

**Efecto del uso de *Lactobacillus salivarius*  
como suplemento en la dieta final de ganado  
de carne en patrones de prevalencia y  
resistencia antimicrobiana de *Campylobacter*  
spp.**

**Paola Melisa Moncada Muñoz**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras  
Noviembre, 2017**

ZAMORANO  
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Efecto del uso de *Lactobacillus salivarius*  
como suplemento en la dieta final de ganado  
de carne en patrones de prevalencia y  
resistencia antimicrobiana de *Campylobacter*  
spp.**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el  
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Paola Melisa Moncada Muñoz**

**Zamorano, Honduras**

Noviembre, 2017

**Efecto del uso de *Lactobacillus salivarius* como suplemento en la dieta final de ganado de carne en patrones de prevalencia y resistencia antimicrobiana de *Campylobacter* spp.**

**Paola Melisa Moncada Muñoz**

**Resumen.** *Campylobacter* es un patógeno reconocido alrededor del mundo y que constantemente incrementa su resistencia a antibióticos. Por ello la búsqueda de alternativas que reducen la presencia y resistencia a antibióticos (AMR) han sido estudiadas. El uso de microorganismos directamente alimentados (DFM) es una estrategia de reemplazar antibióticos como uso sub-terapéutico. Un nuevo aislado de *Lactobacillus salivarius* (L28) fue utilizado en este estudio, analizando su capacidad de prevenir la colonización intestinal de patógenos. Tres tratamientos a base de una dieta de maíz fueron evaluados de diferentes maneras: sin antibióticos, con antibiótico tilosina, y con *L. salivarius*. Un total de 108 muestras se recolectaron después de 104, 116, y 148 días de suministrar la dieta. Las muestras fecales fueron homogenizadas y enriquecidas en un medio selectivo para recuperar *Campylobacter*. La confirmación fue realizada por pruebas bioquímicas. Colonias aisladas de platos de agar de sangre se analizaron de acuerdo al protocolo del Sistema Nacional de Monitoreo de Resistencia de Antibiótico (NARMS) analizando AMR. Se encontró una prevalencia de 44% (47/108) de *Campylobacter*. No hubo diferencia estadística ( $P=0.5375$ ) entre las dietas evaluadas, ni entre el día de recolección. Las cepas aisladas presentaron una resistencia alta a antibióticos, 98% (42/43), así como una alta resistencia a múltiples antibióticos, 65%. El antibiótico con mayor resistencia fue la tetraciclina (63%). Este estudio sugiere que DFM puede ser un remplazo ideal en la suplementación del ganado disminuyendo la futura aparición de resistencia a antibióticos.

**Palabras clave:** MDR, Microorganismos directamente alimentados, NARMS, Tetraciclina.

**Abstract.** *Campylobacter* is a recognized pathogen worldwide, which is constantly increasing resistance to antibiotics. Hence, alternative approaches to reduce the presence and antimicrobial resistance (AMR) of *Campylobacter* were studied. The use of direct fed microbial (DFM) in animal production is a proposed strategy to replace sub-therapeutic antibiotic use. A novel isolated *Lactobacillus salivarius* (L28) was used in this study, analyzing its ability to prevent pathogens from intestinal colonization. Three treatments based on a finishing diet of steam-flaked corn were evaluated as follows: no antibiotic, with antibiotics tylosin, and with *L. salivarius*. A total of 108 fecal samples were collected from feedlot pens after 104, 116 and 148 days of feeding. Fecal samples were homogenized and enriched in selective media to recover *Campylobacter*. Confirmation was made with biochemical tests. Isolated colonies from blood agar plates were subjected to the National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) protocol for AMR analysis. *Campylobacter* prevalence was of 44% (47/108). No statistic difference was shown ( $P=0.5375$ ) among the diets evaluated, and recollection date was not a factor of change in the results. Therefore, high resistance to antibiotic 98% (42/43) was found, similarly of Multidrug resistance, 65%. Tetracycline (63%) was the most common antibiotic with resistance. This study suggests that DFM can be an ideal replacement for cattle supplementation decreasing future antibiotic resistance emergency.

**Key words:** Direct Fed Microbials, MDR, NARMS, Tetracycline.

## CONTENIDO

Portadilla .....	i
Página de firmas .....	ii
Resumen .....	iii
Contenido .....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>20</b>
<b>5. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>21</b>
<b>6. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>22</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>28</b>

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Formulación del agar selectivo para <i>Campylobacter</i> libre de sangre (CCDA modificado-Preston).....	5
2. Suplemento selectivo CCDA.....	5
3. Formulación del agar R&F cromogenico <i>Campylobacter jejuni/C. coli</i> .....	5
4. Puntos de quiebre utilizados para la prueba de susceptibilidad de <i>Campylobacter</i> <sup>a</sup> .....	7
5. Porcentaje de resistencia múltiple a antibióticos (MDR <sup>ŋ</sup> ) de las muestras aisladas de <i>Campylobacter</i> spp. ....	9
6. Chi-Cuadrado analizando prevalencia de <i>Campylobacter</i> para cada día de muestreo por tratamiento.....	10
7. Porcentaje de resistencia múltiple a antibióticos (MDR <sup>ŋ</sup> ) de las muestras aisladas de <i>Campylobacter</i> spp. ....	14
8. Patrones de resistencia a antibióticos de las muestras aisladas de <i>Campylobacter</i> spp. (n=43) a nueve diferentes antibióticos estudiados.....	15
9. Patrones de resistencia en las diferentes muestras aisladas con <i>Campylobacter</i> spp. en diferentes antibióticos... ..	16
Figuras	Página
1. Distribución de la prevalencia de <i>Campylobacter</i> spp. en las diferentes dietas estudiadas. ....	8
2. Efecto de las diferentes dietas en el resultado de resistencia múltiple a antibióticos. ....	14
Anexos	Página
1. Funcionamiento básico de la prueba bioquímica de aglutinación para confirmación de <i>Campylobacter</i> spp.....	28
2. Chi-Cuadrado realizado para cada día de recolección de muestra analizándolo por tratamiento.....	29
3. Imagen de lectura de resistencia a los antibióticos en diferentes concentraciones, pocillos turbios demuestran resistencia. ....	30
4. Separación de medias por mínimo cuadrado de las diferencia entre que tratamiento presento resistencia en los diferentes antibióticos.....	31
5. Formato del plato de <i>Campylobacter</i> spp. con los antibióticos analizados Sensititre <sup>TM</sup> .....	32

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son causadas por la ingestión de comida contaminada con microorganismos o químicos. Las enfermedades de origen biológico son causadas por una amplia variedad de patógenos, donde la contaminación puede ocurrir desde la producción del alimento hasta su consumo. Esto provoca enfermedades que usualmente ocasionan infecciones o intoxicaciones donde diarrea severa es el síntoma más común. Infecciones causan 550 millones de personas enfermarse y 230,000 muertes al año alrededor del mundo (WHO 2015b). Para poder tratar las infecciones el uso de antibióticos es esencial. Aunque su uso inadecuado de antimicrobianos concluye con la emergencia y la expansión de bacterias resistentes a los antibióticos (WHO 2015a). La industria alimentaria y la producción de alimentos han generado el aumento del riesgo que ocurran brotes de ETA (Tanner 2011).

De acuerdo al Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC), se ha encontrado que aproximadamente cada año 31 patógenos causan 9.6 millones de episodios de enfermedades transmitidas por los alimentos. Más del (58%) de estas enfermedades consisten de norovirus, seguido por *Salmonella* spp. tifoidea (11%), *Clostridium perfringes* (10%) y *Campylobacter* spp. (9%). Las causas de principales hospitalización son *Salmonella* spp. no tifoidea (35%), norovirus (26%), *Campylobacter* spp. (15%) y *Toxoplasma gondii* (8%) (CDC 2011). Con base en la cantidad de brotes ocasionados anualmente aproximadamente el 42% es ocasionado por la categoría de animales terrestres. *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringes*, *Listeria* spp., *Salmonella* spp. entre otros patógenos representan la mayor proporción de enfermedades causadas por esta categoría (CDC 2013).

*Campylobacter* spp. es un patógeno que con mayor frecuencia causa diarrea en los Estados Unidos. Según el FoodNet se diagnostican 14 casos al año por cada 100,000 personas en la población. La enfermedad de *Campylobacter* es una infección conocida como campylobacteriosis causando 76 muertes al año, por ello es la mayor causa de gastroenteritis bacteriana en este país (Sato *et al.* 2004). *Campylobacter* son bacilos por general de forma espiral que forma parte de los patógenos ya que causa enfermedades a humanos y animales (CDC 2014). El género de *Campylobacter* comprende 17 especies y 6 subespecies. Dentro de estos serotipos *C. jejuni* y *C. coli* son destacados ya que son los principales causantes de enfermedades en humanos. Otras especies con menor frecuencia se encuentran *C. lari* y *C. upsaliensis* (WHO 2016).

Las especies de *Campylobacter* se encuentran distribuidos en la mayoría de animales de sangre caliente. La transmisión ocurre a través de los alimentos como son productos cárnicos poco cocidos, leche sin pasteurizar y por medio de agua contaminada (WHO2016).

Para tratar campylobacteriosis no se considera esencial el uso de antibióticos. No obstante la resistencia de antibióticos se ha incrementado durante los últimos años. La resistencia de antibiótico es la habilidad que tiene la bacteria a resistir el efecto del antibiótico provocando que la bacteria no muera y su crecimiento continúe. Una vez que las bacterias obtengan la resistencia es común que incremente el número de bacterias resistentes (FDA 2014). Cuando hay una aparición de fenotipos bacterianos que presentan un amplio rango de quimioterápicos químicamente disímiles al mismo tiempo causa un problema de mayor preocupación conocido como multiresistencia (Marchetti *et al.* 2011). Los organismos multiresistentes a drogas son bacterias que han creado resistencia a más de un antibiótico causando mayor dificultad de tratar enfermedades (DPH 2016).

El uso de antibióticos como promotor de crecimiento en ganado y otros animales de engorde está involucrado dentro de las principales causas que promueven la resistencia de antibióticos. Por lo anterior, la presencia de bacterias resistentes a antibióticos en productos de origen animal y su transmisión hacia los humanos es alta (Finch 2003). El uso de antibióticos en manera rutinaria conduce a la evolución que patógenos sean resistentes a los antimicrobianos creando una ineficiencia de los antibióticos para controlar enfermedades (Vohra *et al.* 2014).

Para evitar que siga incrementando la resistencia de antibióticos se han estudiado nuevas propuestas para reemplazar el antibiótico como uso sub-terapéutico. El uso de probióticos es una nueva estrategia que se está estudiando en la ganadería y se han encontrado resultados prometedores en el área avícola controlando la presencia de *Campylobacter* (Saint-Cyr *et al.* 2015). Los probióticos son definidos como organismos vivos utilizados como suplemento alimenticio que beneficia al huésped balanceando la microbiota intestinal (Heyman y Ménard 2002).

El uso de probióticos en rumiantes tiene como objetivo estabilizar la microbiota intestinal y disminuir el riesgo de que microorganismos patógenos colonicen el intestino. El uso de ellos logra reemplazar el uso de antibióticos ya que tienen la habilidad de mejorar la salud y productividad animal (Uyeno *et al.* 2015). El uso de estos probióticos conocidos como microbianos directamente alimentados DFM en el concentrado animal podría ser el reemplazo ideal de antibióticos (Quigley 2011). Estudios han demostrado que los probióticos en ganado han tenido la habilidad de controlar enfermedades infecciosas, mejorar su productividad y prevenir infecciones intestinales causadas por patógenos (Dhama *et al.* 2008). Se han reportado que probióticos como *Lactobacillus acidophilus* tiene la capacidad de reducir hasta un 60% el patógeno *E. coli* O157: H7 (Schamberger *et al.* 2004). Estudios demuestran que estos probióticos compiten por los nutrientes con la bacteria patógena inhibiendo su crecimiento (Yirga 2015). Por lo anterior expuesto, los objetivos de este estudio fueron:

- Comprobar el efecto de tres dietas en la disminución de la presencia de *Campylobacter* spp aisladas de las heces del ganado de carne.
- Evaluar el uso de *Lactobacillus salivarius* en el concentrado animal en comparación con el uso de antibióticos de manera sub terapéutico en la resistencia de antibióticos de *Campylobacter* spp.
- Determinar el efecto de las dietas en la resistencia a los antibióticos de las cepas aisladas.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### **Ubicación del estudio.**

El estudio fue localizado en Lubbock, Texas, Estados Unidos, en la Universidad de Texas Tech. Las muestras fueron recogidas en la unidad de engorde del Centro Burnett de Investigación de Ganado de Carne de la Universidad de Texas Tech. Las muestras se procesaron en el laboratorio de microbiología de alimentos del Departamento de Ciencia Animal y Ciencia de los Alimentos dentro de la Universidad.

