Universidad Nacional del Nordeste

Campilobacterias termotolerantes en ambientes acuáticos de uso recreacional y supervivencia en condiciones de laboratorio controladas

Tesis para acceder al Grado de

Doctor en Biología de la Universidad Nacional del Nordeste

Autora: Bioq. Esp. María Lucrecia Gariboglio Vázquez

Director: Dr. Luis A. Merino

Resistencia, Chaco, Argentina

Año 2018

Agradecimientos **a:**

Mis padres por haberme incentivado siempre a estudiar y por enseñarme a no rendirme y siempre dar mi mejor esfuerzo

Mi esposo e hijos por ser mi sostén diario y por darme esa cuota de felicidad que me lleva a cumplir hoy con esta nueva etapa

Mi amiga Fernanda Tracogna por tentarme a seguir sus pasos y ayudarme a descubrir la magia de la investigación

A mi director por el apoyo incondicional

A la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la U.N.N.E. por el apoyo económico brindado

A todas las personas que participaron de una u otra forma ya que sin su colaboración este proyecto no hubiera sido posible: Silvina Lösch, Lidia N. Acevedo (mamá Kelly), Jorge Aquino

A TODOS GRACIAS

Índice

Agradecimientos a: i
Abreviaturas vi
RESUMEN vii
ABSTRACT xiii
INTRODUCCIÓN 1
El agua como recurso vital y reservorio de posibles patógenos 1
Lagunas y ríos como espacios recreacionales 2
Indicadores de calidad del agua 3
1.1 Requisitos para ser considerado indicador de contaminación fecal 4
1.2 Metodología para cuantificación de indicadores en muestras de agua 5
Características del género *Campylobacter* 6
Taxonomía y especies de importancia para el hombre 6
Condiciones necesarias para su crecimiento 7
Epidemiología de las infecciones por *Campylobacter* 8
Principales reservorios 9
Modo de transmisión 9
Manifestaciones clínicas de las campilobacteriosis 10
Papel del agua en la ecología de Campylobacter 11
Contribución del agua a la carga de infecciones por *Campylobacter* 12
Condiciones que afectan la permanencia de la bacteria en el ambiente 13
Mecanismos de supervivencia de *Campylobacter* 13
1.1 Formación de biofilms 14
1.2 Formas viables no cultivables (VBNC)resultados del estrés acuático 14
1.3 Asociación de Campylobacter a protozoos 15
1.4 Interacción de Campylobacter con los microorganismos presentes en las aguas 15
Factores externos que afectan la supervivencia de *Campylobacter* 16
1.1 Influencia de la radiación solar y luz UV 16
1.2 Influencia de la temperatura y variaciones estacionales 17
1.3 Asociación de *Campylobacter* con las lluvias 18
Recuperación de campilobacterias a partir de muestras ambientales. 18

1.1 Métodos de concentración, enriquecimiento y cultivo 19
1.2 Uso de PCR en la detección de Campilobacterias en aguas 21
Estudios previos realizados en aguas 24
FUNDAMENTACIÓN 26
HIPOTESIS 27
OBJETIVOS 27
MATERIALES Y MÉTODOS 28
1.- Detección de *Campylobacter* en muestras de agua 28
Descripción del área de estudio 28
Tipos de sitios muestreados 30
Registro de datos de las muestras 32
Obtención de las muestras 32
Procesamiento de las muestras 32
1 Filtración a través de membranas 32
2 Enriquecimiento de las muestras 34
3 Recuento de coliformes totales y E. coli 34
4 Aislamiento bacteriano 35
5 Identificación bacteriana 35
6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) 37
Procesamiento estadístico de datos 38
2.- Estudio de la sobrevida de *Campylobacter* bajo condiciones controladas de laboratorio 38
Estudio de supervivencia a temperatura ambiente sin exposición a la luz solar 39
Estudio de supervivencia a temperatura en refrigerador 39
Estudio de supervivencia a temperatura ambiente con exposición a la luz solar 40
RESULTADOS 41
1- Estudio de muestras ambientales 41
2- Estudios de supervivencia en condiciones controladas 41
2.1- Prueba de supervivencia a temperatura ambiente al resguardo de la luz solar 41
2.2- Prueba de supervivencia a temperatura de refrigerador 43
2.3- Prueba de supervivencia a temperatura ambiente con exposición a la luz solar 44
DISCUSIÓN 45
Detección de campilobacterias en ambientes acuáticos 45

