de un total de 100 muestras, se consiguieron 47 muestras (47%) de casos positivos para *Arcobacter* de este 47%; 17% procedieron del mercado "Bellavista": mientras que el 30% del mercado "10 de Noviembre"; lo que nos indica la mayor presencia de esta bacteria en este mercado.

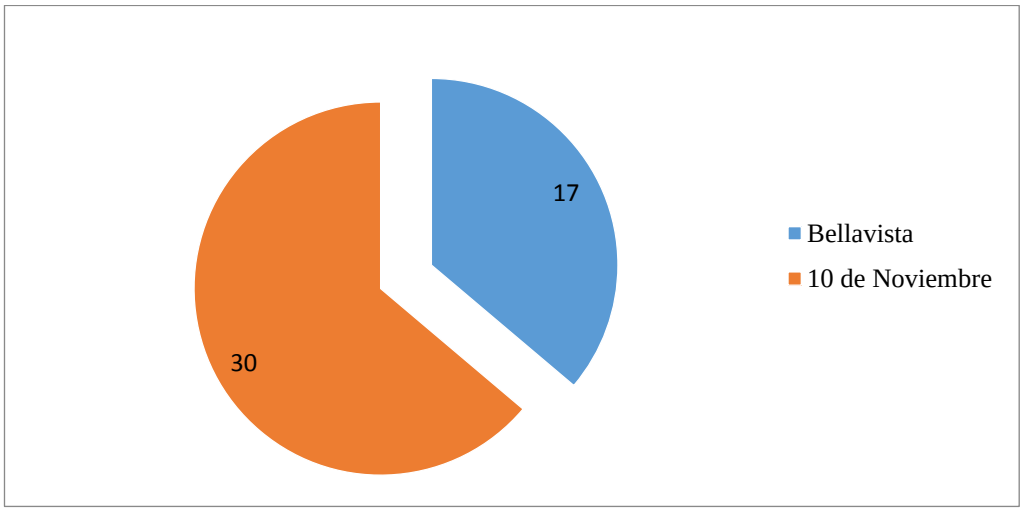


Figura 1.Aislados realizados a partir de quesos frescos en medio selectivo de Agar sangre.

En cuanto al cultivo se obtuvieron 66 aislados en total, obteniéndose 25 aislados de las muestras provenientes del mercado "Bellavista" (37 %); mientras que 41 aislados del mercado "10 de Noviembre" (64%).

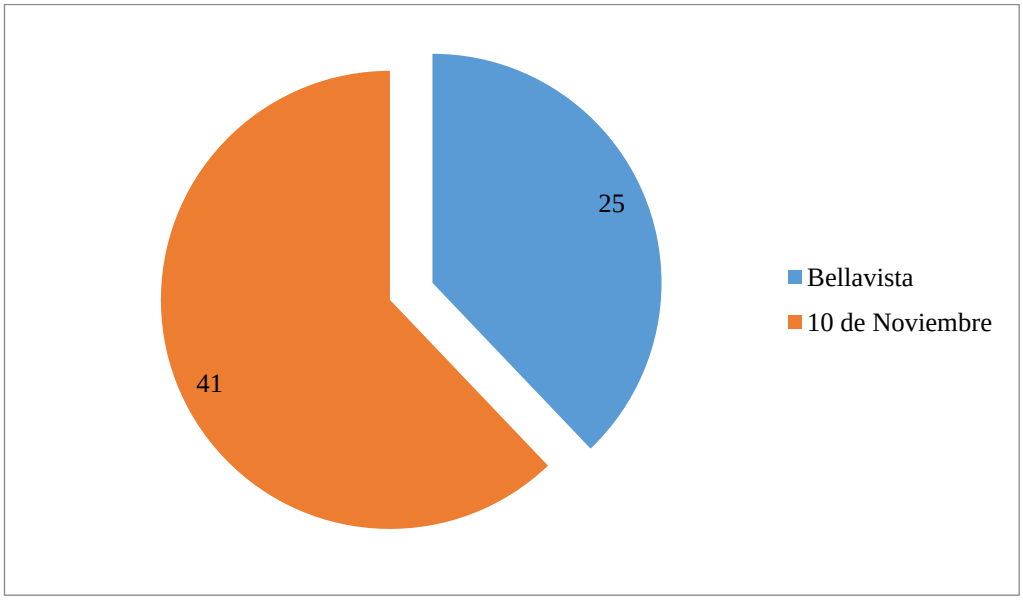


Figura 2.Muestras positivas para Arcobacter extraídas de quesos frescos en medio selectivo de Agar sangre.

5.1.2. Identificación microscópica de *Arcobacter.*

Se seleccionaron las colonias que presentaban la morfología característica de *Arcobacter*, con un color transparente y brillante, de una consistencia lisa.

Con las muestras fenotípicamente similares a *Arcobacter*, se procedió a realizar una tinción Gram, para corroborar que se trataba de bacilos Gram negativos, arqueados, en forma de espiral o coma, como se puede observar en la figura 8 (Sauca, 2018). Se obtuvieron un total de 66 aislados positivos microscópicamente: 25 del Mercado mayorista "Bellavista" y 41 del Mercado municipal "10 de Noviembre" como puede observarse en la tabla 12.

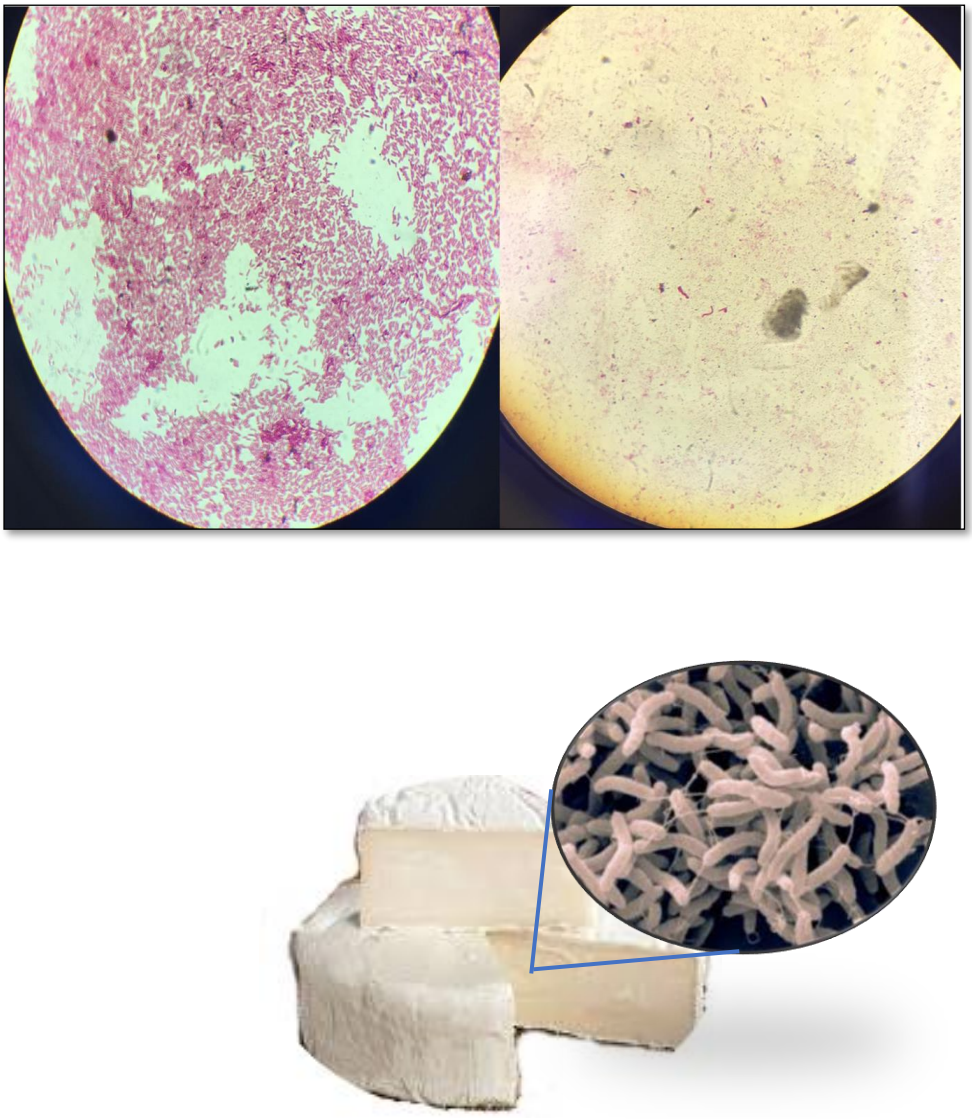


Figura 3.Microscopía de Arcobacter mediante tinción de Gram.

5.2. Extracción de ADN y análisis molecular.

Luego de confirmar los aislados positivos mediante técnicas microbiológicas y microscópicas, procedimos a la extracción de ADN del género en estudio con la finalidad de analizar su calidad, pureza y confirmarlo mediante el método de PCR, mediante un método de aislamiento de ADN específico para *Arcobacter*.

Para la extracción de ADN se emplearon los 66 aislados de quesos previamente obtenidos y supuestos positivos para *Arcobacter* mediante la técnica de tinción de Gram.