### **Selección de muestras (ganado de carne).**

Se seleccionaron de manera aleatoria 144 cruces de novillos. Previo al inicio del estudio se realizaron procedimientos estándares a todos los novillos. Esto consta de pesarlos, etiquetarlos, vacunarlos, desparasitarlos, y se colocó un implante de Synovex Plus, como promotor del crecimiento. El peso inicial de los novillos fue utilizado para asignarlos a los diferentes corrales, los animales de similar peso fueron colocados en un mismo corral. Se realizó el experimento a 36 corrales donde cuatro animales pertenecían a cada corral, teniendo un total de 144 animales. Se evaluaron 48 animales por cada tratamiento distribuidos en 12 corrales por tratamiento.

### **Preparación del probiótico.**

El probiótico utilizado en este estudio, L28 es un tipo de *Lactobacillus salivarius* aislado por primera vez en la Universidad de Texas Tech (Castillo *et al.* 2016). Al momento de proporcionarlo a la dieta se mezclaba un gramo del probiótico en 99 gramos de lactosa en polvo. Esa mezcla se agitaba por 20 minutos asegurándose que el probiótico estuviera homogéneamente distribuido. De esos 100 gramos de mezcla diez gramos de ellos se añadió a 990 g de lactosa en polvo con el objetivo de tener la concentración final deseada de  $10^9$  ufc/g, esta se mezcló nuevamente por 20 minutos. Al finalizar se almacenó al vacío y se colocó en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Este proceso de mezclado se realizaba semanalmente y se colocaba cada día a la dieta MonPro mezclándolo con la dieta a base de maíz antes de alimentar al ganado.

### **Preparación de tratamientos.**

Se realizaron tres tratamientos que consistían en una dieta a base de copos de maíz vaporizados. Estas dietas fueron proveídas al ganado dos veces al día, durante la mañana en horarios de (7-8am) y durante la tarde de (5-6pm). Las dietas se nombraron con diferentes nomenclaturas.

**Base.** Este consistía de la dieta tradicional sin microorganismos directamente alimentados (DFM) ni el uso de antibiótico como uso sub-terapéutico ni cualquier otro suplemento monensina (330 mg/animal/día de la materia seca).

**Control.** A la dieta a base de maíz se le incluyó el antibiótico Tilosina (88 mg/animal/ día de la materia seca) y el suplemento monensina (330 mg/animal/día de la materia seca).

**MonPro.** A la dieta a base de maíz se le incluyó monensina (330 mg/animal/día de la materia seca), y el DFM que es *L. salivarius* en una proporción alimentaria de 10<sup>9</sup> ufc/animal/día

### **Recolección de muestras.**

En este estudio se realizaron tres tomas de muestras en la etapa final de la dieta. Se recolectaron las muestras a los 104, 116 y 148 días. La recolección de muestras se realizó a las 7:30 am. Se recolectaron aproximadamente 100 gramos de heces de cada corral en un frasco estéril. Se tomaron en cuatro diferentes sectores del suelo asegurándose que fueran frescas y que pertenecieran a los cuatro diferentes animales. Las muestras se colocaron en una hielera con paquetes de hielo para mantenerlas a temperaturas bajas hasta su evaluación el mismo día de recolección.

### **Preparación del enriquecimiento.**

Al llegar las muestras al laboratorio se pesaron cinco gramos de la muestra fecal y se colocaron en bolsas con filtro de Nasco Whirl-Pak (24 oz). Dentro de la bolsa se añadieron 30 mL de caldo Bolton estéril, cada bolsa contenía una muestra individual etiquetada correctamente. Cada bolsa se llevó al stomacher donde se homogenizó durante 30 segundos a 230 RPM. Al finalizar este paso, con una pipeta se tomaron 30 mL de la muestra, en algunos casos tomando toda la muestra no completaba los 30 mL pero en esta situación se debe tomar la muestra completa, y se colocaron en botellas de cultivo planos estériles Corning (25 cm<sup>2</sup>). Las botellas no se cerraron completamente y se pusieron de manera horizontal para que la bacteria tuviera mayor área superficial para crecer. Todos los frascos se colocaron en una jarra de anaerobiosis con un sistema de contenedores Campy GasPak EZ para crear el ambiente microaerófilico (6-16% de oxígeno y 2-10% de dióxido de carbono). En este paso se incubaron los frascos a una temperatura de 37 °C por 48 horas (Hanlon 2015).

### **Aislamiento de *Campylobacter*.**

Al finalizar el tiempo de incubación el enriquecimiento fue estriado en dos medios de cultivo. Se utilizó CCDA modificado, Oxoid (Cuadro 1, Cuadro 2) el cual es un agar selectivo libre de sangre para *Campylobacter* y se comparó con otro medio de cultivo el agar *Campylobacter jejuni/ C.coli* chromogenic plating, R&F Products (Cuadro 3). Con asa estéril de 10µl se tomó una alícuota del caldo de enriquecimiento y se realizó un estriado. De cada muestra se estrío a ambos platos con los diferentes agares. Estos de igual manera se incubaron en condiciones microaerófilas (GasPak Campy System) a 37 °C por 48 horas.

Cuadro 1. Formulación del agar selectivo para *Campylobacter* libre de sangre (CCDA modificado-Preston).

<b>Formula típica</b>	<b>g/litro</b>
Caldo Nutricional No.2	25.00
Carbón bacteriológico	4.00
Caseína hidrolizada	3.00
Desoxicolato de sodio	1.00
Sulfato ferroso	0.25
Piruvato de sodio	0.25
Agar	12.00

Fuente Oxoid 2001.

Cuadro 2. Suplemento selectivo CCDA (Oxoid 2001).

<b>Contenido del Vial (cada vial es suficiente para 500ml de agar)</b>	<b>Por vial</b>	<b>Por litro</b>
Cefoperazona	16 mg	32mg
Anfotericina B	5 mg	10mg

Fuente Oxoid 2001

Cuadro 3. Formulación del agar R&F cromogenico *Campylobacter jejuni/C. coli*.

<b>Formula típica</b>	<b>% de peso seco</b>
Proteínas from vegetal origen	23.60
Proteína from animal origen	19.20
Hemin	0.03
Extracto de Levadura	9.1
Ácido Alfa-cetoglutárico	2.1
Cicloheximida	0.4
Óxido de Titanium (IV)	6.1
Sales Biliares #3	1.0
Metabisulfito de Sodio	1.0
Carbonato de Sodio	1.2
Piruvato de sodio	2.0
Agar	34.3

Fuente R&F 2012

### **Confirmación de *Campylobacter*.**

Los platos inoculados se retiraron de la incubadora y se retiraron los platos sin crecimiento los cuales indicaban que en esa muestra no estaba presente la bacteria. Con los demás platos con crecimiento se realizó una comparación entre medios, y el que tenía mejor formada las colonias se utilizó para los siguientes pasos. De los platos con crecimiento se tomaron las colonias necesarias para llenar el asa bacteriológica y se volvieron a estriar en un agar de

sangre. Los platos se incubaron en el ambiente microaerófilo controlado por 24 horas a 42°C. Al finalizar su periodo de incubación la prueba de aglutinación del kit para *Campylobacter* se realizó indicando la presencia de *C. lari*, *C. jejuni* y *C. coli*. Se tomaron cinco colonias de *Campylobacter* de los platos y se colocó con los reactivos en movimiento rotatorio por tres minutos. Las muestras que aglutinaron fueron clasificadas como positivas.

### **Sensititre™, análisis de resistencia de antibiótico.**

En este caso se siguió el protocolo del Sistema Nacional de Monitoreo de Resistencia de Antibiótico (NARMS). Los platos de agar sangre que confirmaron presencia de *Campylobacter* se tomaron para realizar el análisis de resistencia de antibiótico. Se prepararon los tubos que contenían 5 ml de caldo de Mueller-Hinton donde se colocaban una colonia y este se agitaba en el vortex para luego verificar en el nefelómetro con el estándar de 0.5 de Mcfarland. De cada muestra se retiró con una pipeta 1 ml del caldo de Mueller-Hinton y se añadió a un tubo que contiene 11 ml caldo de Mueller-Hinton con 5% de sangre de caballo desfibrinada (Thermo Scientific) y se agitaron en el vortex. Este tubo se colocó en el Sensititre AIM donde dispensa 100 µl en cada pocillo del plato. Se cubrió el plato con una película plástica perforada. Estos se apilaron en no más de cuatro filas y se incubó a una temperatura de 42 °C por 24 horas en condiciones microaerófilas.

Se retiraron los platos de la incubadora y se colocaron uno por uno en espejo de Sensititre donde permitía ver el reflejo del plato y así identificar si el pocillo tenía turbidez indicando crecimiento de la bacteria, el cual es resistente a la dosis específica del antibiótico. Para esto se utilizó el formato de Sensititre del plato de *Campylobacter* para saber qué antibiótico y a qué dosis están en cada pocillo (Simmons 2016). Las muestras positivas se compararon con la dosis en que presenta prevalencia a los puntos de quiebre que indica si la muestra era resistente, intermedio o susceptible al antibiótico (Cuadro 4) (Haro 2012).

### **Listado de antibióticos.**

Los antibióticos estudiados fueron gentamicina (GEN), clindamicina (CLI), azitromicina (AZI), eritromicina (ERY), telitromicina (TEL), florfenicol (FFN), ciprofloxacina (CIP), ácido nalidixico (NAL) y tetraciclina (TET):

### **Análisis estadístico.**

Durante el análisis de la cantidad de prevalencia de *Campylobacter* spp. en el estudio se realizó una separación de medias Duncan, analizados con el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.4®). Los resultados obtenidos en los diferentes días se colocaron en porcentajes para poder realizar el análisis estadístico. De igual manera se realizó un análisis de Chi-cuadrado con los resultados de prevalencia de *Campylobacter* spp. Se analizaron las 12 muestras que pertenecían a cada tratamiento separándolos si fueron prevalentes o no prevalentes.

Se compararon los valores de la prueba estadística (P.E.)= ( $\chi^2$  observado <  $\chi^2$  de la tabla=3.84; gl= 1;  $\alpha=0.05$ ). Si el valor encontrado en nuestro experimento no excede el valor dado por la tabla se acepta la H0 con un 5% de nivel de significancia.

Se realizó un análisis de separación de medias Duncan con los resultados de resistencia de antibiótico. Los resultados que se obtuvieron fueron datos de resistencia, intermedio o susceptible a nueve antibióticos. Para evaluar la diferencia entre los tratamientos y su resistencia se buscó el porcentaje de las muestras positivas que fueron resistente múltiple a antibiótico (MDR). Eso se separó por los días de recolección de datos obteniendo una media. Los grupos con las mismas letras de separación de medias se demostró que no hubo diferencia significativa con una probabilidad de ( $P < 0.05$ ).

Para finalizar la evaluación se analizaron las diferencias entre antibióticos. Se analizó a través de cuadrados mínimos para identificar el efecto que tiene el tratamiento, día en la resistencia de antibióticos.