Influencia de la temperatura del agua en la sobrevida de *Campylobacter* 47
Influencia de la radiación UV en la sobrevida de *Campylobacter*..... 49
Influencia de las precipitaciones en la presencia de *Campylobacter* en ambientes acuáticos 50
Influencia del origen de las cepas en la sobrevida de *Campylobacter* 51
Relación de la presencia de *Campylobacter* con indicadores de contaminación fecal 51
Relación de la sobrevida de *Campylobacter* con la flora autóctona..... 54
Influencia del pH en la sobrevida de *Campylobacter*..... 54
Influencia del ambiente circundante en la presencia de *Campylobacter*..... 55
CONCLUSIONES..... 58
RECOMENDACIONES 60
ANEXO I: Pruebas de identificación bacteriana y tablas de diferenciación de especies..... 61
ANEXO II: Protocolo de trabajo para la reacción PCR para detección de *Campylobacter jejuni y Campylobacter coli* en muestras de agua ambiental..... 64
ANEXO III: Límite de detección de la PCR 68
ANEXO IV: Datos de las muestras ambientales 69
BIBLIOGRAFIA 71
PRESENTACIONES A CONGRESO Y PUBLICACIONES EN REVISTAS 87
TRABAJOS PUBLICADOS..... 88
TRABAJOS EN PRENSA 88
TRABAJOS TERMINADOS, AUN NO SOMETIDOS A PUBLICACIÓN..... 89
APORTES DE ESTE TRABAJO 90

Indice de Tablas

Tabla I: Condiciones necesarias para el crecimiento de *Campylobacter* spp 8

Tabla II Resultados obtenidos durante 28 días de incubación a temperatura ambiente sin exposición a la luz solar del agua inoculada con *C. jejuni* 42

Tabla III: Resultados obtenidos durante 28 días de incubación a temperatura de refrigerador sin exposición a la luz solar del agua inoculada con *C. jejuni* 43

Tabla IV: Tabla de frecuencia según sitio de muestreo……...56

Indice de Gráficos

Gráfico I: UFC/ml en función de los días de estudio 42
Gráfico II: UFC/ml en función de los días de estudio 43

Indice de Figuras

Fig. 1: Laguna Navarro Avenida 9 de Julio y Avenida Urquiza (Resistencia) 30
Fig. 2: Laguna Los Lirios - Avenida 9 de Julio y calle 12 (Resistencia) 30
Fig. 3: Laguna Argüello - Calle Ayacucho (Resistencia) 30
Fig. 4: Río Negro - Puente Ejército Argentino (Resistencia) 30
Fig. 5: Laguna Colussi - Avenida Sarmiento (Resistencia) 30
Fig. 6: Río Paraná: Altura Club de Regatas (Corrientes) 30
Fig. 7: Mapa sitios de muestreo ciudad de Resistencia 31
Fig. 8: Mapa sitios de muestreo ciudad de Corrientes 31
Fig. 9: Equipo de filtración 33
Fig. 10: Dispositivo con membrana filtrante 33
Fig. 11: Membranas filtrantes 33
Fig. 12: Membrana filtrante con medio mENDO 34
Fig. 13: Desarrollo de colonias de *Campylobacter spp*. en el medio de cultivo CCDA modificado 35
Fig. 14: Coloración de Gram de una colonia que desarrolló en microaerofilia (1000X) 36
Fig. 15: Pruebas bioquímicas 36
Fig. 16: Prueba de oxidasa 37
Fig. 17: PCR múltiple para detección simultanea de *C. jejuni* y *C. coli* 38
Fig. 18: Foto de corrida electroforética. Límite de detección PCR 68

Abreviaturas

ABC	Agar Base Columbia
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
ANLIS	Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud
APA	Administración Provincial del Agua
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin trifosfato
CF	Coliformes Fecales
cm	centímetros
cols.	colaboradores
CO_2	Dióxido de Carbono
CT	Coliformes Totales
ECDC	Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
FDA	Administración de Drogas y Alimentos de E.E.U.U.
GBS	Síndrome de Guillain Barré
H_2O_2	Agua oxigenada
H_2S	Ácido sulfhídrico
hs.	horas
ISO	International Standards Organization
km²	Kilómetros cuadrados
LAC	Agua de Laguna inoculada con *C. jejuni*
LEC	Agua de Laguna Esterilizada inoculada con *C. jejuni*
mCCDA	Agar Desoxicolato Cefoperazona Carbón modificado
ml	mililitros
mm	milímetros
µm	micrómetros
N_2	Nitrógeno
NaCl	Cloruro de Sodio
nm	Nanómetros
NMP	Número más Probable
O_2	Oxígeno molecular
OMS	Organización Mundial de la Salud
ºC	Grados Celsius
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Logaritmo negativo de la concentración de Protones
PHLS	Servicios de Laboratorio de Salud Pública del Reino Unido
RPM	Revoluciones por minuto
TSI	Agar-hierro-triple azúcar
UFC	Unidades formadoras de Colonia
UNNE	Universidad nacional del Nordeste
US	United States (EEUU)
UV	Ultravioleta
UVB	Rayo ultravioleta clase B
v/v	Volumen en Volumen
VBNC	Viable No Cultivable

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La presencia de campilobacterias en ambientes acuáticos ha sido estudiada por diferentes autores con resultados variables: algunos autores no lograron detectarlas y otros informan altas frecuencias de aislamiento.