5.3. Concentración y calidad del ADN extraída.

5.3.1. Concentración de ADN mediante Micro-espectrofotometría.

Tabla 14.
Concentración de ADN determinado por el micro-espectrofotómetro

Aislados de *Arcobacter*		Nano Drop
N°	Código	ng/µL
1	Q1NC1	19.4
2	Q1NC2	7.8
3	Q3NC2	34.1
4	Q5NC1	54.7
5	Q5NC2	19.7
6	Q5NC3	21.2
7	Q6NC1	15.8
8	Q6NC2	9.1
9	Q7NC1	26.9
10	Q8NC4	32.4
11	Q8NC4	7.1
12	Q18BC1	25.9
13	Q18BC2	20.4
14	Q19BC2	15.5
15	Q23NC2	21
16	Q24NC1	8.2
17	Q24NC2	5.1
18	Q25NC2	20
19	Q27NC1	25.3
20	Q28NC2	5.4
21	Q34BC1	23.4
22	Q35BC1	6
23	Q36BC1	19.3
24	Q39BC1	24.4
25	Q40BC2	13.6
26	Q41NC1	17.8
27	Q42NC1	20
28	Q43NC2	14
29	Q44NC2	19.5
30	Q47NC2	11.8
31	Q48NC2	18.7
32	Q49NC2	16.5
33	Q50NC1	29.2
34	Q50NC2	21
35	Q51NC1	25.3
36	Q51NC2	22.8
37	Q52NC2	38.4
38	Q54NC1	20.9
39	Q56NC1	12.2
40	Q57NC1	24.1
41	Q58NC1	19.2
42	Q59NC1	15.8
43	Q59NC2	22.7
44	Q59NC3	25.4
45	Q60NC1	11.9
46	Q60NC2	18.4
47	Q61NC2	9.5
48	Q62NC1	8
49	Q64NC4	25.7
50	Q65NC2	18.2
51	Q65NC3	14.8
52	Q67BC2	22.2
53	Q67BC3	54.4
54	Q68BC1	2.9
55	Q68BC2	26
56	Q69BC1	8.8
57	Q69BC2	27.8
58	Q70BC1	11.7
59	Q70BC2	7.1
60	Q71BC2	31.1
61	Q74BC1	32.7
62	Q74BC2	33.1
63	Q74BC3	17.2
64	Q89BC1	198.3
65	Q89BC2	131.9
66	Q94BC1	93.5

Los resultados de la concentración exhiben resultados recomendados de no menos de 5 ng/µL para la concentración de ADN como lo describe Guamán, (2017), por lo que podemos enunciar que el ADN obtenido tiene una concentración óptima para realizar análisis molecular, siendo así resultados altamente satisfactorios.

Entre los 66 aislados a los que se les extrajo el ADN se obtuvieron distintas concentraciones de ADN, el valor más alto fue 198.3 ng/µL y el menor 5.1. ng/µL, emitiendo un promedio de 25,49 ng/µL; todos los resultados expuestos estuvieron en rango de valores de referencia.

5.3.2. Calidad de ADN mediante Electroforesis en Gel

La calidad del ADN fue analizada mediante un equipo de electroforesis horizontal en gel, para determinar la calidad del ADN extraído y determinar la trans iluminación de este en el gel de agarosa, el gel de agarosa se tiño con colorante. Para la realización de este método, se utilizó un marcador con 50 Pb para la electroforesis, en la figura 11 se observan los aislados de *Arcobacter* sometidos a electroforesis horizontal con gel, todas las muestras presentaron una transiluminación optima y visible.

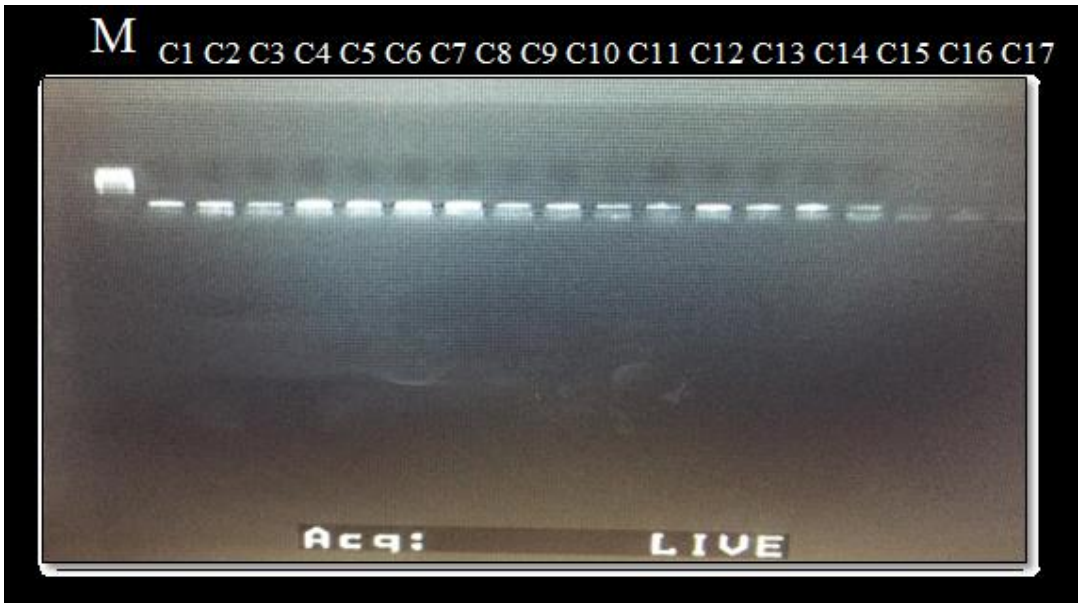


Figura 4.Electroforesis de aislados de *Arcobacter* con gel de Agarosa, *En donde M: es el marcador de peso molecular; C: son los carriles C1-C17: muestras de ADN.*

5.4. Análisis molecular

5.4.1. Detección de *Arcobacter* por el método de PCR (Polymerase Chain Reaction).

El ADN extraído de aislados de quesos fue analizado y amplificado mediante PCR manejando el método descrito (Bayas, 2016).

De las 66 muestras de aislados de quesos, 25 pertenecieron al mercado mayorista "Bellavista" y 41 al mercado municipal "10 de Noviembre", las que fueron sometidas a extracción de ADN y posteriormente al análisis por PCR.

El ADN de los aislados fue amplificado mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) manejando un par cebadores que amplifican un fragmento de 1026-pb del gen 16S ARNr, manejando los iniciadores descritos por Figueras *et al*. (2012).

Tras el análisis de PCR se obtuvo que los aislados pertenecieran al género *Arcobacter.*

Posteriormente, los fragmentos se observaron en un transiluminador, bajo luz ultravioleta (UV). Los resultados se observan en la figura 12.

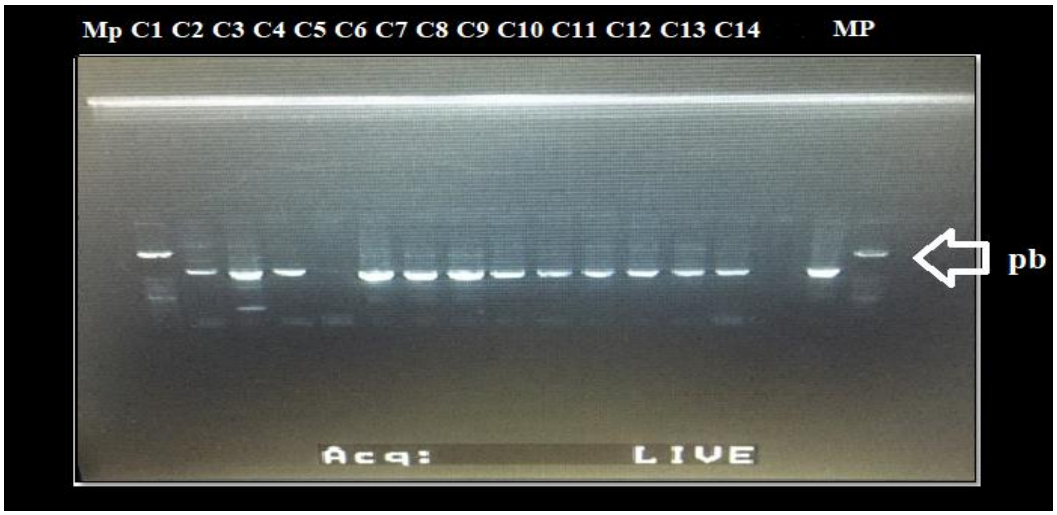


Figura 5.Electroforesis de los resultados del PCR de aislados de *Arcobacter* spp, MP: Marcador de peso molecular; C: distribución de carriles; pb: Pares de base.