Cuadro 4. Puntos de quiebre utilizados para la prueba de susceptibilidad de *Campylobacter*<sup>a</sup>.

Subclase de los Antibióticos <sup>b</sup>	Agente Antimicrobiano	Rango de la concentración del antibiótico ( $\mu\text{g/ml}$ ) 2005-2012	Puntos de quiebre ( $\mu\text{g/ml}$ ) de dilución de microdragas (2005-2012)		
			S	I	R
Aminoglucosídicos	Gentamicina	0.12 - 32	$\leq 2$	4	$\geq 8$
Lincosamidas	Clindamicina	0.03 - 16	$\leq 2$	4	$\geq 8$
Macrólidos	Azitromicina	0.015 - 64	$\leq 2$	4	$\geq 8$
	Eritromicina	0.03 - 64	$\leq 8$	16	$\geq 32$
Cetólidos	Telitromicina	0.015 - 8	$\leq 4$	8	$\geq 16$
Fenicoles	Florfenicol	0.03 - 64	$\leq 4$	N/A	N/A
	Chloramfenicol	NT	NT	NT	NT
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	0.015 - 64	$\leq 1$	2	$\geq 4$
Quinelonas	Ácido	4 - 64	$\leq 16$	32	$\geq 64$
	Nalidixico				
Tetraciclinas	Tetraciclina	0.06 - 64	$\leq 4$	8	$\geq 16$

<sup>a</sup> Estos puntos de quiebre son establecidos por CLSI (Instituto Estándar de Clínica y Laboratorio).

<sup>b</sup> Conforme al documento de CLSI M100

N/A- no aplica

NT- No está probado

(CLSI 2012).

S Consta de rangos susceptibles.

I Consta de rangos intermedios.

R Consta de rangos resistentes.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Fase I. Evaluación de la presencia de *Campylobacter* spp. en las muestras fecales.

La prevalencia de *Campylobacter* en heces de ganado vacuno en las tres diferentes dietas estudiadas fue de 44% en total. Su prevalencia osciló entre 23-43% en las diferentes dietas y días de muestreo. En el análisis de separación de medias se demostró que no hubo ningún efecto entre las dietas ( $P=0.5373$ ) (Figura 1). Tampoco hubo diferencias entre días de muestreo. En la primera toma de muestra en el día 104 se encontró por medio de la prueba de aglutinación que 36% (13/36) de las muestras presentaron la bacteria de *Campylobacter* spp. En el día 116 se presentó un 39% (14/36) de las muestras prevalentes. El último día de recolección de muestras, día 148, el porcentaje de *Campylobacter* spp. presentó un 56% (20/36) de prevalencia. No hubo diferencia estadística en la prevalencia encontrada por dieta ( $P=0.2766$ ) y día de muestreo ( $P=0.9927$ )(Cuadro 5).

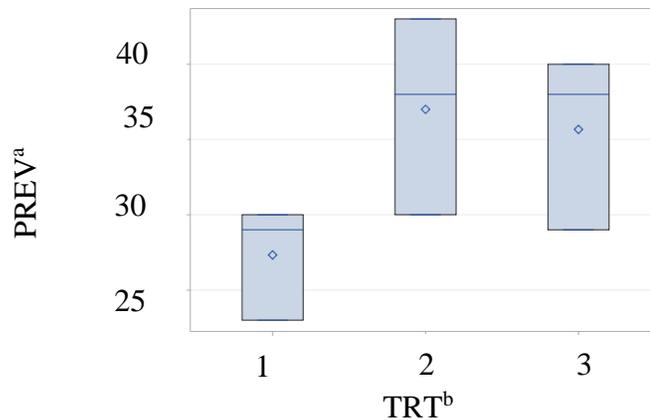


Figura 1. Distribución del porcentaje de la prevalencia de *Campylobacter* spp. en las diferentes dietas estudiadas.

<sup>a</sup> La prevalencia se obtuvo por medio de una prueba de confirmación por el método de aglutinación.

<sup>b</sup> Los tratamientos son las diferentes dietas dadas al ganado estudiado.

<sup>1</sup> Tratamiento Base, consiste de la dieta tradicional sin microorganismos directamente alimentados (DFM) ni el uso de antibiótico como uso sub terapéutico ni cualquier otro suplemento.

<sup>2</sup> Tratamiento Control, consiste en la dieta a base de maíz se le incluyó el antibiótico Tilosina (88 mg/animal/ día de la materia seca) y el suplemento monensina (330 mg/animal/día de la materia seca).

<sup>3</sup> Tratamiento MonPro, consiste en la dieta a base de maíz y se le incluyó monensina (330 mg/animal/día de la materia seca), y el DFM que es *L. salivarius* en una proporción alimentaria de  $10^9$  ufc/animal/día.

Cuadro 5. Porcentaje de prevalencia de *Campylobacter* spp. en diferentes dietas y días de muestreo.

Tratamiento	Día de recolección de muestras			
	Día 104	Día 116	Día 148	Total
Base <sup>◇</sup>	23% (3/13)	29% (4/14)	30% (6/20)	28% (13/47)
Control <sup>£</sup>	38% (5/13)	43% (6/14)	30% (6/20)	36% (17/47)
MonPro <sup>Ψ</sup>	38% (5/13)	29% (4/14)	40% (8/40)	36% (17/47)

<sup>◇</sup> Tratamiento Base, consiste de la dieta tradicional sin microorganismos directamente alimentados (DFM) ni el uso de antibiótico como uso sub terapéutico ni cualquier otro suplemento.

<sup>£</sup> Tratamiento Control, consiste en la dieta a base de maíz se le incluyó el antibiótico Tilosina (88 mg/animal/ día de la materia seca) y el suplemento monensina (330 mg/animal/día de la materia seca).

<sup>Ψ</sup> Tratamiento MonPro, consiste en la dieta a base de maíz y se le incluyó monensina (330 mg/animal/día de la materia seca) y el DFM que es *L. salivarius* en una proporción alimentaria de 10<sup>9</sup> ufc/animal/día.

Los resultados sugieren la capacidad que tiene la dieta con probiótico de ser un posible reemplazo de los antibióticos, ya que sus resultados son similares y en el futuro podrían disminuir la emergencia de resistencia de antibiótico. El uso de probióticos dentro de la dieta animal consta de diferentes factores que permiten que estos sean efectivos y que cumplan su función de proveer beneficio a la salud de su huésped. La colonización de probióticos en los animales sugiere que las cepas se adhieren al tejido de las células epiteliales del intestino logrando contribuir en la salud animal. Esta forma de actuar de los probióticos varía según estudios. Otra manera de beneficiar a la salud del huésped es que el organismo sobrevive durante su tránsito desde el colon hasta las heces, sin multiplicarse ni afectando su viabilidad. Durante el tránsito en el colon el probiótico sigue siendo activo metabólicamente mejorando la salud intestinal del animal (Bezkoravainy 2001). La eficiencia del probiótico depende de la sobrevivencia de la cepa. Esta sobrevivencia depende del microorganismo, su dosis, la frecuencia de su administración y el estado del animal que depende de su edad, estrés y genética. Se reporta que para tener un efecto óptimo del probiótico, éste se debe suplementar constantemente (Yirga 2015). Dentro de esta investigación se realizó una suplementación constante de *Lactobacillus salivarius* por ello su efecto fue uniforme dentro de los diferentes días.

Los resultados obtenidos de la prueba de aglutinación se compararon por medio de un chi-cuadrado analizando la diferencia estadística entre las muestras fecales que presentaron prevalencia en comparación con los que no fueron prevalentes. Se estudió cada tratamiento y sus diferentes días de recolección de muestra (Cuadro 6).

Cuadro 6. Chi-Cuadrado analizando prevalencia de *Campylobacter* para cada día de muestreo por tratamiento.

Tratamiento y Repetición (Días)	$\chi^2$ Observado <sup>a</sup>
104 Control <sup>ψ</sup>	0.08
116 Control	0.00
148 Control	0.00
104 MonPro <sup>◊</sup>	0.08
116 MonPro	0.75
148 MonPro	0.75
104 Base <sup>£</sup>	2.08
116 Base	0.75
148 Base	0.00

<sup>a</sup> Resultado del Chi cuadrado ( $\chi^2$  observado <  $\chi^2$  de la tabla=3.84; gl= 1;  $\alpha$ =0-05).

<sup>ψ</sup> Tratamiento Control, consiste en la dieta a base de maíz se le incluyó el antibiótico Tilosina (88 mg/animal/ día de la materia seca) y el suplemento monensina (330 mg/animal/día de la materia seca).

<sup>◊</sup> Tratamiento MonPro, consiste en la dieta a base de maíz y se le incluyó monensina (330 mg/animal/día de la materia seca) y el DFM que es *L. salivarius* en una proporción alimentaria de 10<sup>9</sup> ufc/animal/día.

<sup>£</sup> Tratamiento Base, consistía de la dieta tradicional sin DFM ni el uso de antibiótico como uso sub-terapéutico ni cualquier otro suplemento.

Los microorganismos patógenos son transmitidos a los animales de engorde de manera directa o indirecta, por ello el estudio de la presencia de patógenos en posibles huéspedes es esencial para disminuir el número de bacterias en ellos y así disminuir la contaminación hacia humanos (NIH 2007). Dentro la industria alimentaria se estudian posibles controles para evitar patógenos en la cadena alimentaria. La granja es una gran amenaza en la inocuidad de los alimentos por ello la salud animal es estudiada y es enfocada a disminuir la presencia de patógenos (Tomley y Shirley 2009). La industria cárnica requiere buscar una reducción del número de patógenos. La prevalencia de *Campylobacter* spp. reportada se encuentra entre 54-31.1% en muestras de origen animal, similar a nuestro estudio que entra dentro de este rango, encontrando un 38% de prevalencia.

Varios estudios han demostrado que la exposición de contacto directo de heces de ganado y su ingesta por medio de leche no pasteurizada han sido causas de brotes de campylobacteriosis en humanos. Fitzgerald *et al.* (2001), reporta en su estudio un porcentaje genético del *Campylobacter* encontrado en el ganado tiene una relación con las bacterias presentes en los humanos ubicados en una misma área geográfica. Por ello se han estudiado de manera más profunda la prevalencia y resistencia de antibióticos de *Campylobacter*. Según Bae *et al.* (2005), se tomaron muestras en granjas localizadas en Washington State. Se estudiaron heces fecales del recto del animal con un total de 686 muestras fecales y se encontraron (34.1%) de *C. jejuni* y (7.7%) de *C. coli*. Se demostró una diferencia estadística entre cepas, siendo *C. jejuni* el más prevalente en hatos de terneros en cambio *C. coli* tiene mayor presencia en hatos de crías (Bae *et al.* 2005).

En Finlandia se analizó la presencia de *Campylobacter* spp. en ganado durante la finalización de la dieta antes de cosecha y la posible contaminación en canales de carne después de la cosecha. En total se detectó un 31.1% de prevalencia de *Campylobacter* spp. en muestras fecales y un 3.5% de prevalencia en la superficie de la canal. Este estudio comparó la presencia en ganado de carne y ganado de leche donde mostraron que un 43.2% de las muestras obtenidas de ganado de carne fueron positivas y un 56.8% de ganado lechero. Concluyeron que la proporción de *Campylobacter*-positivos es más frecuente en el ganado de carne en comparación con ganado lechero (Hakkinen *et al.* 2007).

El estudio realizado por Wesley obteniendo muestras fecales del suelo de parte de ganado lechero analizó la presencia de *Campylobacter* spp. y *Arcobacter* spp. Como resultado general obtuvieron que *C. jejuni* y *C. coli* tuvieron un porcentaje de prevalencia de un 37.7 y 1.8%, respectivamente. Concluyeron que este resultado de prevalencia puede variar por la temporada (encontrando mayor presencia en las heces durante invierno y verano), la edad del animal (ternero o adulto), muestra analizada (las heces o contenido intestinal) y el método de aislamiento de la bacteria (sembrando directamente o enriqueciéndolo) (Wesly *et al.* 2000).