Fueron reportados diferentes factores bióticos y abióticos que podrían influir sobre la presencia de especies de *Campylobacter* en aguas superficiales, entre los que se incluyen el contenido de oxígeno, la presencia de nutrientes, la temperatura, el pH, el tipo de agua, la exposición a la luz ultravioleta (UV), la humedad, el origen de la cepa, e interacciones bióticas. A pesar de las discrepancias, la temperatura, la interacción con la flora autóctona y la radiación solar, son consideradas como los factores determinantes de supervivencia más significativos dentro de los ambientes acuáticos.

Campylobacter coloniza el tracto digestivo de un amplio rango de huéspedes animales de sangre caliente, siendo las aves de corral el reservorio de mayor importancia, el cual puede constituir la fuente de contaminación para el hombre, otros animales, alimentos y cuerpos de agua. El género *Campylobacter* se ha expandido de manera constante y actualmente comprende 21 especies y 8 subespecies. Cuatro especies son conocidas como "Campilobacterias termotolerantes", ellas son *Campylobacter jejuni (C. jejuni), Campylobacter coli (C. coli), Campylobacter lari (C. lari) y Campylobacter upsaliensis (C. upsaliensis).* Las únicas especies de importancia para la salud pública debido a su rol como enteropatógenos son *C. jejuni* (80%), y *C. coli* (10%), estos son agentes zoonóticos de infecciones intestinales que pueden contaminar cuerpos de agua. Ambas especies pueden sobrevivir en agua, desde unos pocos días a varias semanas dependiendo de la temperatura del agua.

El agua juega un rol importante en la ecología de *Campylobacter* spp. Este es ubicuo en el medio ambiente ya que se ha aislado de arroyos, ríos, lagos, lagunas, estanques, arroyos, estuarios, canales de drenaje, aguas subterráneas, bahías, aguas marinas, aguas no tratadas contaminadas con materia fecal; además se registraron brotes a partir de agua corriente.

El agua de uso recreacional está contaminada regularmente con materia fecal por su carácter de superficial y como resultado de ello, las superficies acuosas contienen microorganismos relacionados con infecciones gastrointestinales humanas. El destino de estos microorganismos suele ser más de supervivencia que de crecimiento, por lo cual el agua puede ser considerada como un importante reservorio y a la vez un vehículo de transmisión de estos.

Pese al uso de medios de enriquecimiento y técnicas de filtración, el cultivo de *Campylobacter* a partir de muestras de agua (como en la mayoría de las muestras ambientales) es en muchas ocasiones de muy bajo rendimiento.

FUNDAMENTACIÓN

De la exhaustiva revisión bibliográfica realizada en bases de datos nacionales e internacionales, no se encontraron trabajos hechos en Argentina en los que se estudiara la presencia de *Campylobacter* en ambientes acuáticos.

Debe destacarse que la vigilancia de los microorganismos patógenos en los ambientes frecuentados por la población es clave para entender la epidemiología de las enfermedades humanas y poder establecer medidas profilácticas y /o de control.

Teniendo en consideración que en nuestra región coexisten muchos factores ecológicos que podrían facilitar la transmisión de campilobacterias, el conocimiento que se tenga de la distribución de estas bacterias, podría ser un dato epidemiológico que contribuiría a mejorar las medidas de prevención y control de esta zoonosis.

Todo lo antedicho despertó el interés por conocer cuál es la relación entre estos patógenos a fin de descartar o incluir al medio acuático natural como reservorio de campilobacterias a la vez que se propone estudiar la sobrevida de estas bacterias en el laboratorio bajo condiciones controladas similares a las de los ambientes acuáticos de nuestra región, a fin de conocer si los factores ambientales condicionan la presencia de *Campylobacter* en aguas de uso recreacional de nuestra región.

HIPÓTESIS

- Los ambientes acuáticos de uso recreacional de nuestra zona se comportan como reservorios de especies termotolerantes de *Campylobacter* patógenas para el hombre.

- La presencia de estas especies en dichas fuentes de agua está condicionada por la contaminación fecal y determinadas variables ambientales propias de estos espacios.
- La sobrevida de *Campylobacter* en condiciones experimentales controladas permite explicar la presencia o ausencia de especies de este patógeno en ambientes naturales.