Tabla 15.
ADN extraído de aislados de queso y analizado por PCR

Aislados N°	código	Nano Drop ng/L	PCR
1	Q1NC1	19.4	-
2	Q1NC2	7.8	-
3	Q3NC2	34.1	-
4	Q5NC1	54.7	+
5	Q5NC2	19.7	-
6	Q5NC3	21.2	-
7	Q6NC1	15.8	+
8	Q6NC2	9.1	+
9	Q7NC1	26.9	-
10	Q8NC4	32.4	+
11	Q8NC4	7.1	+
12	Q18BC1	25.9	-
13	Q18BC2	20.4	+
14	Q19BC2	15.5	+
15	Q23NC2	21	-
16	Q24NC1	8.2	-
17	Q24NC2	5.1	-
18	Q25NC2	20	-
19	Q27NC1	25.3	-
20	Q28NC2	5.4	-
21	Q34BC1	23.4	-
22	Q35BC1	6	-
23	Q36BC1	19.3	-
24	Q39BC1	24.4	-
25	Q40BC2	13.6	-
26	Q41NC1	17.8	-
27	Q42NC1	20	-
28	Q43NC2	14	+
29	Q44NC2	19.5	+
30	Q47NC2	11.8	-
31	Q48NC2	18.7	+
32	Q49NC2	16.5	+
33	Q50NC1	29.2	-
34	Q50NC2	21	-
35	Q51NC1	25.3	-
36	Q51NC2	22.8	+
37	Q52NC2	38.4	-
38	Q54NC1	20.9	+
39	Q56NC1	12.2	-
40	Q57NC1	24.1	+
41	Q58NC1	19.2	+
42	Q59NC1	15.8	+
43	Q59NC2	22.7	+
44	Q59NC3	25.4	+
45	Q60NC1	11.9	+
46	Q60NC2	18.4	+
47	Q61NC2	9.5	+
48	Q62NC1	8	+
49	Q64NC4	25.7	-
50	Q65NC2	18.2	-
51	Q65NC3	14.8	-
52	Q67BC2	22.2	-
53	Q67BC3	54.4	-
54	Q68BC1	2.9	-
55	Q68BC2	26	-
56	Q69BC1	8.8	-
57	Q69BC2	27.8	-
58	Q70BC1	11.7	-
59	Q70BC2	7.1	-
60	Q71BC2	31.1	+
61	Q74BC1	32.7	+
62	Q74BC2	33.1	-
63	Q74BC3	17.2	-
64	Q89BC1	198.3	+
65	Q89BC2	131.9	-
66	Q94BC1	93.5	+

De los 66 aislados de quesos obtenidos por cultivo, 26 fueron positivos para *Arcobacter* mediante a prueba de PCR, 20 procedieron del mercado municipal “10 de Noviembre” y 6 del mercado mayorista “Bellavista” como se observa en la tabla 15. En número de muestras positivas para *Arcobacter* mediante PCR fueron de 26.

Tabla 16.
Tabla de frecuencias y porcentajes para casos positivos de PCR

Positivos PCR	Frecuencia	%
Bellavista	6	23,1
10 de Noviembre	20	76,9
Total	26	100,0

En la tabla 16 podemos observar las frecuencias y porcentajes de casos positivos para PCR, en donde se encontraron 26 casos positivos; conformados por 6/26 (23,1%) casos presentes en el mercado "Bellavista", mientras que 20/26 (76,9%) fueron encontrados en el mercado "10 de Noviembre".

Como podemos darnos cuenta en los resultados, se ratificó un mayor número de casos positivos para la bacteria en estudio en el mercado "10 de Noviembre" en comparación con el mercado "Bellavista"; varios factores juegan un papel fundamental en este hallazgo, el transporte, la cadena de frío y el lugar del almacenamiento con una higiene deficiente llevan a esta contaminación, y podemos enunciar que existe un mejor manejo sanitario de quesos frescos en el mercado "Bellavista" que en su homologo "10 de Noviembre"

5.5. Análisis actividad Antimicrobiana de Levofloxacino y Ciprofloxacino sobre las cepas obtenidas.

La interpretación de los resultados se realizó utilizando las recomendaciones del comité Europeo de Pruebas de susceptibilidad según el (EUCAST, 2017) y el Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2017) utilizando los puntos de corte para *Campylobacter* spp. Y *enterobacterias* ya que en la actualidad no se han desarrollado puntos de corte estandarizados para la de susceptibilidad del género *Arcobacter spp.*

En la tabla 17 se observan los parámetros de la zona inhibitoria que se tomó como referencia.

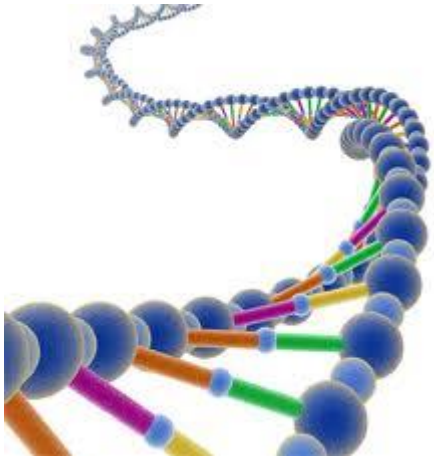


Tabla 17.
Concentración mínima inhibitoria de la susceptibilidad de Arcobacter.

Interpretación	Difusión de disco(mm)					
	≤6	7-12.	13-15	16-19	20-23	≥24
Guía CLSI		R	I		S	
Guía EUCAST			R			S
Guía Planteada (Cip y Lev)		R		I		S

R: Resistente.
I: Intermedio.
S: Susceptible

A partir de las cepas demostradas positivas para *Arcobacter spp.* Por medio de PCR, se efectuó el antibiograma manejando la técnica de Difusión disco-placa (Kirby-Bauer) en medio de cultivo Mueller-Hinton con el uso de ciprofloxacina con una concentración de 5 µg y con una concentración de 5 µg.

Tabla 18.
Tabla de actividad antimicrobiana de levofloxacino y ciprofloxacino frente a aislados de Arcobacter spp.

Tabla aislados *Arcobacter* spp							
		Nano Drop	PCR	Antibiograma			
N°	Codigo	ng/L		Levofloxacino	Susceptibilidad *Arcobacter*	Ciprofloxacino	Susceptibilidad *Arcobacter*
1	Q5NC1	54,7	+	16	I	13	I
2	Q6NC1	15,8	+	14	I	12	R
3	Q6NC2	9,1	+	17	I	14	I
4	Q8NC4	32,4	+	16	I	19	I
5	Q8NC4	7,1	+	19	I	20	S
6	Q18BC2	20,4	+	8	R	2	R
7	Q19BC2	15,5	+	6	R	2	R

8	Q27NC1	25,3	+	18	I	19	I
9	Q43NC2	14	+	16	I	20	S
10	Q44NC2	19,5	+	13	I	9	R
11	Q49NC2	16,5	+	14	I	12	R
12	Q51NC2	22,8	+	25	S	24	S
13	Q54NC1	20,9	+	19	I	20	S
14	Q57NC1	24,1	+	18	I	20	S
15	Q58NC1	19,2	+	18	I	17	I
16	Q59NC1	15,8	+	19	I	18	I
17	Q59NC2	22,7	+	22	S	20	S
18	Q59NC3	25,4	+	21	S	20	S
19	Q60NC1	11,9	+	16	I	19	I
20	Q60NC2	18,4	+	17	I	19	I
21	Q61NC2	9,5	+	19	I	20	S
22	Q62NC1	8	+	18	I	19	I
23	Q71BC2	31,1	+	14	I	11	R
24	Q74BC1	32,7	+	20	S	19	I
25	Q89BC1	198,3	+	18	I	24	S
26	Q94BC1	93,5	+	23	S	24	S

R: Resistente.
I: Intermedio.
S: Susceptible
+: Positivo
Q: Quesos
B: "Bellavista"
N: "10 de Noviembre"
C: Cepas

La actividad antimicrobiana de Levofloxacino y Ciprofloxacino frente a aislados de *Arcobacter spp*, así como su capacidad de resistencia y susceptibilidad a dichos antibioticos se puede ver en la tabla 18, sobresalidos, con tonalidad amarilla se encuentran las muestras (2,6,7,10,23) que presentaron resistencia a los fármacos en estudio.

Podemos ver que 5 muestras exhibieron resistencia a los antibioticos en estudio; para la muestra 2 (Q6NC1) presentó una resistencia intermedia a Levofloxacino, mientras que para Ciprofloxacino exhibió resistencia, esto sucedió también para las muestras 10 (Q44NC2) y 23 (Q71BC2); en el caso de las muestras 6 (Q18BC2) y 7 (Q19BC2), se observó resistencia a los dos fármacos en estudio por lo que podemos expresar que estos aislados son resistentes a fármacos, por lo que sería recomendable realizar estudios con estas cepas en específico con la finalidad de

determinar la autenticidad de su resistencia y especificar que especie de *Arcobacter* es para así poder colaborar y comparar los resultados obtenidos.

Tabla 18.
Tabla de frecuencias y porcentajes acerca de la susceptibilidad antimicrobiana de levofloxacino frente a aislados de Arcobacter spp.