En Irlanda la preocupación principal en la industria es la posible contaminación de las bacterias patógenas durante su cadena de producción. Por ello se analizaron vaquillas desde su producción de engorde hasta la cosecha. Se examinó durante cinco meses las vaquillas obteniendo muestras fecales del suelo y al cosecharlas se realizó un hisopado en la superficie de la canal. De un total de 600 muestras se aislaron 322 (54%) de *Campylobacter* spp. de esos, *C.jejuni* presentó un 69% y *C.coli* un 29.7%. Resultados similares a otras investigaciones demuestran que las muestras de la canal de res se ven menos contaminadas por la bacteria, en este caso se presentó por un 29% (Minihan *et al.* 2003).

La composición microbiana del ganado depende mucho del animal y su ubicación geográfica donde se localizan. En estudios se han encontrado que en el estiércol animal se encuentran de manera común patógenos. Las bacterias zootecnicas con mayor presencia son *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* and protozoa viz. *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*. (Manyi-Loh *et al.* 2016) reportaron una prevalencia de 31.1% de *Campylobacter* spp. en estiércol.

Se ha tratado de analizar la diferencia en la composición microbiana en grupos de ganado alimentado con diferentes dietas. En la Universidad del estado de Kansas se analizó la interacción e intervención que tienen los granos de destilería secos DDG en diferentes patógenos. Los resultados obtenidos demostraron que no hubo ninguna diferencia en los diferentes tratamientos con la prevalencia de las bacterias *E. coli* O157 y *Salmonella*. Este estudio documentaba que el uso de rollos secos de granos tiene menor degradación ruminal del almidón en comparación de los copos de maíz vaporizados. Se ha demostrado que la dieta a base de maíz consta de un mayor porcentaje de almidón en el intestino animal incrementando la producción de ácidos orgánicos, estos reduciendo el pH por el cual se considera que tiene un potencial de reducir la sobrevivencia de *E. coli* O157 (Nagaraja 2008).

*Escherichia coli* O157:H7 ha sido uno de los patógenos que ha provocado un llamado de atención en las industrias cárnicas por su prevalencia, por ello hay varios estudios que indican el uso de diversas dietas para su control. Dentro del estudio de Van Baale *et al.* (2003) compararon el efecto que tenía el uso de forrajes y dieta a base de granos con y sin monensina en la prevalencia de *Escherichia coli* O157:H7. Los animales dentro del estudio se inocularon con *E. coli* O157:H7 ( $10^{10}$  UFC/animal) y se alimentaron con las diferentes dietas. Resultados demuestran que *E. coli* estuvo presente en mayor tiempo en las heces en comparación con la dieta a base de granos. Cuando se le añadía monensina a la dieta de forrajes disminuía el periodo de tiempo que la bacteria pertenecía prevalente (Van Baale *et al.* 2003).

El uso de suplemento dietético ha incrementado desde los años 1960s, se ha demostrado que el uso de bacterias productoras de ácido láctico es utilizado como agentes promotores de salud. *Lactobacillus* spp. son miembros de bacterias ácidas lácticas Gram positivas que son nombradas como GRAS, generalmente reconocidas como inocuas. Este probiótico tiene características de inhibir bacterias. El probiótico tiene esa habilidad de resistir condiciones ambientales encontradas en el tracto gastrointestinal incluyendo pH gástricos bajos y sales biliares. Tiene la habilidad de adherirse a la mucosa intestinal o antagonizar o excluir por medio de la competencia a patógenos. Estas bacterias ácido lácticas pueden secretar sustancias antimicrobianas, competir por nutrientes o sitios adherentes con posibles patógenos creando un efecto inhibitorio hacia ellos (Nouri *et al.* 2010).

Varios estudios proveen información acerca de la capacidad que tienen los probióticos de inhibir bacterias entéricas donde comúnmente se utilizan *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y estreptococos. Se ha demostrado que bacterias ácido lácticas tienen la capacidad de inhibir *in vitro* a las bacterias entéricas, como *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile*. *Lactobacillus salivarius* tiene potencial de ser usado como un suplemento dietético, este se ha utilizado mayormente para animales avícolas y porcinos. En la universidad de Georgia se estudió el efecto de *Lactobacilos* en inhibir bacterias en un medio que consistía en alimento para aves. Ellos demostraron que el uso de *L. salivarius* y *L. plantarum* tuvo una diferencia con la presencia de bacterias entéricas en comparación al control que solo consistía en la alimentación. Casos de poca inhibición de bacterias concluyen que fue provocado mayormente por la baja concentración producida de ácido acético y propiónico causando una baja producción de ácidos grasos volátiles. Estudios demuestran que una concentración de 30  $\mu\text{mol/ml}$  de ácido láctico debe estar presente para inhibir bacterias (Murry *et al.* 2004).

Se ha evaluado el comportamiento de diferentes reemplazos de antibióticos en vivo para ver su capacidad de inhibición a bacterias. Los probióticos producen bacteriocinas que tienen capacidad de inhibir bacterias. En un estudio se demostró que el uso de probióticos fue incapaz de controlar terapéuticamente *C. jejuni* en el tracto intestinal de las gallinas. En cambio el uso de bacteriocinas de manera purificada demuestra un mecanismo deseable por lograr controlar las bacterias patógenas (Svetoch *et al.* 2011).

*Campylobacter* spp. es una bacteria mayormente encontrada en productos avícolas, por lo que las investigaciones acerca de cómo controlarlas disminuyendo su prevalencia se realizan en estos animales. Se ha demostrado que las bacteriocinas disminuyen la presencia

de *Campylobacter* ya que logra reducir ambos, la cripta duodenal y el número de células caliciformes. Se cree que la reducción de tamaño de la cripta podría afectar la colonización de *Campylobacter*, ya que crea un cambio químico y nutricional en el ambiente aumentando el oxígeno presente evitando el crecimiento de esta bacteria microaerofílica y de esa manera la presencia de otra microflora aumenta. En el lado de las células caliciformes secretan unas glicoproteínas llamadas mucinas que *Campylobacter* utiliza como fuente de nutrientes durante su crecimiento, disminuyendo su número la bacteria tiene menor disponibilidad de nutrientes (Cole *et al.* 2006).

## **Fase 2. Evaluación de las muestras prevalentes a *Campylobacter* spp. en los patrones de resistencia a antibióticos.**

Las muestras que presentaron prevalencia de *Campylobacter* spp. se analizaron por el Sensititre™ por el método de micro dilución que permite identificar las muestras que son resistentes a diferentes antibióticos. En total de las 43 aislados de *Campylobacter* spp. en los tres días de las dietas, un 98% (42/43) fueron resistentes por lo menos a un antibiótico; el día 104 fue un 100% (13/13), en el día 116 se obtuvo un 100% (10/10) y en el día 148 presentó una resistencia del 95% (19/20). De las 43 muestras se evaluó cuantas de ellas fueron resistentes a dos o más antibióticos (múltiple resistentes a antibióticos, MDR). Se obtuvo que en el día 104 fue de 69% (9/13) de MDR, en el día 116 70% (7/10) y en el último día (148) fue 60% (12/20). Estos resultados indican que un total de 65% (28/43) presentaron resistencia a más de un antibiótico. Los resultados obtenidos por tratamiento en sus diferentes días proporcionados se resumen en el Cuadro 7. Con el análisis de Duncan se logró comparar el efecto que tuvieron las diferentes dietas en la MDR. No hubo ninguna diferencia estadística en la resistencia múltiple por los tratamientos ( $P=0.5373$ ) (Figura 2).

La resistencia a antibióticos se ha convertido en unas de las mayores preocupaciones del mundo en la salud pública. Este provoca que un tratamiento de alguna infección causada por patógenos sea más difícil de curar convirtiéndose en infecciones aún más peligrosas. Se ha creado conciencia a nivel mundial acerca de este tema para evitar que se siga aumentando ese patrón de resistencia. En este estudio se buscaba una reducción a esta resistencia por medio del uso de probióticos. Realizando una comparación con otros estudios se logra confirmar datos del Centro de Control de Prevenciones de Enfermedades CDC, donde no establecen que un probiótico es capaz de reducir resistencia a pesar de que muestre un beneficio a la salud (CDC 2015). Investigaciones demuestran datos similares a este estudio manteniendo un comportamiento similar de *Campylobacter* spp.

Diversos estudios se han realizado para identificar las resistencias de antibióticos de *Campylobacter* spp. En Brasil analizaron la resistencia de *Campylobacter* aislado de ganado que presentaban o no diarrea. Se presentó que de las bacterias aisladas 12/25 (48%) tuvieron resistencia múltiple a antibióticos. En ese estudio se logró correlacionar que los antibióticos con mayor resistencia son los más utilizados como tratamiento en las ganaderías de Brasil (Miranda y Lage 2007). Con resultados similares en el estudio mencionado anteriormente en Washington State se encuentra que en medio de sus bacterias que presentaron prevalencia hubo una alta resistencia a antibióticos. Dentro de las cepas de *C. coli* un 72.7% fueron resistentes a uno o más antibióticos. La resistencia múltiple tuvo una mayor frecuencia ( $P<0.001$ ) en las cepas de *C. coli* con un 51.5% en comparación de *C. jejuni* donde solo un 5.1% presentaron múltiple resistencia (Bae *et al.* 2005).

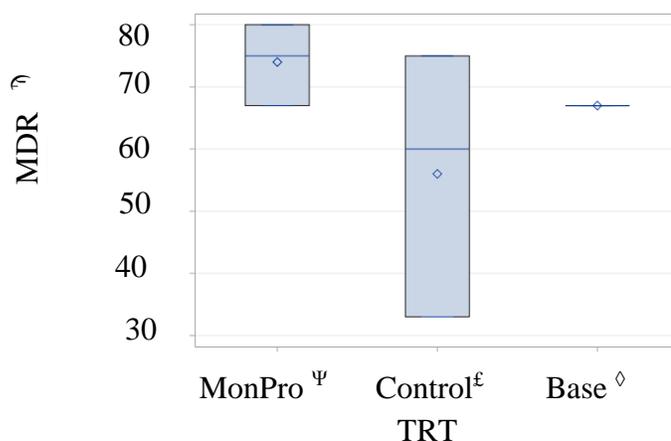


Figura 2. Efecto de las diferentes dietas en el resultado de resistencia múltiple a antibióticos.

<sup>η</sup> MDR Porcentaje de cepas Resistentes a múltiples antibióticos consiste en que la bacteria sea resistente a 2 o más antibióticos.

<sup>◊</sup> Tratamiento Base, consistía en la dieta tradicional sin microorganismos directamente alimentados (DFM) ni el uso de antibiótico como uso sub-terapéutico ni cualquier otro suplemento.

<sup>£</sup> Tratamiento Control, consiste en la dieta a base de maíz se le incluyó el antibiótico Tilosina (88 mg/animal/ día de la materia seca) y el suplemento monensina (330 mg/animal/día de la materia seca).

<sup>Ψ</sup> Tratamiento MonPro, consiste en la dieta a base de maíz y se le incluyó monensina (330 mg/animal/día de la materia seca) y el DFM que es *L. salivarius* en una proporción alimentaria de  $10^9$  ufc/animal/día.

Cuadro 7. Porcentaje de Resistencia múltiple a antibióticos (MDR<sup>η</sup>) de las muestras aisladas de *Campylobacter* spp.

Tratamiento	Día de recolección de muestras			
	Día 104	Día 116	Día 148	Total
Base <sup>◊</sup>	67% (2/3)	67% (2/3)	67% (4/6)	67% (8/12)
Control <sup>£</sup>	60% (3/5)	75% (3/4)	33% (2/6)	53% (8/15)
MonPro <sup>Ψ</sup>	80% (4/5)	67% (2/3)	75% (6/8)	75% (12/16)

<sup>η</sup> MDR Resistencia a múltiples drogas consiste en que la bacteria sea resistente a 2 o más antibióticos.