OBJETIVOS

- Objetivo 1: Evaluar el papel del agua de uso recreacional como reservorio de dos especies termotolerantes de *Campylobacter*.
  - Estudiar la presencia de *C. jejuni* y *C. coli* en ambientes acuáticos de uso recreacional mediante técnicas de cultivo y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
  - Determinar el grado de contaminación fecal de las lagunas y ríos mediante el recuento de *Escherichia coli (E. coli)* y coliformes totales.
  - Registrar variables ambientales al momento de la recolección de muestras.
- Objetivo 2: Estudiar el tiempo de supervivencia de *C. jejuni* bajo diferentes condiciones experimentales controladas:
  - A diferentes temperaturas (ambiente y de refrigerador).
  - En presencia de radiación solar UV por exposición directa a la luz solar.
  - En presencia y ausencia de flora acompañante.
- Objetivo 3: Relacionar los resultados obtenidos en los ambientes naturales con la supervivencia de *C. jejuni* en condiciones controladas de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron muestras de agua provenientes de fuentes superficiales (ríos y lagunas) utilizadas con fines recreacionales. Cada muestra incorporada estuvo acompañada de datos acerca de su origen, fecha y hora de la recolección, turbidez, temperatura y pH del agua y precipitaciones previas. La metodología general empleada fue la de filtración a través de membranas de nitrocelulosa utilizando filtros de 0,45 µm y 0,2 µm para cada muestra de agua utilizando una bomba de vacío. Cada filtro por separado se colocó en caldo de enriquecimiento selectivo Bolton. Se realizaron repiques en medio mCCDA (Agar Cefoperazona Carbón Desoxicolato modificado) que se incubaron en atmósfera

microaerofílica. A las colonias presuntivas se le realizaron las correspondientes pruebas bioquímicas. Adicionalmente se filtraron dos alícuotas de 100 ml de una dilución 1:100 de cada muestra de agua utilizando membranas filtrantes de 0,45 µm para el recuento de *E. coli* y coliformes totales. A todas las muestras estudiadas se le realizó PCR a partir del caldo de enriquecimiento utilizando, cebadores específicos para la detección de genes de *C. jejuni y C. coli.*

Para evaluar la sobrevida en el tiempo de *C. jejuni* se utilizó una cepa patrón provista por el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", la que fue inoculada en diferentes muestras de agua obtenidas de la Laguna Argüello, pues es la que se halla en el casco céntrico de la ciudad y por lo tanto es la más utilizada con fines recreativos. Se realizaron 3 estudios de supervivencia: 1) a temperatura ambiente sin exposición a la luz solar, 2) a temperatura ambiente con exposición a la luz solar y 3) a temperatura de refrigerador. Luego de 24 horas, 7, 14, 21 y 28 días de incubación, se aplicó la misma metodología que la utilizada para aguas recreacionales.

RESULTADOS

Durante todo el estudio se recolectaron 75 muestras de agua de ríos (28) y lagunas (47). En ninguna de las muestras de aguas recreacionales estudiadas pudo detectarse la presencia de campilobacterias termotolerantes patógenas para el hombre por cultivo tradicional, resultado que fue confirmado por PCR.

La temperatura media fue de: 25,3°C y el valor de pH promedio de 7,5. El 55% de las muestras presentó aspecto ligeramente turbio, el 35% turbio y solo un 10% de las muestras fueron límpidas. La media de los recuentos de coliformes totales fueron de $3,6 \times 10^4$ UFC/ ml y los recuentos de *E. coli* de $1,2 \times 10^3$ UFC/ ml. En el 72% de las ocasiones de muestreo no se registraron lluvias durante las 72 previas.

En la prueba de supervivencia a temperatura ambiente y al resguardo de la luz solar se observó sobrevida de *C. jejuni* hasta los 21 días de estudio en la muestra esterilizada mientras que en la muestra sin tratar los cultivos fueron positivos hasta los 14 días. En la muestra sin tratar el recuento de coliformes totales fue incrementándose hasta el día 14 para luego negativizarse al cabo de 28 días, mientras que el recuento de *E. coli* se negativizó al cabo de 14 días.

En la prueba de supervivencia a temperatura del refrigerador, el recuento de *E coli* se mantuvo en el tiempo mientras que el de coliformes totales luego de hacer un pico al día 14, disminuyó sin negativizarse a lo largo del período de estudio. Las muestras presentaron desarrollo de *Campylobacter* durante 21 días en presencia de flora autóctona y solamente resultaron positivas hasta el día 7 en la muestra previamente esterilizada.

En la prueba de supervivencia a temperatura ambiente con exposición a la luz solar, la sobrevida de *C. jejuni* en ambas muestras fue menor a 24 hs. La temperatura promedio de la muestra durante el período de estudio fue de 24,7ºC y el pH promedio de 8,9. El recuento en la muestra sin tratar de *E. coli* fue de 100 UFC/ml y el de coliformes totales de $2{,}5 \times 10^4$ UFC/ ml.