Actividad Antimicrobiana	Frecuencia	%
Resistente (R)	2	7,69
Intermedio (I)	19	73,08
Suceptible (S)	5	19,23
TOTAL	26	100,00

En la tabla 18 se presentan la frecuencias y porcentajes acerca de la susceptibilidad antimicrobiana de Levofloxacino frente a aislados de *Arcobacter spp*; en total se pudieron obtener 26 aislados de *Arcobacter spp*, de los cuales 2/26 resultaron ser resistentes a la bacteria, conformando el 7,69%; 19/26 casos resultaron intermedios para *Arcobacter*, siendo estos el 73,08%; finalmente 5/26 casos resultaron ser susceptibles formando el 19,23% restante.

Tabla 19.
Tabla de frecuencias y porcentajes acerca de la susceptibilidad antimicrobiana de Ciprofloxacino frente a aislados de Arcobacter spp.

Actividad Antimicrobiana	Frecuencia	%
Resistente (R)	6	23,08
Intermedio (I)	10	38,46
Suceptible (S)	10	38,46
Total	26	100,00

En la tabla 19 se presentan la frecuencias y porcentajes acerca de la susceptibilidad antimicrobiana de Ciprofloxacino frente a aislados de *Arcobacter* spp; en total se pudieron obtener 26 aislados de *Arcobacter* spp, de los cuales 6/26 resultaron ser resistentes a la bacteria, conformando el 23,08%; 10/26 casos resultaron

intermedios para *Arcobacter*, siendo estos el 38,46%; finalmente 10/26 casos resultaron ser susceptibles formando el 38,46% restante.

DISCUSIÓN

Arcobacter es un patógeno emergente que amenaza la seguridad alimentaria: aún se desconocen aspectos importantes sobre su epidemiología y, a pesar de que cada día hay más trabajos encaminados a descubrir su aparición en alimentos, el riesgo existente de inoculación a través de la cadena alimentaria está lejos de conocerse. Yesilmen *et al.* (2014) señala que el género *Arcobacter* podrían transmitirse a los humanos a través del consumo y manejo de alimentos crudos o poco cocinados de origen animal

El presente trabajo se encuadra en este contexto. Así pues, nuestro objetivo fue ayudar al conocimiento sobre la prevalencia de este género en alimentos, en este caso de quesos frescos, que puedan suponer un especial riesgo para el consumidor y su presencia en los dos mercados más importantes de la cuidad de Guaranda. Calvo *et al.* (2013), Demuestra que el género *Arcobacter* ha sido aislado a partir de ganado bovinos, cerdos, ovejas, cabras, y aves, así como en abortos de cerdos y bovinos, productos cárnicos, moluscos, leche y quesos, además expresa que las especies pertenecientes al género *Arcobacter* no son parte natural de la flora intestinal y el ser humano puede contagiarse de este patógeno en alimentos de origen animal o en agua, entre otras vías de transmisión que aún no están bien determinadas.

El estudio fue realizado en seis etapas: La primera de ellas consistió en la toma de muestras de quesos en los mercados Bellavista y 10 de Noviembre, con una frecuencia de 5 quesos por semana en un periodo de 5 meses, desde septiembre del 2018 hasta enero de 2019; en la segunda etapa se buscó aislar cepas de *Arcobacter*, en la que se aplicaron fuerzas mecánicas de aplastamiento y agitación de la muestra para así, extraer las muestras de la bacteria en estudio para el respectivo análisis, a partir de las muestras que resultaron positivas tomadas de los mercados previamente mencionados. La tercera etapa consistió en la comprobación de género de *Arcobacter*, esto se llevó a cabo a través de pruebas de tinción de Gram a los

aislados de *Arcobacter*, electro bioquímica y microscopia; además de Micro-espectrofotometría. La cuarta etapa comprendió la extracción de ADN, mediante un metodo de aislamiento de ADN específico para *Arcobacter spp*, con la finalidad de analizar calidad y pureza del mismo, La quinta etapa se llevó a cabo un proceso de PCR para la ampliación del ADN obtenido. La sexta etapa se dedicó completamente al análisis antimicrobiano la cual consistió en el estudio de los niveles de resistencias de los aislados obtenidos a dos fluoroquinolonas, levofloxacino y ciprofloxacino, agentes de elección en el tratamiento de las infecciones por *Arcobacter*.

Los resultados de esta investigación expusieron que el cultivo en medio selectivo *Arcobacter* Agar suplementado con 5 % de sangre de oveja (*Arcobacter* Agar Sangre) fue un método satisfactorio para la detección del patógeno, ya que permitió el desarrollo del microorganismo en un nivel significativo.

En este trabajo, el 47 % de las muestras de quesos fueron positivas para *Arcobacter*. De ellas se obtuvieron 66 aislados, 25 provenientes del mercado Bellavista y 41 provenientes del mercado 10 de Noviembre. La investigación realizada por Yesilmen *et al.* (2014), en leche de vaca, leche de búfalo y queso fresco mostró una elevada prevalencia de estas bacterias con porcentajes del 36%, 48% y 56% respectivamente, siendo interesante el aislamiento de 8 especies de *Arcobacter* diferentes, de las cuales la más prevalente en muestras de leche de vaca fue A. *butzleri* con un 38.8%. Scarano et al., (2014), mostró que 7 de 32 muestras (21.9%) de queso ricotta resultaron positivos para *Arcobacter butzleri* por examinación de cultivo; todas las muestras positivas fueron recolectadas el mismo día y provinieron de la misma fábrica de queso.

Las investigaciones con respecto a la contaminación con patógenos del género *Arcobacter* son escasas, así que no podemos afirmar que las diferenciaciones entre las normas de contaminación y prevalencia varié entre países. Dado que no se cuenta con un protocolo estandarizado, podrían deberse al medio de cultivo empleado y al procedimiento elegido para el aislamiento (Merga *et al.*, 2011)

En nuestro estudio, *Arcobacter* spp. fue detectada por cultivo en el 17% de las muestras provenientes del mercado Bellavista y el 30% de las muestras provenientes del mercado 10 de Noviembre. Giacometti *et al*. (2015). Aislaron 29 muestras (49.5%), de las cuales 22 fueron obtenidas de muestras de leche cruda (10%), queso mozzarella (75%), y queso ricotta (15%).

En el ámbito de almacenamiento, es importante considerar que los quesos contaminados con *Arcobacter* que procedente de un solo lugar es suficiente para contaminar todo el almacenamiento del producto Scullion *et al.* (2006). Por lo que podemos relacionar los resultados obtenidos de muestras de quesos frescos descendientes de mercados de la localidad y podemos enunciar que las medidas sanitarias de almacenamiento, transporte y distribución juegan un papel fundamental en la contaminación de quesos con dicho patógeno.

En el presente estudio seleccionamos dos sitios de donde generalmente proviene la mayoría de quesos consumidos por la población de la cuidad de Guaranda. La detección de *Arcobacter* por cultivo en ellas fue del 36%, 17/50 muestras provenientes del mercado Bellavista. Mientras que el 63%, 30/50 muestras provinieron del mercado 10 de Noviembre, resultaron estar contaminados.

De las 17 muestras positivas provenientes del mercado Bellavista se obtuvieron 25 aislados de *Arcobacter*, Mientras que de las 30 muestras positivas provenientes del mercado 10 de Noviembre se lograron aislar 41 aislados de *Arcobacter*. Este es el primer trabajo en el que se ha logrado aislar *Arcobacter* a partir de muestras de queso provenientes de dichos mercados. Así como, es la primera vez que se trabaja con este patógeno en el Ecuador, dado esto no hay más información bibliográfica sobre el aislamiento de *Arcobacter* en muestras de quesos, no se han podido obtener más datos comparativos.

En el caso de los aislados obtenidos, las tasas de detección por PCR se desenvolvió de la siguiente manera: 26 fueron positivos para *Arcobacter* mediante la prueba de PCR, 20 procedieron del mercado municipal “10 de Noviembre” y 6 del mercado mayorista “Bellavista”, lo que confirma que un paso de enriquecimiento incrementa el nivel de células viables, permitiendo una mayor sensibilidad de detección

también en este tipo de muestras. Nuestro resultado es similar al compararlo con el obtenido por Giacometti *et al.,* (2013) en el que indica que fueron recolectadas en una fábrica de queso artesanal en 4 ocasiones en un periodo entendido de octubre hasta diciembre de 2012, las muestras que comprendían queso ricota, queso mozzarella y leche cruda. Los aislados de dichas muestras fueron sometidos a PCR múltiplex y reconocidos mediante electroforesis (PFGE). A. *butzleri* fue positiva en 29 de las 59 muestras (46.6%). Estos datos son bastante parejos a los obtenidos en nuestro trabajo, con una tasa detección de los 26 casos en este tipo de muestra.

La sexta y final etapa de este estudio se formuló en analizar la sensibilidad antibiótica de cada uno de los aislados a las fluoroquinolonas, que son los fármacos de primera línea para el tratamiento de la contaminación por *Arcobacter* en humanos (Houf *et al.,* 2004; Vandenberg *et al.,* 2006).

La mayor parte de aislados de quesos conseguidos de los principales mercados de la cuidad previamente identificados como *Arcobacter*, fueron susceptibles a ambas fluoroquinolonas (levofloxacino y ciprofloxacino).