<sup>£</sup> Tratamiento Control, consiste en la dieta a base de maíz se le incluyó el antibiótico Tilosina (88 mg/animal/ día de la materia seca) y el suplemento monensina (330 mg/animal/día de la materia seca).

<sup>Ψ</sup> Tratamiento MonPro, consiste en la dieta a base de maíz y se le incluyó monensina (330 mg/animal/día de la materia seca) y el DFM que es *L. salivarius* en una proporción alimentaria de  $10^9$  ufc/animal/día.

<sup>◊</sup> Tratamiento Base, consistía de la dieta tradicional sin DFM ni el uso de antibiótico como uso sub-terapéutico ni cualquier otro suplemento.

Para evitar la contaminación a lo largo de la cadena productiva, la industria alimentaria establece puntos de control para reducir la contaminación de patógenos. *Campylobacter* puede estar prevalente en el ganado durante el engorde y en su punto de cosecha en la superficie de la canal. Esta presencia de *Campylobacter* debe ser diferente en ambos puntos de la cadena mencionada. En un estudio localizado en Ghana aislaron la bacteria de *Campylobacter* spp. en ganado de carne donde estos pertenecían en una situación saludable. Dentro de las muestras prevalentes investigaron cuántas de esas bacterias presentaron resistencia a antibióticos. En el total de las muestras se encontró como resultado tres diferentes cepas siendo *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari* donde su multi-resistencia fue de 66.6% (156/234), 20.5% (48/234) y 12.8% (30/234), respectivamente. Con esos resultados resaltan la preocupación de consumir productos cárnicos contaminados que sean resistentes a antibióticos (Karikari *et al.* 2017).

Diferentes antibióticos pueden utilizarse como tratamiento para campylobacteriosis y por ello es vital conocer cuál puede ser el más eficiente controlando la bacteria. Dentro de este estudio se analizó la resistencia que tiene *Campylobacter* en nueve diferentes antibióticos. En su totalidad con un 63% fueron resistentes a tetraciclina siendo el antibiótico que los aislados de *Campylobacter* spp. tuvieron mayor resistencia (Cuadro 8). Se puede observar de manera detallada el porcentaje de resistencia en cada antibiótico. Y el patrón del resistencia de antibiótico en cada muestra prevalente a *Campylobacter* (Cuadro 9).

Cuadro 8. Patrones de resistencia a antibióticos de las muestras aisladas de *Campylobacter* spp. (n=43) a nueve diferentes antibióticos estudiados.

<b>Nombre de Antibióticos</b>	<b>% de Resistencia</b>
Tetraciclina	63
Clindamicina	53
Erytromicina	49
Azitromicina	40
Florfenicol	40
Ácido Nalidixico	33
Gentamicina	26
Telitromicina	7.0
Ciprofloxacina	0.0

Los Estados Unidos de América utilizan un estimado de 26.5 millones de libras de antibióticos como aditivos en la alimentación animal. De esa cantidad de antibióticos un millón de libras son utilizadas en los estados de Georgia, Arkansas, Texas, Alabama, Minnesota, Mississippi y Missouri. De esos antibióticos se utilizan el 12% como suplementación del ganado de carne, por ello la emergencia de resistencia a antibióticos es común. Antibióticos que pertenecen a siete clases son utilizados como aditivos alimenticios de la agricultura, los cuales también son importantes en los medicamentos para humanos. Los antibióticos utilizados tanto en la agricultura como en los humanos se incluye tetraciclinas, macrolidas, lincosamidas y aminoglucósidos (Florini *et al.* 2005). Por este constante uso de antibióticos en Texas ha se encontrado una alta resistencia a los principales antibióticos utilizados en la suplementación. Aislados de *Campylobacter* tienen patrones de resistencia que varía dependiendo de los países pero se encuentran de forma constante

resistencia a tetraciclina de un 81%. Los siguientes antibióticos que con mayor frecuencia se encuentra resistencia son los quinolonas perteneciendo dentro de ellos el ácido nalidíxico y ciprofloxacinas (Karikari *et al.* 2017).

Cuadro 9. Patrones de resistencia en las diferentes muestras aisladas con *Campylobacter* spp. en diferentes antibióticos.

No. de muestra aislada de <i>Campylobacter</i> spp.	Día <sup>δ</sup>	Tratamiento	Nombre de Antibióticos que presentó la muestra resistencia <sup>φ</sup> .						
13	104	Control <sup>£</sup>	GEN						
35	104	Base <sup>◇</sup>	GEN						
36	104	Control	GEN						
32	104	MonPro <sup>Ψ</sup>	GEN						
19	116	MonPro	TET						
27	148	Base	NAL						
29	148	Control	NAL						
41	148	MonPro	NAL						
30	148	Control	GEN						
38	148	Base	NAL						
35	148	MonPro	NAL						
21	116	Base	TET						
8	116	ControlP	TET						
13	148	Control	TET						
5	104	Control	NAL	CLI					
22	104	Base	ERY	CLI					
32	148	Base	GEN	NAL					
37	148	MonPro	GEN	NAL					
36	148	Control	GEN	NAL					
28	148	MonPro	GEN	TET	NAL				
7	148	Base	ERY	TET	CLI				
31	148	MonPro	AZI	TET	TEL	CLI			
39	148	Base	AZI	ERY	TET	CLI			
3	148	MonPro	ERY	TET	FFN	CLI			
24	116	Control	ERY	TET	FFN	CLI			
27	116	Control	ERY	TET	FFN	CLI			
3	116	Base	AZI	ERY	TET	CLI			
20	104	Control	AZI	ERY	TET	FFN	CLI		
23	104	MonPro	AZI	ERY	TET	FFN	CLI		
10	104	MonPro	AZI	ERY	TET	FFN	CLI		
31	104	Control	AZI	ERY	TET	FFN	CLI		

Continuación del cuadro 9.

No. de muestra aislada de <i>Campylobacter</i> spp.	Día <sup>δ</sup>	Tratamiento	Nombre de Antibióticos que presentó la muestra resistencia <sup>φ</sup> .					
29	104	MonPro	AZI	ERY	TET	FFN	CLI	
34	116	MonPro	ERY	TET	FFN	NAL	CLI	
2	116	Base	AZI	ERY	TET	TEL	CLI	
6	116	MonPro	AZI	ERY	TET	FFN	CLI	
26	148	MonPro	AZI	ERY	TET	FFN	CLI	
2	148	Base	AZI	ERY	TET	FFN	CLI	
9	148	MonPro	AZI	ERY	TET	FFN	CLI	
40	148	Control	AZI	ERY	TET	FFN	NAL TEL	
9	104	MonPro	AZI	ERY	GEN	TET	FFN CLI	
24	104	Control	AZI	ERY	TET	FFN	NAL CLI	
36	116	Control	AZI	ERY	TET	FFN	NAL CLI	

<sup>δ</sup> Los días consisten del periodo de tiempo donde el ganado se alimentó de las diferentes dietas evaluadas.

<sup>φ</sup> Los antibióticos evaluados fueron dictados por el CLSI (Instituto Estándar de Clínica y Laboratorio)

<sup>£</sup> Tratamiento Control, consiste en la dieta a base de maíz se le incluyó el antibiótico Tilosina (88 mg/animal/ día de la materia seca) y el suplemento monensina (330 mg/animal/día de la materia seca).

<sup>Ψ</sup> Tratamiento MonPro, consiste en la dieta a base de maíz y se le incluyó monensina (330 mg/animal/día de la materia seca) y el microorganismos directamente alimentados (DFM) que es *L. salivarius* en una proporción alimentaria de 10<sup>9</sup> ufc/animal/día.

<sup>◇</sup> Tratamiento Base, consistía de la dieta tradicional sin DFM ni el uso de antibiótico como uso sub-terapéutico ni cualquier otro suplemento.

GEN. Gentamicina; CLI. Clindamicina; AZI. Azitromicina; ERY. Eritromicina; TEL. Telitromicina; FFN. Florfenicol; CIP. Ciprofloxacina; NAL. Ácido Nalidixico; TET. Tetraciclina.

El uso de antibióticos para tratar *Campylobacter* es controversial y más cuando estos antibióticos no son tan eficientes, ya que la bacteria desarrolla resistencia hacia ellos. Esta resistencia a diversos antibióticos puede variar alrededor del mundo teniendo resistencias a diferentes antibióticos dependiendo de su manejo y su frecuencia. A nivel mundial se revela que en todos los países existe la emergencia de resistencia a antibióticos. Esta resistencia a antibióticos debe conocerse para reducir el uso de antibióticos con alta resistencia por parte de bacterias y buscar nuevas alternativas para el control de enfermedades (WHO 2014).

En Francia se realizó una investigación que constó de una recopilación de datos de los años 2002 a 2006 evaluando la prevalencia y resistencia a antibióticos de *C. jejuni* y *C. coli*. Se encontró una alta resistencia de parte de los aislados al antibiótico de tetraciclina seguido por ácido nalidíxico. Durante los años evaluados la proporción de los aislados resistentes a

los antibióticos estudiados fue constante con la excepción de ácido nalidíxico y fluoroquinolonas que presentaron una tendencia en aumentar su resistencia (Châtre *et al.* 2010).

La Unión Europea reportó en el año 2014 los diferentes patrones de resistencia de bacterias a diversos antibióticos, y como éstas actúan de forma diferente según especies. Se mostró que la bacteria *Campylobacter*, aislada de una población avícola, tuvo una alta resistencia a fluoroquinolonas (ciprofloxacinas y ácido nalidíxico) y tetraciclinas. El uso de los antibióticos macrólidos es alta, donde azitromicina y eritromicina forman parte, ya que en las aves se utilizan constantemente al momento de tratar infecciones de *Campylobacter*. La resistencia en *Campylobacter* a macrólidos es generalmente causada por una mutación en el ribosoma RNA y proteínas ribosomales. Esta resistencia comenzó en los años de 2014 predicando que éste podría extenderse rápidamente llegando a tener un patrón de resistencia similar a la tetraciclina (EFSA 2016). En nuestro experimento esta hipótesis se acepta ya que fueron de los antibióticos que presentaron mayor resistencia.

Constantemente se realizan estudios donde examinan aislados de *Campylobacter* y su comportamiento en antibióticos. En corrales de engordes en Estados Unidos se recolectaron muestras de ganados durante los años de 1999-2000. En donde 12 antibióticos se evaluaron, y *Campylobacter* mostró mayor resistencia a tetraciclina, ácido nalidixico y a ciprofloxacinas (Englen *et al.* 2005). La Europea inocuidad de alimentos (EFSA) y el Centro Europeo de Control y Prevención de Enfermedades (ECDC) reportan una tendencia de los patrones de resistencia de antibiótico de *Campylobacter* con los resultados obtenidos de NARMS, Sistema de Monitoreo Nacional de Resistencia a Antibióticos. Esta entidad registra que al antibiótico que *Campylobacter* presenta mayor resistencia es a la tetraciclina siguiéndolo son los quinolonas incluyendo ciprofloxacina y ácido naladíxico. La frecuencia en la resistencia a los demás antibióticos incluye gentamicina, clindamicina, azitromicina, eritromicina, telitromicina y cloranfenicol son significativamente bajos variando entre muestras (Lapierre *et al.* 2016).

En Finlandia se demostró el patrón de resistencia en los antibióticos macrólidos durante 2003 a 2005. Este estudio concluyó que a pesar de la frecuencia en que los aislados sean más susceptibles a este grupo de antibióticos, existe una correlación a la resistencia múltiple a antibióticos. Las cepas resistentes a macrólidos mostraron uniformemente resistencia múltiple a antibióticos. Siendo la cepa de *C. coli* que mostró mayor resistencia a macrolidas en comparación de *C. jejuni*. Las cepas en el estudio resistentes a eritromicina presento al mismo tiempo resistencia en su mayoría al antibiótico de tetraciclina y fueron susceptibles a cloranfenicol. El Cloramfenicol, a pesar de que demuestre susceptibilidad, no es permitido utilizarlo de manera sistemática (Lehtopolku *et al.* 2010). En este estudio, la susceptibilidad al Cloranfenicol no se analizó ya que CLSI no ha probado sus puntos de quiebre.