CONCLUSIONES

- En ninguna de las muestras de aguas recreacionales estudiadas pudo detectarse la presencia de campilobacterias termotolerantes patógenas para el hombre por cultivo tradicional, resultado que fue confirmado por PCR.
- Contrariamente a lo planteado en la hipótesis del trabajo, no puede afirmarse que las aguas de uso recreacional se comporten como reservorio y/o vehículo de transmisión de estas especies causantes de gastroenteritis en el hombre, las que en otros países del mundo son los principales agentes etiológicos de dichas patologías.
- De acuerdo a los estudios de supervivencia, podemos aseverar que las condiciones del ambiente acuático de nuestras aguas recreacionales son propicias para la supervivencia de *Campylobacter*.
- La detección de *Campylobacter* por parte de otros autores en diferentes partes del mundo no implica que todos medios acuáticos se comporten de igual manera, ya que las condiciones ambientales del agua en sí misma y de su entorno condicionan la contaminación con esta bacteria y su sobrevida en el agua.
- Pudo demostrarse que en las muestras ambientales analizadas los organismos indicadores de contaminación fecal como *E. coli* y los coliformes totales presentaron un comportamiento diferente al de *Campylobacter*, hecho que fue corroborado por los estudios de las muestras artificialmente contaminadas.

- En base a los resultados de las pruebas de supervivencia bajo condiciones controladas, puede concluirse que las elevadas temperaturas junto a las fuertes radiaciones UV a las que se hallan expuestas las aguas de uso recreacional de nuestra zona durante la mayor parte del año son dos factores claves que impiden la sobrevida de *Campylobacter* en dichos ambientes.
- Por lo antes expuesto se pone de manifiesto que la ausencia de *Campylobacter* en los ambientes estudiados no depende de un solo factor, sino de una suma de factores bióticos y abióticos que convergen para condicionar la presencia y/o sobrevida de estas bacterias.
- Este estudio, el primero en su tipo realizado en nuestro país, representa un aporte no sólo desde el punto de vista de la epidemiología de C*ampylobacter* en nuestras aguas, sino también soporta la idea de que la doble filtración es una metodología validada que resulta ser la más adecuada para la detección de campilobacterias a partir de muestras de agua, en las cuales la carga bacteriana es baja y puedan existir formas cocoides.

ABSTRACT

INTRODUCTION

The presence of campylobacteria in aquatic environments has been studied by different authors with variable results: some failed to detect it and others report high frequencies of isolation.

Biotic and abiotic factors, such as oxygen content, nutrient, temperature, pH, water type, exposure to UV light, moisture, strain origin, and biotic interactions, were reported determine the presence of *Campylobacter* species in surface waters. In spite, temperature, interaction with native flora and solar radiation, are considered the most significant determinants of survival in aquatic environments.

Campylobacter spp. exist often as commensal in the gastrointestinal tract of a wide range of warm-blooded animal. Poultry have been identified as the most important reservoir, through them contamination food, other animals, man, and water bodies.

There are 21 species within the genus *Campylobacter* and 8 subspecies. Four species are known as "thermotolerant campylobacteria", they are *Campylobacter jejuni (C. jejuni), Campylobacter coli (C. coli), Campylobacter lari (C. lari) y Campylobacter upsaliensis (C. upsaliensis).* Two thermophilic campylobacters, *C. jejuni* (80%), and *C. coli* (10%) are the most important species considered to public health due to their roles as enteropathogens. These are zoonotic agents that can contaminate water bodies. The survive in water is from a few days to several weeks and seems to be in correlation with water temperature.

Water plays an important role in the ecology of *Campylobacter* spp. Is ubiquitous in the environment. It has been recovered from streams, rivers, lakes, ponds, streams, estuaries, drainage channels, groundwater, bays, marine waters, and untreated waters contaminated with stools. In addition, outbreaks from drinking water were reported.

Recreational water is regularly contaminated with stools because of its superficial nature, that is why aqueous surfaces contain microorganisms related to human gastrointestinal infections. The fate of these microorganisms is more survival than growth, reason why water can be considered an important reservoir and vehicle of transmission.

Despite the use of enrichment media and filtration techniques, the culture of *Campylobacter* from water samples (as in most environmental samples) is very low yield.

FUNDAMENTATION

From the exhaustive bibliographical review carried out in national and international databases, no studies were found in Argentina in which the presence of *Campylobacter* in aquatic environments was studied.

The surveillance of pathogenic microorganisms in recreational environments is key to understanding the epidemiology of human diseases and to establishing prophylactic and / or control measures.

Many ecological factors coexist in our region that could facilitate the transmission of campylobacteria. The knowledge of the distribution of these bacteria could be an epidemiological data that would contribute to improve the measures of prevention and control of this zoonosis.

We found interesting to know the relationship between these pathogens in order to refuse or include the natural aquatic environment as reservoir of campilobacterias. Additionally, in order to know if the environmental factors determ the presence of *Campylobacter* in waters of recreational use of our region, we have proposed to study the survival of these bacteria under controlled laboratory conditions similar to those of the aquatic environments studied.