En este trabajo, se examinó la susceptibilidad antimicrobiana de Levofloxacino frente a aislados de *Arcobacter* spp, en donde 26 aislados se tomaron en cuenta, donde 2/26 (7,69%) resultaron resistentes a este fármaco, 19/26 (73,08%) resultaron tener una resistencia intermedia, mientras que 5/26 (19,23%) reflejaron ser susceptibles. Cabe mencionar que no se encontraron estudios de actividad antimicrobiana de bacterias del género *Arcobacter* con Levofloxacino pero como pertenecen a la misma familia que Ciprofloxacino (Fluoroquinolonas) los resultados se pueden relacionar.

Además, también se analizó la susceptibilidad antimicrobiana de Ciprofloxacino frente a aislados de *Arcobacter* spp, en donde se estudiaron los 26 aislados donde 6/26 (23,08%) resultaron resistentes a este fármaco, 10/26 (38,46%) resultaron poseer una resistencia intermedia, mientras que 10/26 (38,46%) resultaron ser susceptibles al fármaco en estudio. Sauca, (2018), obtuvo resultados de susceptibilidad antimicrobiana que mostraron resistencia a: ácido nalidixico 100%, tetraciclina 77.78%, ampicilina 44,45%, Ciprofloxacino 44,45%, eritromicina

33,33% mientras que para gentamicina presento 100% de susceptibilidad. Por lo que observamos que el porcentaje de susceptibilidad del fármaco con el patógeno está relacionado con los obtenidos por Sauca, (2018).

Los resultados y el hallazgo de *Arcobacter* en este estudio derivados de quesos frescos que se distribuyen en toda la ciudad, hace incrementar la preocupación en la salud pública, ya que escaso conocimiento acerca del potencial patogénico del género *Arcobacter* y su presencia en alimentos, los pocos estudios que se han realizado demuestran la presencia de este género en una gran variedad de alimentos de consumo humano, por lo que existe un riesgo potencial para el consumidor.

VI. COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS.

Por medio del análisis estadístico ejecutado sobre los resultados obtenidos en la presente investigación y de las variables planteadas, y mediante el análisis de comprobación de hipótesis de chi-cuadrado de Pearson se obtuvieron resultados que indican la presencia de evidencia estadística significativa al 95% para admitir la hipótesis alternativa y refutar la hipótesis nula, el límite de la prueba para admitir la hipótesis nula para 18 grados de libertad fue de 28,86 mientras que nuestro resultado fue de 29,58 lo que nos muestra que no está contenida dentro del rango de la hipótesis nula, por lo que aceptamos la hipótesis alternativa, la cual nos indica que "A partir de quesos frescos se pudo medir el efecto inhibidor por parte de la fluoroquinolona a bacterias del género *Arcobacter*, el cual disminuyó su capacidad de desarrollo evolutivo."

$\mathbf{H_0}$: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$

$\mathbf{H_1}$: $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4$ *

Tabla 20.
Tabla de prueba de Hipótesis Chi- cuadrado.

Prueba de Chi-Cuadrado			
	Valor	G.L	Sig. (2-caras)
Pearson Chi-cuadrado	29,587[a]	18	,169
	32,074	18	,047
Casos validos	66		

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 Conclusiones

- Se aislaron 66 cepas del género *Arcobacter* de quesos de consumo procedentes de los principales mercados de la Ciudad de Guaranda, de las cuales 25 cepas de las muestras provinieron del mercado mayorista "Bellavista"; mientras que 41 cepas se obtuvieron del Mercado municipal "10 de Noviembre".

- Se identificaron colonias del género *Arcobacter* mediante métodos bioquímicos y microscópicos, por medio de sedimentos microbianos, los resultados conseguidos fueron concisos mostrando un satisfactorio crecimiento bacteriano que nos indicó de la presencia de bacterias del género *Arcobacter.*

- De las 66 muestras de aislados de quesos, a las cuales se les extrajo su ADN, 26 resultaron positivos para *Arcobacter* por medio de la prueba de PCR, 20 provinieron del mercado municipal "10 de Noviembre" y 6 del mercado mayorista "Bellavista".

- Se estudió la susceptibilidad a fluoroquinolonas de género *Arcobacter* aislados a partir de quesos frescos conseguidos en los mercados municipales de Guaranda, de los cuales, 2/26 casos, reflejaron ser resistentes a la bacteria en estudio, conformando el 7,69%; 19/26 casos manifestaron una resistencia intermedia para *Arcobacter*, siendo estos el 73,08%; finalmente 5/26 casos reflejaron ser susceptibles constituyendo el 19,23% restante.

7.2. Recomendaciones.

- El control sanitario en los mercados de la ciudad debería ser más riguroso con el fin de evitar contaminación de los productos de consumo humano que son distribuidos en toda la ciudad

- La implementación de un plan de higiene de los alimentos distribuidos en los mercados debería estar entre las prioridades de Gobierno Autónomo Descentralizado del cantón Guaranda, para asegurar la inocuidad de los alimentos.

- Continuar con la investigación de *Arcobacter*, e identificar el tipo específico de especie de *Arcobacter* que está presente en quesos de la ciudad mediante la técnica de Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), para así poder realizar una clasificación taxonómica completa de este género.

- Realizar investigaciones en otros alimentos de consumo humano, como es el caso de mariscos, moluscos y alimentos provenientes del mar para determinar la presencia de este género en dichos alimentos y realizar comparaciones con otras investigaciones.

- Probar alternativas para probar la actividad antimicrobiana de *Arcobacter*, no solo con fármacos, sino que se podría realizar con terapias alternativas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alava, S; Ibarra, A. (2014). "resistencia bacteriana a los antimicrobianos en hemocultivos realizados en el hospital «dr. Julio villacreses colmont» de solca - portoviejo en el periodo mayo – octubre del 2013" (en línea). S.l., universidad técnica de manabí. 10-11 p. Disponible en http://repositorio.utm.edu.ec/bitstream/123456789/336/1/tesis resistencia bacteriana.pdf.

2. Alfaro, M; Hurtarte, A; Valle, R. (2014). Implementación de un manual de ordeño higiénico en establecimientos lecheros y evaluación de su efecti vidad mediante análisis microbiológico en el departamento de sonso nate, el salvador. (en línea). S.l., universidad de el salvador. 9-10 p. Disponible en http://ri.ues.edu.sv/5990/1/13101559 %282%29.pdf.

3. Almenar, l. (2015). Determinación de la calidad higiénico-sanitaria y relación con la presencia de patógenos en moluscos bivalvos (en línea). S.l., universitat politècnica de valència. 17-18 p. Disponible en https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/39972/tfg laura almenar rivilla v.2.pdf?sequence=1.

4. Álvarez, D; Garza, G; Vázquez, R. (2015). Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia (en línea). Revista chilena de infectología 32(5):1-2. Doi: https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182015000600002.

5. Arcos, M; Ávila, S; Estupiñán, S; Gómez, A. (2005). Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua (en línea). Nova 3(4):1-11. Doi: https://doi.org/10.22490/24629448.338.

6. Arias, J. (2015). Elaboración de un manual de buenas prácticas de manufactura (bpm) en la empresa de productos lácteos "leito" sector rumipamb a la universidad, cantón salcedo, provincia cotopaxi (en línea). S.l., universidad técnica de cot opaxi. 24-25 p. Disponible en http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/2650/1/t-utc-00186.pdf.

7. Barrientos, M. (2006). “estudio cualitativo de las quinilonas y fluoroquinolonas importadas y autorizadas para su uso y disposición en medicina y en veterinaria en chile, en el período 2002-2005. :122.

8. Bayas, I. (2016). Aportaciones a la epidemiología de *Arcobacter* y helicobacter spp.: aplicación de métodos moleculares a su detección e identificación en alimentos (en línea). S.l., universidad politecnica de valencia. 43-44 p. Disponible en https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/75087/bayas - aportaciones a la epidemiología de *Arcobacter* y helicobacter spp.%3a aplicación de métodos ....pdf?sequence=1%0ahttps://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/75087/bayas - aportaciones a la epidemi.

9. Bayas, I; Gonzalez, A; Ferrús, M. (2016). Detección e identificación de *Arcobacter* spp. y *Helicobacter pylori* en alimentos mediante métodos convencionales y moleculares. IV Congress of science technology, innovation and entrepreneurship. Bolívar-Ecuador. 16- 18 de Noviembre de 2016

10. Campos, J. (2014). Estudio higiénico-sanitario de comedores escolares de la isla de tenerife (en línea). S.l., universidad de la laguna. 40-41 p. Disponible en ftp://tesis.bbtk.ull.es/ccppytec/cp119.pdf.

11. Chavez, P. (2010). Condiciones higiénico sanitarias de los comedores públicos del mercado municipal bella vista de la ciudad de guaranda, provincia de bolívar. Propuesta de un programa educativo (en línea). S.l., escuela superior politecnica de chimborazo. 33-34 p. Disponible en http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/1684/1/84t00049.pdf.

12. Collado, L; Figueras, M. (2012). Higher water temperature and incubation under aerobic and microaerobic conditions increase the recovery and diversity of *Arcobacter* spp. From shellfish (en línea). S.l., universidad austral de chile. 385-391 p. Doi: https://doi.org/10.1128/aem.03014-13.