El uso de antibióticos como suplemento terapéutico se ha utilizado en la producción animal siendo una causa del desarrollo de resistencia a antibióticos por parte de las bacterias. Muchas investigaciones se enfocan en buscar el efecto de suplementar antibióticos a ganados vacunos y ver su relación a la resistencia de antibiótico. Tratamientos que consisten en antibióticos de clortetraciclina, viginiamicina y una combinación de monensina con tilosina en comparación de un control sin agente antimicrobiano se estudiaron. Los resultados encontrados demuestran que administrar antibióticos al ganado afecta en la

resistencia de antibiótico de *Campylobacter*. Se observó una evolución en la resistencia de tetraciclina pero fue limitado en otros antibióticos como eritromicina y ciprofloxacina (Inglis *et al.* 2005). En cambio en otro estudio evaluando dos granjas de ganado lechero convencional y otra orgánica sugieren que la resistencia a tetraciclina es creada de manera natural por la población de *Campylobacter* ya que resultados de ambas granjas fueron similares no afectando el uso de agentes antimicrobianos (Sato *et al.* 2004). Este resultado puede ser afectado dependiendo de la salud del animal y que tan constante han sido administrados antibióticos como uso terapéutico.

La resistencia a tetraciclina ha sido frecuente en los aislamientos de *Campylobacter*. Se ha demostrado que *Campylobacter* tiene un gen de resistencia Tet (O) que codifica una proteína de protección ribosomal. Trabajos de este gen demuestran que la proteína reconoce el sitio A abierto sobre el ribosoma bacteriano y lo une de tal manera que induce a un cambio conformacional dando como resultado la liberación de la molécula unida de tetraciclina. De esa manera durante un periodo extenso ha logrado que ese cambio conformacional sea dado a lo largo de la proteína siendo eficiente en su resistencia (Luangtongkum *et al.* 2009).

En diversos estudios *Campylobacter* no demuestra alta resistencia a clindamicina a pesar de pertenecer al grupo de antibióticos de lincosamidas. Las lincosamidas son utilizadas en la industria para controlar un amplio rango de patógeno, pero el uso de clindamicina en la industria no ha sido común. Por ello, no han declarado una alta resistencia por parte de las bacterias. En cambio otros antibióticos que pertenecen a las lincosamidas han sido utilizada de manera general ya que son capaces de inhibir la síntesis de proteína de la bacteria uniéndose al ribosoma 50S provocando una inhibición al crecimiento microbiano (Mayers *et al.* 2009). Organismos tratados por este grupo de antibióticos desarrollan una mutación, para inactivar su modo de acción, por la vía de catalización de la adenilación por enzimas codificadas por genes Lin. Se ha demostrado que la mutación del gen LinB inactivan el antibiótico de clindamicina (Morar *et al.* 2009).

La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) ha implementado nuevas políticas para evaluar la resistencia antimicrobiana asociada con el uso de antibióticos en animales. El FDA Declaró que el uso de antibióticos como tratamiento en enfermedades a animales es de suma importancia, pero su uso debe ser limitado a solo asegurar la salud animal; por ello, estudios que indican la relación de prevalencia y patrones de resistencia a antibióticos de diferentes patógenos respaldan las nuevas legislaciones (FDA 2012).

#### 4. CONCLUSIONES

- El uso de *Lactobacillus salivarius*, antibióticos o la dieta sin suplementación tienen el mismo efecto en la prevalencia de *Campylobacter* spp.
- El probiótico *Lactobacillus salivarius* L28 puede ser un reemplazo potencial para los antibióticos como uso sub-terapéutico en la dieta de ganado de carne.
- Los patrones de resistencia demuestran que *Campylobacter* spp. fue resistente a los mismos antibióticos a través del tiempo sin importar cuál fue el periodo en que el animal fue sometido a las diferentes dietas.

## 5. RECOMENDACIONES

- Analizar la prevalencia y resistencia de antibióticos de *Campylobacter* spp. antes de someter el ganado a las diferentes dietas para comparar los resultados y comprender el efecto de los tratamientos en el animal.
- Obtener las muestras fecales por tracto rectal o hisopado rectal para evitar contaminación del ambiente al recogerlas directamente del suelo.
- Realizar pruebas donde se demuestre que *Lactobacillus salivarius* logró colonizar al tracto intestinal del animal, logrando relacionarlo con el porcentaje de prevalencia.
- Comparar los resultados obtenidos con estudios paralelos realizados en la universidad de Texas Tech donde se analizó el efecto de los tratamientos con diversos patógenos y su impacto en la calidad de la carne.
- Evaluar el uso de *Lactobacillus salivarius* en el concentrado animal sin el uso de monensina como suplemento para evitar posible efecto de éste en la resistencia de antibióticos de las cepas aisladas.
- Efectuar el experimento durante diferentes estaciones del año evaluando los factores de clima en la prevalencia de *Campylobacter* spp.

## 6. LITERATURA CITADA

Bae W, Kaya K, Hancock D, Call D, Park Y, Besser T. 2005. Prevalence and Antimicrobial Resistance of Thermophilic *Campylobacter* spp. from Cattle Farms in Washington State. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (1): 169-174. doi: 10.1128/AEM.71.1.169-174.2005.

Bezkorovainy A. 2001. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *The american journal of clinical nutrition.* 73 (2): 3995-4055. doi:1998-8207.

Castillo A, Campos D, Franco J, Brashears M. 2016. Presentation: Novel Lactic Acid Bacteria (L14 and L28) as a Biocontrol Agent for Inhibition of *Salmonella* in a Raw Chicken Fat Used as a Dog Food Ingredient. IAFP 2016 Annual Meeting (en línea). Consultado el 31 de mayo de 2017. Disponible en <https://iafp.confex.com/iafp/2016/webprogram/Paper11996.html>.

CDC (Center for Disease Control and Prevention). 2011. Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens - Volume 17, *Emerging Infectious Disease journal*, *Emerging Infectious Diseases* (en línea). Consultado el 10 de mayo de 2017. Disponible en [https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/1/p1-1101\\_article](https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/1/p1-1101_article).

CDC (Center for Disease Control and Prevention). 2013. Attribution of Foodborne Illnesses, Hospitalizations, and Deaths to Food Commodities by using Outbreak Data, United States, 1998–2008 (en línea). Consultado el 10 de mayo de 2017. Disponible en [https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/3/11-1866\\_article](https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/3/11-1866_article).

CDC (Center for Disease Control and Prevention). 2014. Infectious disease *Campylobacter* general information | Foodborne illnesses | CDC: *Campylobacter* (en línea). Consultado el 4 de mayo de 2017. Disponible en <https://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/campylobacter/index.html>.

CDC (Center for Disease Control and Prevention). 2015. Antibiotic resistance questions and answers (en línea). Consultado el 11 de junio de 2017. Disponible en: <https://www.cdc.gov/getsmart/community/about/antibiotic-resistance-faqs.html>.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2012. Breakpoints used for susceptibility testing for *Campylobacter* (en línea). Consultado el 3 de mayo de 2017. Disponible en: <https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/60401020/NARMS/ABXCampy.pdf>.

Châtre P, Haenni M, Meunier D, Botrel M, Calavas D, Madec J. 2010. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolated from Cattle between 2002 and 2006 in France. *Journal of Food Protection*. 73 (5): 825-831. doi: 10.4315/0362-028X-73.5.825.

Cole K, Farnell M, Donoghue AM, Stern NJ, Svetoch EA, Eruslanov BN, Volodina LI, Kovalev YN, Perelygin VV, Mitsevich EV *et al.* 2006. Bacteriocins Reduce *Campylobacter* Colonization and Alter Gut Morphology in Turkey Poults. *Poultry Science*. *EFSA Journal*. 14 (2): 1570-1575. doi: 10.1093/ps/85.9.1570.

Dhama k, Mahendra M, Tomar S, Chauham RS. 2008. Beneficial effects of probiotics and prebiotics in livestock and poultry: the current perspective. *INTAS POLIVET*. 9 (1):1-12. (en línea). Consultado el 9 de mayo de 2017. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/229596840\\_Beneficial\\_effects\\_of\\_probiotics\\_and\\_prebiotics\\_in\\_livestock\\_and\\_poultry\\_the\\_current\\_perspectives](https://www.researchgate.net/publication/229596840_Beneficial_effects_of_probiotics_and_prebiotics_in_livestock_and_poultry_the_current_perspectives).

DPH (Department of Public Health). 2016. Multidrug-Resistant Organisms (MDROs): What Are They? (en línea). Consultado el 11 de mayo de 2017. Disponible en <http://www.ct.gov/dph/cwp/view.asp?a=3136&q=424162>.

EFSA (European Food Safety Authority European Centre for Disease Prevention and Control). 2016. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. *ej EFSA Journal*. 14 (2) 4380. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4380.

Englen MD, Fedorka-Cray PJ, Ladely SR, Dargatz DA. 2005. Antimicrobial resistance patterns of *Campylobacter* from feedlot cattle. *Journal of Applied Microbiology* 2005, 99: 285–291. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02609.x.

FDA (U.S. Food and Drug Administration). 2012. The Judicious Use of Medically Important Antimicrobial Drugs in Food-Producing Animals. Division of Dockets Management. 26 p (en línea). Consultado el 30 de mayo de 2017. Disponible en <https://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM216936.pdf>. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02609.x.

FDA (U.S. Food and Drug Administration). 2014. Animal Health Literacy - Antimicrobial Resistant Bacteria in Animals and Food. Center for Veterinary Medicine (en línea). Consultado el 4 de mayo de 2017. Disponible en <https://www.fda.gov/animalveterinary/resourcesforyou/animalhealthliteracy/ucm240634.htm>.

Finch R. 2003. Antibiotic resistance—the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *The lancet Infectious Diseases*, 3: 47-51. doi: 10.1016/S1473309903004900.

Fitzgerald C, Stanley K, Andrew S, Jones K. 2001. Use of Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Flagellin Gene Typing in Identifying Clonal Groups of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Farm and Clinical Environments. *Appl Environ Microbiol*. 67(4): 1429–1436. doi: 10.1128/AEM.67.4.1429-1436.2001.

Florini K, Denison R, Stiffler T, Fitzgerald T, Goldberg R. 2005. Resistant bugs and antibiotic drugs (en línea). Consultado el 17 de junio de 2017. Disponible en [http://www.edf.org/sites/default/files/4301\\_AgEstimates.pdf](http://www.edf.org/sites/default/files/4301_AgEstimates.pdf).

Hakkinen M, Heiska H, Hanninen ML. 2007. Prevalence of *Campylobacter* spp. in cattle in Finland and antimicrobial susceptibilities of bovine *Campylobacter jejuni* strains. Appl. Environ. Microbiol. 73 (10): 3232-3238. doi: 10.1128/AEM.02579-06.

Hanlon K. 2015. Presence of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157 and *Campylobacter* in small-ruminants. Lubbock, Texas: Texas Tech University (Tesis). Consultado el 13 de mayo de 2017. Disponible en [https://ttu-ir.tdl.org/ttu-ir/bitstream/handle/2346/64347/Hanlon\\_Keelyn\\_Thesis.pdf?sequence=1](https://ttu-ir.tdl.org/ttu-ir/bitstream/handle/2346/64347/Hanlon_Keelyn_Thesis.pdf?sequence=1).

Haro J. 2012. Breakpoints campy. CLSI (en línea). Consultado el 2 de mayo de 2017. Disponible en <https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/60401020/NARMS/ABXCampy.pdf>.

Heyman M y Ménard S. 2002. Probiotic microorganisms how they effect intestinal pathophysiology (en línea). Consultado el 17 de mayo de 2017. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12222962>.