HYPOTHESIS

- The aquatic environments of recreational use in our area play a role as reservoirs of thermotolerant species of *Campylobacter* pathogenic to man.
- The presence of these species in water sources is conditioned by fecal contamination and certain environmental variables characteristic of these places.
- The survival of *Campylobacter* in controlled experimental conditions allows to explain the presence or absence of species of this pathogen in natural environments.

OBJECTIVES

Objective 1: To evaluate the role of recreational water as a reservoir of two thermotolerant species of *Campylobacter*.

- To study the presence of *C. jejuni* and *C. coli* in aquatic environments of recreational use through culture and PCR techniques.

- Determine the degree of fecal contamination of the lagoons and rivers by counting *E. coli* and total coliforms.
- Record environmental variables at the time of sampling.

Objective 2: To study the survival time of *C. jejuni* under different controlled experimental conditions:

- At different temperatures (room temperature and refrigerator temperature).
- In the presence of UV solar radiation by direct exposure to sunlight.
- In the presence and absence of autochthon flora.

Objective 3: To relate the results obtained in the natural environments with the survival of *C. jejuni* under controlled laboratory conditions.

MATERIALS AND METHODS

Water samples from surface sources (rivers and lagoons) used for recreational purposes were collected. Each incorporated water sample was accompanied by data about its origin, time of collection, turbidity, temperature, pH and previous rainfall.

Membrane filtration techniques were employed using a vacuum pump and nitrocellulose membranes with 0,45 μm and 0,20 μm pore size. Each separate filter was placed in Bolton selective enrichment broth. Broth cultures were then subcultured onto Campylobacter-selective modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar (mCCDA) and incubated in a microaerobic atmosphere. Presumptive colonies were subjected to the corresponding biochemical tests.

In addition, counts of *E. coli* and total coliforms were performed. For this, 100 ml aliquots (1: 100 dilution) of each water sample were filtered using 0,45 μm membrane filter. All samples studied were also analyzed by PCR with specific primers for detection of genes of *C. jejuni* and *C. coli.* To evaluate the survival through the time of *C. jejuni* we used a standard strain provided by the National Institute of Infectious Diseases ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". The strain was inoculated in water samples from Argüello Lagoon, because it is the most used for recreational purposes and was in the urban area of the city.

Three survival studies were performed: 1) at room temperature without exposure to sunlight, 2) at room temperature with exposure to sunlight and 3) at refrigerator

temperature. After 24 hours, 7, 14, 21 and 28 days of incubation, the same methodology was applied as that used for recreational waters.

RESULTS

Seventy-five water samples were collected from rivers (28) and lagoons (47). None of the samples of recreational waters studied were positive for thermotolerant campylobacteria pathogenic to man by traditional culture. This result was confirmed by PCR.

The mean temperature was: 25,3 °C and the mean of pH was 7,5. Fifty five percent of the samples presented slightly cloudy appearance, 35% cloudy and only 10% were clear. There were no rainfalls during the previous 72 hours in 72% of sampling.

In the survival tests, *C. jejuni* was isolated up to 21 days in the sterilized sample at room temperature and absent sunlight, while in the untreated sample cultures were positive up to 14 days. In the untreated sample the total coliform count was increased around the 14^{th} day and was negative in the 28^{th} day, while the *Escherichia coli* count was negative after 14 days.

In the refrigerator temperature survival test, the *E coli* count in the untreated sample, was maintained over time while total coliforms peaked at 14^{th} day and then decreased without being negativized after 28^{th} day. The samples showed development of *Campyloba*cter for 21 days in presence of autochthonous flora and were positive until day 7 in the sample previously sterilized. In the survival test at room temperature with exposure to sunlight, survival of *C. jejuni* in both samples was less than 24 hs. The average temperature of the sample in this last study was 24,7ºC and the average pH of 8,9. The *E. coli* count in the untreated sample was 100 CFU/ml and the total coliforms $2,5x10^4$ CFU/ml.

CONCLUSIONS

1. In none of the samples of recreational waters studied could detect the presence of thermotolerant campylobacteria pathogenic to man by traditional culture, result that was confirmed by PCR.
2. Contrary to the hypothesized, it cannot be affirmed that the waters studied play a role as reservoir and/or vehicle of transmission of these species of *Campylobacter*, which in other countries are the main agents involved in gastroenteritis in man.