13. CLSI. Preformance Standards for antimicrobial Suceptibility Testing 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne-Pennsylvania.

14. El telégrafo. (2018). La producción lechera en ecuador genera $ 1.600 millones en ventas anuales (infografía) (en línea, sitio web). Disponible en https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/ economia/8/la-produccion-lechera-en-ecuador-genera-1-600-millones-en- ventas-anuales-infografia.

15. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Data from the EUCAST MIC EUCAST breakpoints, ultimo acceso Jueves 25 de Julio 2019

16. FAO. (2018). Dairy market review (en línea). S.l., s.e. 1-2 p. Disponible en http://www.fao.org/3/i9210en/i9210en.pdf.

17. FAO; OPS. (2017). Panorama de la seguridad alimentaria y nutricional (en línea). S.l., s.e. 1-174 p. Disponible en http://www.fao.org/3/a-i6747s.pdf.

18. Gobierno Autónomo Descentralizado del Cantón Guaranda. 2019. Mapa Político del cantón. Recuperado de: http://www.guaranda.gob.ec/newsiteCMT/

19. García, D. (2000). Presencia de bacterias coliformes en quesos frescos de leche de vaca en diferentes fases de produccion elaborados artesanalmente en el municipio de san jose p (en línea). S.l., universidad de san carlos de guatemala . 5-6 p. Disponible en http://www.repositorio.usac.edu.gt/5466/1/tesis med. Dora b garcía mater.pdf.

20. García, A.; Méndez, C; Elton-Puente, E; Abrego, R; Castillo, M; Rodríguez, F. (2015) Determinación de la calidad microbiológica de productos lacteos elaborados en una institución de educación superior. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro México. 25-28 pp.

21. Guamán, J. (2017). Implementación de un método de extracción de ADN

bacteriano para la detección de *Helicobacter pylori* en muestras de heces humanas. (Tesis de Posgrado). Universidad De Guayaquil. Guayaquil – Ecuador 35-36pp

22. Huamán, C. (2013). Determinación de listeria spp. En queso fresco artesanal del centro poblado de ccerabamba (en línea). S.l., universidad nacional del callao. 20-21 p. Disponible en http://repositorio.unac.edu.pe/bitstream/handle/unac/430/césar_tesis_título profesional_2013.pdf?sequence=1&isallowed=y.

23. Houf, K. Devriese, A. De Zutter, L. Van Hoof, J & Vandamme, P . (2001). Development of a new protocol for the isolation and quantification of *Arcobacter* species from poultry products. Int. J. Food Microbiol. **71**:189–196.

24. Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI). (2019). Red de Estaciones Meteorológicas e hidrológicas. Quito, Ecuador. Recuperado de https://abeltran94.wixsite.com/inamhi

25. Jara, M. (2006). Especies del género campylobacter y del género *Arcobacter* en muestras de deposiciones humanas y animales (en línea). Universidad austral de chile, facultad de ciencias 3:1-23. Disponible en http://www.ncbi.nlm.nih.gov.myaccess.library.utoronto.ca/pubmed/11720961.

26. Jiménez, A; Calderón, Á; Gómez, E; Altuna, J. (2016). Situación de la producción lechera en bolívar. Parroquia salinas, guaranda. Status of milk production in bolivar. Parish salinas, guaranda. Jiménez (en línea). 6(1):2-3. Disponible en http://www.ijastnet.com/journals/vol_6_no_1_ february_2016/2.pdf.

27. Jimenez, V. (2012). Especial microbiología industrial y biotecnología microbiana. (en línea). Sem@foro :1-76. Disponible en https://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/53/53.pdf.

28. Lara, G. (2014). València. S.l., universitat politècnica de valència. 15-16 p.

29. Lemus, C. (2006). Determinación de grasa y reductasa en quesos frescos de marcas comerciales (en línea). S.l., universidad de san carlos de guatemala. 49 p. Disponible en http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2406.pdf.

30. Luz, P; Roy, V. (2017). Plan de mejoras técnicas para la manipulación y conservación de alimentos en el mercado municipal san jacinto (cooperativa juan montalvo) (en línea). S.l., universidad guayaquil. 5-6 p. Disponible en http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream /redug/20813/1/tesis gs. 217 - plan de mejoras tecn manipul conserv alimentos.pdf.

31. Mansilla, I. (2006). Estudio comparativo de dos métodos de genotipificación para *Arcobacter* butzleri , *Arco bacter* cryaerophilus y *Arcobacter* skirrowii aislados de diversos reservorios (en línea). S.l., universidad austral de chile. 3-4 p. Disponible en http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2006/fcm2 88e/sources/fcm288e.pdf.

32. Mella M., S; acuña L., G; Muñoz Q., M; Pérez C., C; Labarca L., J; González R., G; Bello T., H; Domínguez y., M; Zemelman Z., R. (2000). Quinolonas: aspectos generales sobre su estructura y clasificación (en línea). Revista chilena de infectología 17(1):53-66. Doi: https://doi.org/10.4067/s0716-10182000000 100008.

33. Merga, J.Y., Leatherbarrow, A.J., Winstanley, C., Bennett, M., Hart, C.A., Miller W.G., Williams, N.J. (2011). Comparison of Ar cobacter isolation methods, and diversity of Arcobacter spp. in Cheshire, United Kingdom. Appl. Environ. Microbiol, 77 (5): 16461650.

34. Ministerio de salud pública-arcsa. (2015). Registro oficial no 555: norma técnica sustitutiva de buenas prácticas de manufactura para alimentos procesados (en línea). Registro oficial :48. Disponible en http://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2015/08 /registro-oficial-res-042-bpm-alimentos.pdf.

35. Montesdeoca, K. (2016). Condiciones higiénic as sanitari as en la mani pulación y exp endi o de alim entos en la vía pública en el parque infantil "roberto luis cervantes" y el parque de las palmas "luis tello" en la ciudad de esmeraldas. (en línea). S.l., pontificia universidad católica del ecuador sede esmeraldas. 5-6 p. Disponible en https://repositorio.pucese.edu.ec/bitstream/123456789/658/1/montesdeoca murillo kelly.pdf.

36. Ocampo, L. (2017). Correlación entre la tinción Gram interrumpida y el cultivo con filtros con la técnic a de la *Klebsiella* en la identificación presuntiva de *Campylobacter sp*. en muestras de heces de niños de un hospital nacional de lima en el periodo julio 2015 a junio 2016. (Tesis de Especialidad). Universidad Privada Norbert Wiener. Lima-Perú. 59-60pp

37. Palacios, R. (2014). Estudio farmacocinético de formulaciones poliméricas de liberación controlada para marbofloxacino en caprino (en línea). S.l., universidad de murcia. 29-30 p. Doi: https://doi.org/10.13140/rg.2.1.2171.2482.

38. Ramírez, C; Vélez, J. (2014). Quesos frescos: propiedades, métodos de determinaci ón y factores que afectan su calidad (en línea). Temas selectos de ingenieria de alimentos 2:18. Disponible en http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/tsia-62ramirez-lopez-et-al-2012.pdf.

39. Ríos, S; Agudelo, R; Gutiérrez , L. (2017). Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano (en línea). Revista facultad nacional de salud pública 35(2):1-12. Doi: https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v35n2a08.

40. Rivera, G. (2015). Determinación de la presencia de los genes putativos de virulencia de *Arcobacter* en diferentes medios de crecimiento , temperaturas y condiciones atmosféricas. (en línea). S.l., escuela agrícola panamericana, zamorano honduras. 9-10 p. Disponible en

https://www.bing.com/search?q=rivera%2c+g.+determinación+de+la+presencia+de+los+genes+putativos+de+virulencia+de+*Arcobacter*+ en+diferentes+medios+de+crecimiento%2c+tem peraturas+y+condiciones+atmosféricas.&qs=n&sp=-1&pq=rivera%2c+g.+determinaci%c3.

41. Rojas, Z. (2011). Evaluación de la especif icidad de dos métodos moleculares para la identificación de especies pertenecientes al género *Arcobacter* (en línea). S.l., universidad austral de chile. 3-4 p. Disponible en http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2011/fcr7411e/doc/fcr7411e.pdf.

42. Romero, U; Barranco, R; García, R; Flores, J; Anahí, A. (2015). Impacto de una capacitación en inocuidad alimentaria (en línea). 18. Ciudad juárez, chihuahua, s.e. Disponible en http://www.uacj.mx/dgdcdc/sp/documents/rti/2015/icb/impacto.pdf.

43. Sauca, W. (2018). Aislamiento y detección de *Arcobacter* en leche cruda por medio de la técnica de multiplex PCR. (Trabajo de Titulación de Bioquímico Farmacéutico). UTPL, Loja.

44. Scorza, D. (2013). Facultad de medicina . Carrera de nutrición trabajo de investigación final " intervención educativa en higiene alimentaria en estudiantes de cocina del comedor comunitario la ilusión de los niños de lomas de zamora : evaluación a los 6 meses de implementa (en línea). S.l., instituto universitario fundación h.a barceló. 4-5 p. Disponible en http://www.barcelo.edu.ar/greenstone/collect/tesis/index/assoc/hashbf27.dir/tfi scorza diego ariel.pdf.