Inglis GD, McAllister TA, Busz HW, Yanke LJ, Morck DW, Olson ME, Read RR. 2005. Effects of subtherapeutic administration of antimicrobial agents to beef cattle on the prevalence of antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter hyointestinalis*. Appl. Environ. Microbiol. 71 (7): 3872-3881. doi: 10.1128/AEM.71.7.3872-3881.2005.

Karikari AB, Obiri-Danso K, Frimpong EH, Krogfelt KA. 2017. Antibiotic Resistance of *Campylobacter* Recovered from Faeces and Carcasses of Healthy Livestock. BioMed Research International, 17(2): 9 doi: 10.1155/2017/4091856.

Lapierre L, Arias M, Fernández H. 2016. Antimicrobial Resistance in *Campylobacter* spp. Springer International Publishing Switzerland. 10:165-182 doi: 10.1007/978-3-319-29907-5\_10.

Lastovica AJ. 2015. Evaluation of Three Commercial Latex Agglutination Tests for Identification of *Campylobacter* spp. American Society for Microbiology. Journal of Clinical Microbiology. 46 (10): 3546-3547. doi: 10.1128/JCM.01546-15.

Lehtopolku M, Nakari U-M, Kotilainen P, Huovinen P, Siitonen A, Hakanen AJ. 2010. Antimicrobial susceptibilities of multidrug-resistant *Campylobacter jejuni* and *C. coli* strains: *in vitro* activities of 20 antimicrobial agents. American Society for Microbiology. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 54 (3): 1232-1236. doi: 10.1128/AAC.00898-09.

Luangtongkum T, Jeon B, Han J, Plummer P, Logue CM, Zhang Q. 2009. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. Future Microbiology. 4 (2): 189-200. doi:10.1181/17460913.4.2.189.

Manyi-Loh C, Mamphwell S, Meyer E, Makaka G, Simon M, Okah A. 2016. An Overview of the Control of Bacterial Pathogens in Cattle Manure. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). International Journal of Environmental Research and Public Health. 13 (9): 843. doi: 10.3390/ijerph13090843.

Marchetti ML, Errecalde J, Mestorino N. 2011. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos ocasionados por bombas de eflujo. Impacto en la multiresistencia. (en línea). Consultado el 5 de mayo de 2017. Disponible en [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11280/Documento\\_completo.pdf?sequence=1](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11280/Documento_completo.pdf?sequence=1).

Mayers D, Lerner S, Ouellette M, Sobel J. 2009. Antimicrobial Drug Resistance. Human Press. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. 1: 211-673. doi: 10.1016/B978-0-12-138120-2.X5001-1.

Minihan D, Whyte M, O'Mahony M, Fanning S, McGill K, Collins J. 2003. *Campylobacter* spp. in Irish Feedlot Cattle: A Longitudinal Study Involving Pre-harvest and Harvest Phases of the Food Chain. Ireland. J. Vet. Med. B. 51: 28-33. doi: 10.1046/j.1439-0450.2003.00722.

Miranda KL, Lage AP. 2007. Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* sp strains isolated from calves with and without diarrhea in Minas Gerais state, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology. 38: 357-362. doi: 10.1590/S1517-83822007000200032.

Morar M, Bhullar K, Hughes DW, Junop M, Wright GD. 2009. Structure and mechanism of the lincosamide antibiotic adenylyltransferase LinB. Canada: Structure Article, Cell Press. 17: 1649-1659. doi: 10.1016/j.str.2009.10.013.

Murry AC, Hinton A, Morrison H. 2004. Inhibition of Growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Clostridia perfringens* on Chicken Feed Media by *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum* (en línea). Consultado el 17 de mayo de 2017. Disponible en <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.514.4773&rep=rep1&type=pdf>.

Nagaraja TG, Drouillard J, Renter D, Narayanan S. 2008. Distiller's grains and foodborne pathogens in cattle: Interaction and intervention. Kansas State University (en línea). Consultado el 25 de mayo de 2017. Disponible en [http://www.beefissuesquarterly.com/CMDocs/BeefResearch/Safety\\_Project\\_Summaries/FY07\\_Distiller%27s\\_grains\\_and\\_foodborne\\_pathogens.pdf](http://www.beefissuesquarterly.com/CMDocs/BeefResearch/Safety_Project_Summaries/FY07_Distiller%27s_grains_and_foodborne_pathogens.pdf).

NIH (National Institutes of Health, US). 2007. Understanding emerging and re-emerging infectious diseases (en línea). Consultado el 11 de junio de 2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20370/>.

Nouri M, Rahbarizadeh F, Ahmadvand D, Moosakhani F, Sadeqzadeh E, Lavasani S, Khoddami V. 2010. Inhibitory effects of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus crispatus* isolated from chicken gastrointestinal tract on *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* growth. Iranian Journal of Biotechnology. 8 (1): 32-37 (en línea).

Consultado el 12 de mayo de 2017. Disponible en: [http://www.ijbiotech.com/pdf\\_7125\\_453c4f5516993105f951d30f8cafe1f5.html](http://www.ijbiotech.com/pdf_7125_453c4f5516993105f951d30f8cafe1f5.html).

Oxoid. 2001. *Campylobacter* Blood-Free Selective Agar base. Thermo Fisher Scientific (en línea). Consultado el 11 de mayo de 2017. Disponible en [http://www.oxoid.com/uk/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=SR0155&org=154&c=uk&lang=en](http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=SR0155&org=154&c=uk&lang=en).

Oxoid. 2013. DR0150, *Campylobacter* Test Kit | Oxoid - Product Detail. Reyno Unido, Thermo Fisher Scientific (en línea). Consultado el 16 de mayo de 2017. Disponible en [http://www.oxoid.com/uk/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=DR0150&org=154&c=uk&lang=EN](http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=DR0150&org=154&c=uk&lang=EN).

Quigley J. 2011. Direct-Fed Microbials (Probiotic) in calf diets (en línea). Consultado el 18 de mayo de 2017. Disponible en <http://www.calnotes.com/pdffiles/CN157.pdf>.

R&F (Rheumatoid Factor) Products Laboratory. 2012. Material Safety Data Sheet (en línea). Consultado el 8 de mayo de 2017. Disponible en: <http://rf-products.net/>.

Saint-Cyr MJ, Haddad N, Taminiau B, Poezevara T, Quesne S, Amelot M, Daube G, Chemaly M, Dousset X, Guyard-Nicodeme M. 2015. Use of the potential probiotic strain *Lactobacillus salivarius* SMXD51 to control *Campylobacter jejuni* in broilers. International Journal of Food Microbiology. 247: 9-17. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.003.

Sato K, Bartlett PC, Kaneene JB, Downes FP. 2004. Comparison of Prevalence and Antimicrobial Susceptibilities of *Campylobacter* spp. Isolates from Organic and Conventional Dairy Herds in Wisconsin. Appl. Environ. Microbiol. 70 (3): 1442-1447. doi: 10.1128/AEM.70.3.1442-1447.2004.

Schamberger GP, Phillips RL, Jacobs JL, Diez-Gonzalez F. 2004. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 populations in cattle by addition of colicin E7-producing *E. coli* to feed. Appl. Environ. Microbiol. 70 (10): 6053-6060. doi: 10.1128/AEM.70.10.6053-6060.2004.

Simmons C. 2016. Sensititre CAMPY Plate Layout. Thermo SCIENTIFIC (en línea). Consultado el 3 de mayo de 2017. Disponible en: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Sensititre-Plate-Layout-CAMPY.pdf>.

Svetoch EA, Eruslanov BV, Levchuk VP, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Stepanshin J, Dyatlov I, Seal BS, Stern NJ. 2011. Isolation of *Lactobacillus salivarius* 1077 (NRRL B-50053) and characterization of its bacteriocin, including the antimicrobial activity spectrum. Appl. Environ. Microbiol. 83 (12): 69-80. doi: 10.1128/AEM.02481-10.

Tanner M. 2011. Microbial Pathogen Data Sheets: *CAMPYLOBACTER* (en línea). Consultado el 6 de mayo de 2017. Disponible en [http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Campylobacter-Organism\\_Causes.pdf](http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Campylobacter-Organism_Causes.pdf).

Thermo Scientific. 2016. Sensititre™ veterinary MIC plates (en línea). Consultado el 4 de julio de 2017. Disponible en: [http://www.trekds.com/products/sensititre/vet\\_ssmic.asp](http://www.trekds.com/products/sensititre/vet_ssmic.asp).

Tomley F, Shirley M. 2009. Livestock infectious diseases and zoonoses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 364: 2637-2642. doi: 10.1098/rstb.2009.0133.

Uyeno Y, Shigemori S, Shimosato T. 2015. Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity. *Microbes and Environments.* 30 (2): 126-132. doi: 10.1264/jsme2.ME14176.

Van Baale M, Sargeant M, Gnad D, DeBey B, Lechtenberg K, Nagaraja T. 2003. Effect of Forage or Grain Diets with or without Monensin on Ruminal Persistence and Fecal *Escherichia coli* O157:H7 in Cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (9): 5336–5342. doi: 10.1128/AEM.70.9.5336–5342.2004.

Vohra A, Syal P, Madan A. 2014. Probiotic yeasts in livestock sector. *Animal Feed Science and Technology.* 219: 31–47. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2016.05.019.

Wesley IV, Wells SJ, Harmon KM, Green A, Schroeder-Tucker L, Glover M, Siddique I. 2000. Fecal Shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in Dairy Cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (5): 1994-2000. doi: 10.1128/AEM.66.5.1994-2000.2000.

WHO (World Health Organization). 2014. WHO's first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health (en línea). Consultado el 11 de junio de 2017. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/>.

WHO (World Health Organization). 2015a. Infographics: Antibiotic resistance. World Health Organization (en línea). Consultado el 4 de mayo de 2017. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/events/2015/world-antibiotic-awareness-week/infographics/en/>.

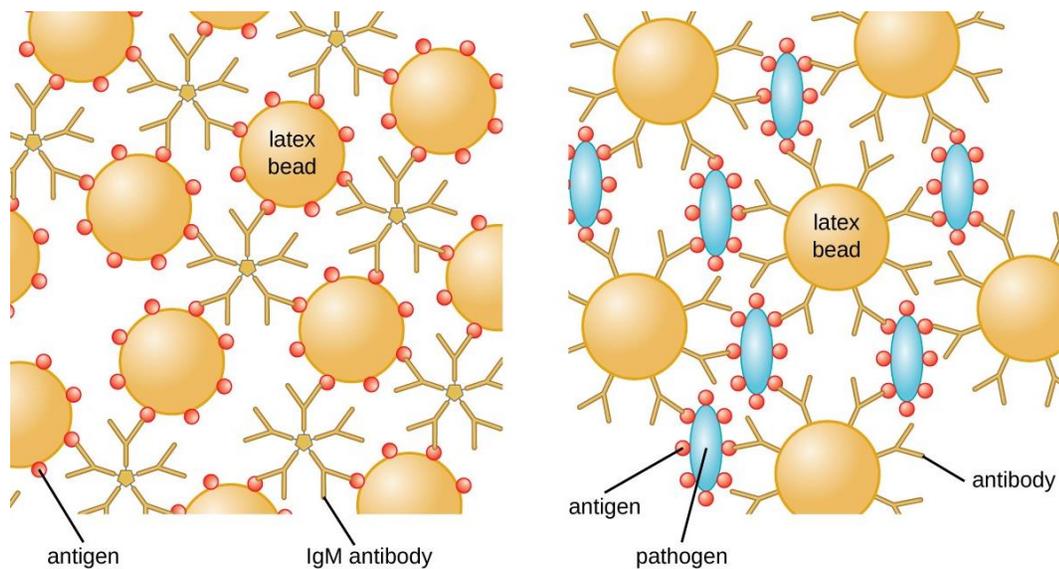
WHO (World Health Organization). 2015b. Food safety: Major foodborne illnesses and causes. World Health Organization (en línea). Consultado el 3 de mayo de 2017. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en/>.