3. According to survival studies, we can affirm that the conditions of our recreational waters are suitable to the survival of *Campylobacter*.
4. The detection of *Campylobacter* by other authors in different parts of the world does not imply that all aquatic environments behave in the same way, since the environmental conditions of the water itself and its environment condition the contamination with this bacterium and its survival in water.
5. It could be demonstrated that in the environmental samples analyzed, the organisms indicating fecal contamination, such as *E. coli* and total coliforms, showed a different behavior from *Campylobacter* does. It was corroborated by the studies performed with artificially contaminated samples.
6. Based on the results of the survival tests under controlled conditions, it can be concluded that the high temperatures and the strong UV radiation to which these waters, in this zone are exposed during the year, are two key factors that don't allow the survival of *Campylobacter* in these environments.
7. It is evident that the absence of *Campylobacter* in the studied environments doesn't depend on a single factor, but several biotic and abiotic factors converge to determ the presence and / or survival of these bacteria.
8. This study, the first carried out in our country in waters, represents not only a contribution to the epidemiology of *Campylobacter* in our waters, but also supports the idea that double filtration is a validated methodology that turns out to be the more suitable for the detection of campylobacteria from water samples, in which the bacterial load is low and there may be coccoid forms.

INTRODUCCIÓN

El agua como recurso vital y reservorio de posibles patógenos

El agua es esencial para la vida y una fuente adecuada, segura y accesible debe estar disponible para todos. Sin embargo millones de personas en el mundo entero no tienen acceso a agua segura y como consecuencia de ello las altas tasas de morbilidad y mortalidad de las enfermedades producidas por los microorganismos presentes en el agua de bebida [1].

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud por año se produce el deceso de 5 millones de personas por enfermedades relacionadas con el agua, de ellas más del 50% son causadas por infecciones intestinales [1]. Una de las principales causas de estas enfermedades es la ingestión de agua contaminada con material fecal humana o de animales como consecuencia de que la descarga de efluentes cloacales sin tratamiento previo a cursos de agua dulce o salada, es la principal fuente de microorganismos de origen fecal incluidos los patógenos [2]. En la Argentina el 83% de los hogares tienen acceso al servicio de agua potable, en tanto que el 53% de los mismos tienen cobertura por sistema cloacal [3]. Sin embargo, muchos de los sistemas de tratamiento de efluentes cloacales no cumplen con la eficiencia esperada de remoción de microorganismos, presentándose también casos de ciudades de nuestro país que carecen de un sistema de tratamiento de efluentes cloacales. En ambas situaciones se produce la incorporación de microorganismos patógenos a los cursos de aguas receptores los que también sirven de fuente de agua para la misma u otra comunidad.

El uso de los recursos hídricos para fines recreativos plantea problemas si se tiene en cuenta que es precisamente en los asentamientos de máxima concentración poblacional e industrial donde surgen los mayores requerimientos de medios de esparcimiento por parte de una población siempre creciente. La mayoría de los investigadores han acordado que la calidad bacteriológica del agua para bañarse no necesita ser tan alta como para beberla, pero que debería ser mantenida razonablemente libre de bacterias patógenas [4].

Las enfermedades diarreicas son las principales enfermedades transmitidas por el agua y prevalecen en numerosos países en los que el tratamiento de las aguas residuales es

inadecuado, pudiendo incluso volverse crónicas en lugares donde los suministros de agua limpia son insuficientes [5].

Las bacterias que se encuentran con mayor frecuencia en el agua son las bacterias entéricas que colonizan el tracto gastrointestinal del hombre y animales y son eliminadas a través de la materia fecal, pero cuando estos microorganismos se introducen en el agua, las condiciones ambientales son muy diferentes y por consiguiente su capacidad de reproducirse y de sobrevivir son limitadas [6]. La capacidad de supervivencia de los patógenos en esos ambientes por tiempo prolongado transforma al agua en un importante reservorio y a la vez vehículo en la transmisión de enfermedades [7][8].

Entre los patógenos bacterianos relacionados en forma directa o indirecta con el agua pueden mencionarse los siguientes: *Salmonella* sp.*, Shigella* spp.*, Campylobacter* spp., *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp. *y Escherichia coli* 0157 [9]. Los niños menores de 2 años son el principal grupo afectado (54,1%) como se ha informado en otros países en desarrollo [10], aunque ancianos e individuos inmunocomprometidos también se ven afectados [11].

La introducción de estos microorganismos puede ocurrir a partir de un amplio rango de fuentes, como ser descargas de aguas residuales [12], escurrimiento o flujo de superficie agrícola, contaminación directa o por excrementos de aves y las heces de otros animales inclusive del hombre [13][14], siendo la exposición al agua de uso recreacional contaminada con materia fecal una vía alternativa de exposición para la infección humana [15].

Lagunas y ríos como espacios recreacionales

Las lagunas y humedales constituyen grandes reservas de agua dulce además de ser soportes de vida (ecosistemas lacustres), pero su calidad es un aspecto que no está siendo debidamente cuidado. Posee múltiples usos que incluyen usos de consumo (abastecimiento), receptor de efluentes y usos en el cauce (recreación, pesca, etc.) [16][17].