45. Scarano, C . et al., (2014). *Arcobacter* butzleri in Sheep Ricotta Cheese at Retail and Related Sources of Contamination in an Industrial Dairy Plant. *American Society of Microbiology.* **DOI:** 10.1128/AEM.02491-14

46. Scullion, R., Harrington, C. S., & Madden, R. H. (2006). Prevalence of Arcobacter spp. in Raw 38 Milk and Retail Raw Meats in Northern Ireland. Journal of Food Protection, 69(8), 1986– 1990. https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.8.1986

47. Silva, S; Correa, F. (2009). Análisis de la contaminación del suelo: revisión de la normativa y posibilidades de regulación económica (en línea). 12:1-22. Disponible en http://www.scielo.org.co/pdf/seec/v12n23/v12n23a2.pdf.

48. Titos, J. (2010). Estudio de formulaciones convencional y nuevas formulaciones de liberación retardada de enrofloxacino en la cabra (en línea). S.l., univerdidad de murcia. 18-19 p. Disponible en https://digitum.um.es/jspui/bitstream/10201/22928/1/tjcta.pdf.

49. Toro, M. (2013). Los antibióticos son sustancias naturales producidas por microorganismos como mecanismo de defensa frente a otros, en su afán de competir por la supervivencia. (en línea). S.l., universidad de la rioja. 56-57 p. Doi: https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2009.05.004.

50. Torres, K. (2015). Conocimiento sobre higiene en la manipulación de alimentos en relación con la carga microbiologica en manos de las socias que manipulan alimentos en los comedores populares del distrito de juliaca, puno. 2014 (en línea). S.l., universidad nacional del altiplano. 21-22 p. Disponible en http://repositorio.unap.edu.pe/handle/unap/2194.

51. Ulcuango, V. (2017). Seguridad alimentaria en la transformación de los alimentos, en los restaurantes de la ciudad de latacunga. (en línea). S.l., uniandes. 20-21 p. Disponible en http://dspace.uniandes.edu.ec/bitstream/123456789/5889/1/piuaesc010-2017.pdf.

52. Ulloa, M. (2016). Enfermedades transmitidas por los alimentos en chile: agentes causantes y factores contribuyentes asociados a brotes ocurridos durante el año 2013 (en línea). S.l., universidad de chile. 3-4 p. Disponible en http://repositorio.uchile.cl/bitstream/hand le/2250/138263/enfermedades-transmitidas-por-lo s-alimentos-en-chile.pdf;sequence=1.

53. Yesilmen, S., Vural, A., Erkan, M. E., & Yildirim, I. H. (2014). Prevalence

and antimicrobial susceptibility of *Arcobacter* species in cow milk, water buffalo milk and fresh village cheese. International Journal of Food Microbiology, 188, 11–14. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.006

54. Zerpa, R; Alarcón, J; Lezama, P; Patiño, L; Reyes, A; Valencia, A; Velásquez, J; Sevilla, C; Alarcón, M. (2013). Identificación de *Arcobacter* en heces de niños y adultos con/sin diarrea y en reservorios animales (en línea). Anales de la facultad de medicina 73(2):2-3. Doi: https://doi.org/10.15381/anales.v73i1.2191.

ANEXOS

Anexo N°1. Mapa de ubicación de la investigación



Elaborado por: Baños S, 2017

Anexo Nº 2. Cronograma de actividades.

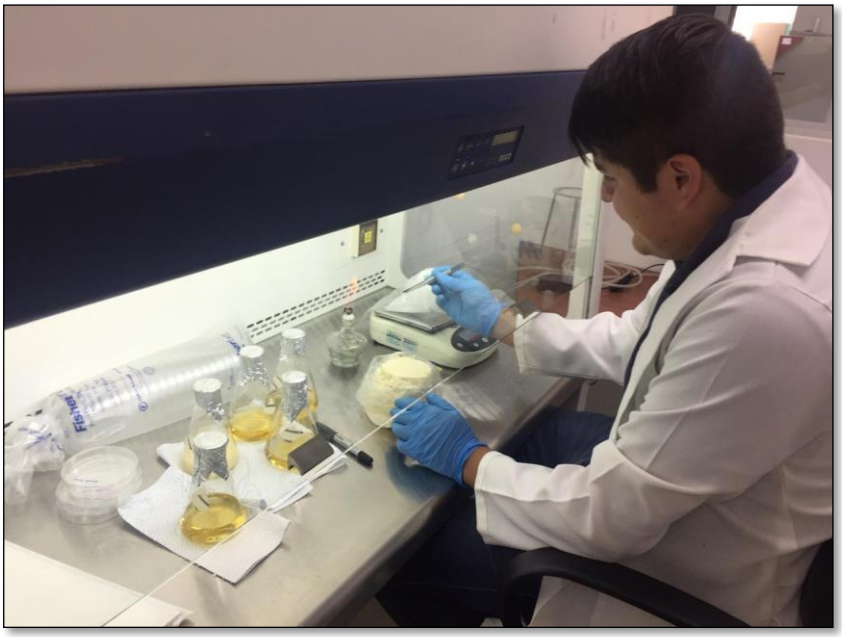
ACTIVIDADES	1	2	3	4	5	6	7	8
Presentación y aprobación del proyecto de investigación								
Defensa del perfil del proyecto								
Trabajo de campo y laboratorio o visita tribunal								
Análisis y documentación								
Predefensa y defensas del proyecto								
Incorporación								

Anexo Nº 3. Fotos.

Anexo 1. Recolección de quesos frescos de mercados del cantón Guaranda: (1): Mercado mayorista "Bellavista". (2): Mercado municipal "10 de Noviembre"



Anexo 2. Método de homogenización de muestras de quesos frescos.



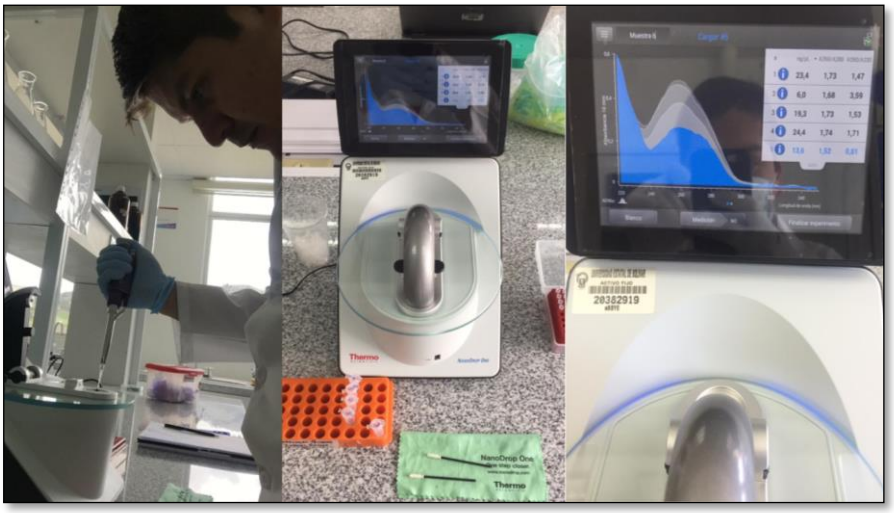
Anexo 3. Cultivo de *Arcobacter* de quesos en medio selectivo Agar Sangre en condiciones de microaerofilia.



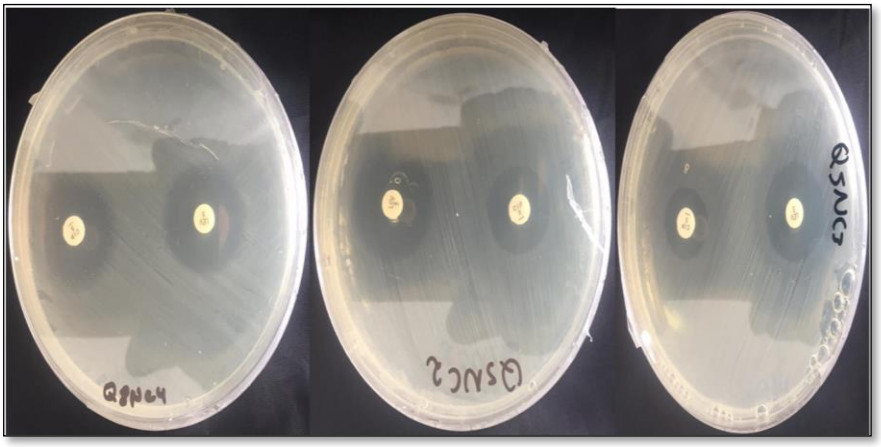
Anexo 4. Método de extracción de ADN.



Anexo 5. Micro-espectrofotometría del ADN extraído de *Arcobacter*.



Anexo 6. Actividad antimicrobiana de Levofloxacina y Ciprofloxacina frente a aislados de *Arcobacter* spp



Anexo Nº4. Presupuesto.

Tabla 3: Presupuesto de elaboración del proyecto de investigación.