WHO (World Health Organization). 2016. *Campylobacter*. World Health Organization (en línea). Consultado el 4 de mayo de 2017. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/es/>.

Yirga, H. 2015. The Use of Probiotics in Animal Nutrition. *Prob Health.* 3 (2): 132. doi: 10.4172/2329-8901.1000132.

## 7. ANEXOS

**Anexo 1.** Funcionamiento básico de la prueba bioquímica de aglutinación para confirmación de *Campylobacter* spp.



(a) Prueba positiva de aglutinación para anticuerpos  
(Lastovica 2015)

(b) Prueba positiva de aglutinación para antígenos

**Anexo 2.** Chi-Cuadrado realizado para cada día de recolección de muestra analizándolo por tratamiento

Tratamiento y Repetición (Días)	Categoría	Ob <sup>a</sup>	Es <sup>b</sup>	( Ob-Es  -0.5)	( Ob-Es  -0.5) <sup>2</sup>	( Ob-Es -0.5) <sup>2</sup> /Es
<b>Día 104 Control<sup>ψ</sup></b>	Prevalencia	5	6	-0.5	0.25	0.04
	No Prevalencia	7	6	0.5	0.25	0.04
						<b>0.08</b>
<b>Día 116 Control</b>	Prevalencia	6	6	0	0	0
	No Prevalencia	6	6	0	0	0
						<b>0</b>
<b>Día 148 Control</b>	Prevalencia	6	6	0	0	0
	No prevalencia	6	6	0	0	0
						<b>0</b>
<b>Día 104 MonPro<sup>◇</sup></b>	Prevalencia	5	6	-0.5	0.25	0.04
	No Prevalencia	7	6	0.5	0.25	0.04
						<b>0.08</b>
<b>Día 116 MonPro</b>	Prevalencia	4	6	-1.5	2.25	0.375
	No Prevalencia	8	6	1.5	2.25	0.375
						<b>0.75</b>
<b>Día 148 MonPro</b>	Prevalencia	8	6	1.5	2.25	0.375
	No Prevalencia	4	6	-1.5	2.25	0.375
						<b>0.75</b>
<b>Día 104 Base<sup>£</sup></b>	Prevalencia	3	6	-2.5	6.25	1.04
	No Prevalencia	9	6	2.5	6.25	1.04
						<b>2.08</b>
<b>Día 116 Base</b>	Prevalencia	4	6	-1.5	2.25	0.375
	No Prevalencia	8	6	1.5	2.25	0.375
						<b>0.75</b>
<b>Día 148 Base</b>	Prevalencia	6	6	0	0	0
	No Prevalencia	6	6	0	0	0
						<b>0</b>

<sup>a</sup> El número de individuos o eventos observados

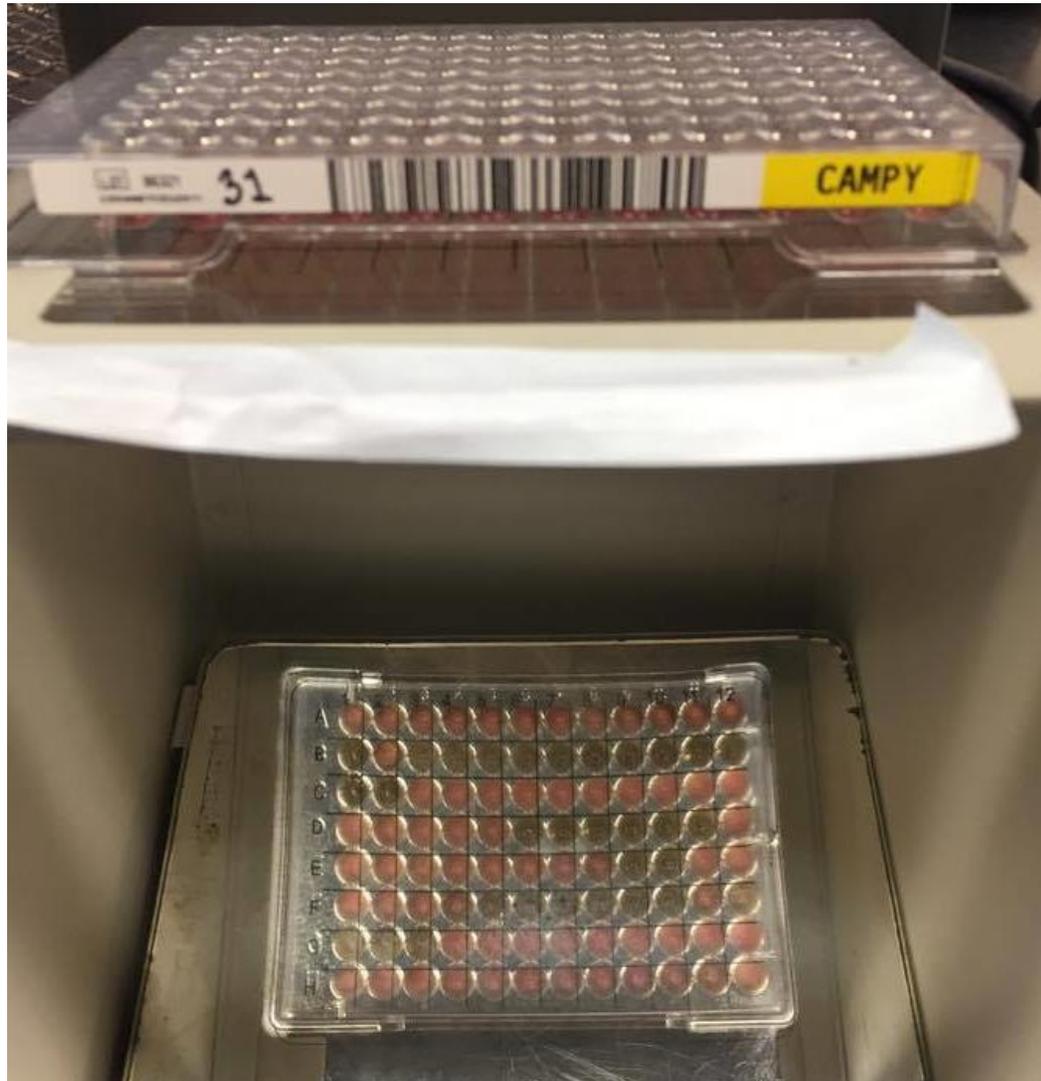
<sup>b</sup> Es el número teórico esperado de individuos.

<sup>ψ</sup> Tratamiento Control, consiste en la dieta a base de maíz se le incluyó el antibiótico Tilosina (88 mg/animal/ día de la materia seca) y el suplemento monensina (330 mg/animal/día de la materia seca).

<sup>◇</sup> Tratamiento MonPro, consiste en la dieta a base de maíz y se le incluyó monensina (330 mg/animal/día de la materia seca), y el microorganismos directamente alimentados (DFM) que es *L. salivarius* en una proporción alimentaria de 10<sup>9</sup> ufc/animal/día.

<sup>£</sup> Tratamiento Base, consistía de la dieta tradicional sin DFM ni el uso de antibiótico como uso sub-terapéutico ni cualquier otro suplemento.

**Anexo 3.** Imagen de lectura de resistencia a los antibióticos en diferentes concentraciones, pocillos turbios demuestran resistencia.



**Anexo 4.** Separación de medias por mínimo cuadrado de las diferencia entre que tratamiento presentó resistencia en los diferentes antibióticos.

<b>Antibióticos</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>LSmean <sup>η</sup> (%)</b>
Tetraciclina	MonPro <sup>◇</sup>	28.6 <sup>a</sup>
Tetraciclina	Control <sup>Ψ</sup>	24.3 <sup>ab</sup>
Clindamicina	MonPro	23.6 <sup>ab</sup>
Florfenicol	MonPro	22 <sup>abc</sup>
Eritromicina	MonPro	22 <sup>abc</sup>
Clindamicina	Control	20.3 <sup>abc</sup>
Florfenicol	Control	19.3 <sup>abcd</sup>
Azitromicina	MonPro	18.6 <sup>abcde</sup>
Eritromicina	Control	17.6 <sup>abcdef</sup>
Tetraciclina	Base <sup>£</sup>	15.0 <sup>abcdef</sup>
Clindamicina	Base	14.3 <sup>abcdefg</sup>
Eritromicina	Base	14.3 <sup>abcdefg</sup>
Ácido Nalidixico	Control	13.3 <sup>bcdefg</sup>
Azitromicina	Control	12.6 <sup>bcdefg</sup>
Gentamicina	Control	10.0 <sup>bcdefg</sup>
Azitromicina	Base	10.0 <sup>bcdefg</sup>
Ácido Nalidixico	MonPro	10.0 <sup>bcdefg</sup>
Gentamicina	MonPro	8.30 <sup>cdefg</sup>
Ácido Nalidixico	Base	5.00 <sup>defg</sup>
Gentamicina	Base	4.33 <sup>efg</sup>
Telitromicina	Base	3.30 <sup>fg</sup>
Telitromicina	Control	1.60 <sup>g</sup>
Telitromicina	MonPro	1.60 <sup>g</sup>
Florfenicol	Base	1.60 <sup>g</sup>
Ciprofloxacina	Base	0.00 <sup>g</sup>
Ciprofloxacina	Control	0.00 <sup>g</sup>
Ciprofloxacina	MonPro	0.00 <sup>g</sup>

<sup>η</sup> Medias de cuadrados mínimos con la misma letra no tienen diferencia significativa entre ellos.

<sup>Ψ</sup> El Tratamiento Control consiste en la dieta a base de maíz se le incluyó el antibiótico Tilosina (88 mg/animal/ día de la materia seca) y el suplemento monensina (330 mg/animal/día de la materia seca).

<sup>◇</sup> El Tratamiento MonPro consiste en la dieta a base de maíz y se le incluyó monensina (330 mg/animal/día de la materia seca), y el DFM que es *L. salivarius* en una proporción alimentaria de 10<sup>9</sup> ufc/animal/día.

<sup>£</sup> El Tratamiento Base consistía de la dieta tradicional sin DFM ni el uso de antibiótico como uso sub-terapéutico ni cualquier otro suplemento.

**Anexo 5.** Formato del plato de *Campylobacter* spp. con los antibióticos analizados Sensititre™.

**SENSITITRE CAMPY PLATE FORMAT**

Plate Code:		CAMPY												Plate Type:		MIC											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	ANTIMICROBICS													
A	AZI	AZI	AZI	AZI	AZI	AZI	AZI	AZI	AZI	AZI	AZI	AZI	AZI	AZI	Azithromycin												
	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	CIP	Ciprofloxacin													
B	AZI	CIP	CIP	CIP	CIP	CIP	CIP	CIP	CIP	CIP	CIP	CIP	CIP	ERY	Erythromycin												
	64	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	GEN	Gentamicin													
C	CIP	CIP	ERY	ERY	ERY	ERY	ERY	ERY	ERY	ERY	ERY	ERY	ERY	TET	Tetracycline												
	32	64	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	FFN	Florfenicol													
D	ERY	ERY	GEN	GEN	GEN	GEN	GEN	GEN	GEN	GEN	GEN	GEN	TET	NAL	Nalidixic Acid												
	32	64	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	0.06	TEL	Telithromycin													
E	TET	TET	TET	TET	TET	TET	TET	TET	TET	TET	TET	FFN	FFN	CLI	Clindamycin												
	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	0.03	0.06	POS	Positive Control													
F	FFN	FFN	FFN	FFN	FFN	FFN	FFN	FFN	FFN	FFN	FFN	NAL	NAL														
	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	4	8															
G	NAL	NAL	NAL	TEL	TEL	TEL	TEL	TEL	TEL	TEL	TEL	TEL	TEL														
	16	32	64	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4															
H	TEL	CLI	CLI	CLI	CLI	CLI	CLI	CLI	CLI	CLI	CLI	CLI	POS														
	8	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16																

(Thermo scientific 2016)