COMPONENTES	**CANTIDAD**	**VALOR UNITARIO**	**VALOR TOTAL**
Materia prima Quesos	100	$ 3,00	$ 300,00
Material de oficina y suministros	1	$ 100,00	$ 100,00
Reactivos	1	$ 100,00	$ 100,00
Análisis físicos y químicos	2	$ 300,00	$ 600,00
Materiales de laboratorio	1	$ 50,00	$ 50,00
Foto copias, impresiones	600	$ 0,25	$ 150,00
Transporte	30	$ 10,00	$ 300,00
Empastado	5	$ 20,00	$ 100,00
Subtotal			$ 1700,00
10% capital circulante			$ 170,00
Gran total			$ 1870,00

Anexo N°5. Formatos de Fichas de recolección de datos.

UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

FICHA DE RECOLECCIÓN DE MUESTRA

Ítem	**HORA**	**CANTIDAD DE MUESTRA**	**OBSERVACIÓN**
1	8 am	1000 Kg	Queso fresco.
2	12 am	100 g	Análisis y selección de la materia prima principal.
3	3 pm	50g	Preparación de la matriz muestral
4	4 pm	30 g	Cultivo en placa para la detección del microorganismo de interés.
5	5 pm	10 g	Serán adicionados a 90 mL de *Arcobacter Broth*, luego se añadirá complementos al medio.

_____	_____
RESPONSABLE DEL LABORATORIO	MUESTREADOR

Anexo N°6. Glosario de términos

***Arcobacter*:** Es una bacteria Gram negativa y no forma esporas.

Cepas: Población de células de una sola especie descendientes de una única célula.

Electroforesis: Es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico.

Medios de cultivos: Son medios que proporciona condiciones adecuadas en base a sus nutrientes para el desarrollo y crecimientos de microorganismos.

Patógenos: Son capaces de causar infecciones en un huésped susceptible.

PCR y multiplex PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa es un conjunto de técnicas en apariencia simples, de tal modo que algunas de sus variantes como la detección múltiple lucen atrayentes para el campo de la microbiología asistencial.

Quinolona: Son un grupo de antimicrobianos sintéticos de amplio espectro, cuyo "blanco" es la síntesis del ADN.

Saprofitos: Causantes de deterioro o alteración de los alimentos.

Siembras de microorganismos: Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado.

Siembra por estrías: Es una técnica usada para aislar cepas puras en una placa Petri a partir de un inóculo o muestra con diferentes especies.

Técnicas moleculares: Están basadas en el análisis del ADN genómico bacteriano.

Toxígenos: Son productores de toxinas en el alimento y pueden acusar intoxicaciones.

Antioxidante: Sustancia que inhibe directa o indirectamente las oxidaciones causadas por el oxígeno.

Aterosclerosis: Consecuencia patológica, a nivel cardiovascular, de los depósitos de colesterol y otros elementos (placas de ateroma), que reducen el diámetro de las arterias.

ADN de cadena simple: Polímero no ramificado, compuesto por cuatro tipos de subunidades: los desoxiribonucleótidos que contienen las bases adenina(A), citosina(C), guanina(G) y timina(T).

ADN Polimerasa: Enzima que cataliza la incorporación de los nucleótidos complementarios a la cadena molde durante el proceso de replicación del ADN.

Bacteriofago (Fago): Cualquier virus que infecte bacterias. Herramienta ampliamente utilizada como vector de clonaje

Biopolímero: cualquier polímero de tamaño grande (proteína, ácido nucleico, polisacárido) producido por un organismo vivo. Incluye algunos materiales (como p. ej., polihidroxibutirato) susceptibles de ser utilizados como plásticos. Sinónimo: polímero biológico.

Bioproceso: cualquier proceso en el que se emplean células vivas enteras o sus componentes (p. ej., enzimas, cloroplastos) para llevar a cabo determinados cambios físicos o químicos.

Biotecnología: es el conjunto de procedimientos, sustentados en la ciencia y la tecnología, que permiten producir en forma rápida y eficiente una gran cantidad de bienes y servicios, mediante el uso de sistemas biológicos.

Cebador / Oligo / oligonucleótido o "primer": Molécula corta de ADN de una sola cadena (Unos 18-24 nucleótidos)

Desoxiribonucleótido: Unidad básica del ADN constituida por una base nitrogenada adenina, guanina (purinas), citosina o timina (pirimidinas), un azucar (desoxiribosa) y un grupo fosfato.

Electroforesis: Método de fraccionamiento molecular basado en diferencias de movilidad en un campo eléctrico.

Enzimas: Proteínas que facilitan una reacción bioquímica, y se asocian a un cofactor llamado coenzima.

URKUND

Fbayas (fbayas@ueb.edu.ec)

Documento tesis-cambios-pre-defensa cambios urkund noviembre.docx (D84208059)
Presentado 2020-11-07 04:55 (-05:00)
Presentado por fbayas@ueb.edu.ec
Recibido fbayas.ueb@analysis.urkund.com

7% de estas 39 paginas, se componen de texto presente en 6 fuentes.

Lista de fuentes **Bloques**

- TESIS BIOLOGIA MOLECULAR 1-11-2017 Guaman rev Zul 22 11 17.doc
- TESIS MARIA CORRECCION 15-09-2020.docx
- https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/40282/TFG%20LARA%20SOBRINO%20GREGOR...
- https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/40282/TFG%20LARA%20SOBRINO%20GREGOR...
- https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/39972/TFG%20Laura%20Almenar%20Rivilla%2...
- https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/40286/TFG%20LAURA%20VALCARCEL%20HER...
- **Fuentes no usadas**

0 Advertencias. Reiniciar Exportar Compartir

99% #1 Activo

¡UNIVERSIDAD ESTATALIDE BOLIVARI

FACULTAD DEiCIENCIAS AGROPECUARIAS, RECURSOSi NATURALESi Y DELiAMBIENTEi CARRERA MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TEMA: i ANÁLISIS DE SUSCEPTIBILIDAD A FLUOROQUINOLONAS DE Arcobacter spp AISLADOS A PARTIR DE QUESOS FRESCOS, CARACTERIZADOS MEDIANTE PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA).

Proyectoiinvestigativo

previo a la obtención del Título deiMédico Veterinario y Zootecnista, concedido por la Universidad Estatalide Bolivar a través del la Facultada deiCienciasi Agropecuarias, iRecursosiNaturalesi y del Ambiente, Carrerai de Medicina Veterinaria y Zootecnia

¡AUTOR: LUIS ISRAEL GOYES GUERRA iDIRECTOR:

Dr. EDISON RIVELIÑO RAMÓN CURAY M.Sc. GUARANDA – ECUADOR 2020

ANÁLISIS DE SUSCEPTIBILIDAD A FLUOROQUINOLONAS DE Arcobacter spp AISLADOS A PARTIR DE QUESOS FRESCOS, CARACTERIZADOS MEDIANTE PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA). ADMITIDO

POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL.

Archivo de registro Urkund: UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR / tesis-cambios-pre-defensa cambi... **99%**

¡UNIVERSIDAD ESTATALIDE BOLIVARi FACULTAD DEiCIENCIAS AGROPECUARIAS, RECURSOSi NATURALESi Y DELiAMBIENTEi CARRERA MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA TEMA: i ANÁLISIS DE SUSCEPTIBILIDAD A FLUOROQUINOLONAS DE Arcobacter spp AISLADOS A PARTIR DE QUESOS FRESCOS, CARACTERIZADOS MEDIANTE PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA). Proyectoiinvestigativo previo a la obtención del Título deiMédico Veterinario y Zootecnista, concedido por la Universidad Estatalide Bolivar a través del la Facultada deiCienciasi Agropecuarias, iRecursosiNaturalesi y del Ambiente, Carrerai de Medicina Veterinaria y Zootecnia ¡AUTOR: LUIS ISRAEL GOYES GUERRA iDIRECTOR: Dr. EDISON RIVELIÑO RAMÓN CURAY M.Sc. GUARANDA – ECUADOR 2020

ii ANÁLISIS DE SUSCEPTIBILIDAD A FLUOROQUINOLONAS DE Arcobacter spp AISLADOS A PARTIR DE QUESOS FRESCOS, CARACTERIZADOS MEDIANTE PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA). ADMITIDO POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL. ..... Dr. EDISON RAMON RIVELIÑO CURAY. MsC. DIRECTOR DEL PROYECTO INVESTIGATIVO. ..... Ing. ISIDRO FAVIÁN BAYAS MOREJÓN. Ph.D. BIOMETRISTA ..... Dr. DANILO FABIÁN YÁNEZ SILVA. Ms.c. REDACCIÓN TÉCNICA

iii CERTIFICADO DEL AUTOR Yo, LUIS ISRAEL GOYES GUERRA, ensayista expreso que el presente trabajo investigativo es de mi autoría, este documento no ha sido previamente publicado para ningún grado o calificación profesional; que las citas bibliográficas que se muestran han sido estudiadas con sus respectivos autores. La Universidad Estatal de Bolívar puede usar de los derechos de publicación proporcionados a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y normativa institucional.

..... LUIS ISRAEL GOYES GUERRA CI: 0604321646

..... Dr. EDISON RAMON RIVELIÑO CURAY MsC. DIRECTOR DEL PROYECTO DE