La urbanización afecta la dinámica hídrica de manera aún más intensa. Una parte importante del suelo se cubre de superficies relativamente impermeables, como asfalto, cemento y otros materiales análogos. En esos casos, la infiltración y la evaporación son casi nulas y la mayor parte del agua caída de lluvia escurre rumbo a los sistemas de drenaje, generalmente artificiales [6].

Entre los factores abióticos que influyen directamente en los sistemas acuáticos se debe considerar el clima, la geología, la hidrología y usos de los suelos circundantes; estas variables determinan las características físicas y químicas de dichos sistemas [18].

Indicadores de calidad del agua

Para evaluar la calidad bacteriológica de las aguas recreacionales normalmente se utilizan estándares internacionales [15], que se calculan a partir de información epidemiológica y permiten establecer correlaciones entre densidades de microorganismos patógenos y/o microorganismos indicadores y el efecto sobre la salud de los individuos que utilizan el agua con fines recreativos [19].

La concentración de bacterias indicadoras ha sido usada por décadas para evaluar la seguridad de las aguas recreacionales. Tales bacterias indicadoras no son necesariamente patógenas, pero predominan en desechos de origen humano donde es probable que existan organismos patógenos [19].

Cuando las fuentes de agua de uso recreacional son utilizadas como descarga directa o indirecta de efluentes cloacales e industriales, pueden tener un alto riesgo de contaminación a través de bacterias patógenas y de metabolitos tóxicos, por lo que se torna importante monitorear estos cuerpos de agua [20].

Los controles rutinarios de la totalidad de los microorganismos hídricos, potencialmente riesgosos para la salud, resultan difíciles de llevar a cabo debido a la gran variedad de bacterias patógenas cultivables, a la complejidad de los ensayos de aislamientos y a la presencia en baja concentración de varias especies altamente agresivas, sin que el orden detallado indique prioridad. Por esta razón, los análisis bacteriológicos apuntan a la búsqueda de microorganismos indicadores de contaminación fecal y se centralizan en la cuantificación de coliformes. Este grupo está integrado por enterobacterias, siendo *Escherichia coli* el indicador universal de contaminación fecal [21]. Las distintas especies bacterianas tienen diferentes requerimientos nutricionales (a veces específicos) y condiciones fisicoquímicas que les permiten permanecer viables.

Las condiciones bacteriológicas del agua son fundamentales desde el punto de vista sanitario. La norma bacteriológica de calidad establece que el agua debe estar exenta de

patógenos de origen entérico y parasitario intestinal que son los responsables de transmitir enfermedades.

Hay una gran variedad de agentes infecciosos potencialmente transmisibles por el agua y como la densidad de cada uno puede variar temporal y espacialmente independientemente de los demás, las mediciones deberían hacerse para cada agente. La densidad de organismos patógenos varía temporalmente en heces y efluentes y por ende en las aguas receptoras, por lo que el seguimiento analítico de estos organismos en sí mismos podría no reflejar su potencial infeccioso [22].

1.1 Requisitos para ser considerado indicador de contaminación fecal

Los microorganismos indicadores de contaminación deben cumplir los siguientes requisitos: ser fáciles de aislar y crecer en el laboratorio; ser relativamente inocuos para el hombre y animales; y estar presentes en el agua relacionada, cuali y cuantitativamente con la de otros microorganismos patógenos de aislamiento más difícil [21].

Tres tipos de bacterias cumplen con ello:

- Coliformes fecales: indican contaminación fecal.
- Aerobias mesófilas: determinan efectividad del tratamiento de aguas.
- *Pseudomonas*: señalan deterioro en la calidad del agua o una recontaminación.

Históricamente, en el monitoreo de la calidad de agua, se han usado como indicadores los coliformes fecales y *E. coli* [19][23].

Estudios recientes han demostrado que altas densidades de bacterias como *E. coli* y de *estreptococos* recuperados de aguas recreacionales presentan una relación más fuerte que la densidad de coliformes fecales con las enfermedades gastrointestinales de los bañistas.

En nuestro país (y en muchos otros), el grupo coliforme ha sido y sigue siendo empleado como indicador del posible deterioro bacteriológico de las aguas [24][25].

Las bacterias coliformes habitan el tracto intestinal de mamíferos y aves, y se caracterizan por su capacidad de fermentar lactosa a 35°C. Los géneros que componen este grupo son *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter y Edwardsiella*. Todas pueden existir como saprofitas independientemente, o como microorganismos intestinales, excepto el género *Escherichia* cuyo origen es sólo fecal.

Lo antedicho ha llevado a distinguir entre coliformes totales (CT), grupo que incluye a todos los coliformes de cualquier origen, y coliformes fecales (CF), término que designa a aquellos de origen exclusivamente intestinal, con capacidad de fermentar lactosa también a 44,5°C. La existencia de una contaminación microbiológica de origen fecal se restringe a la presencia de CF, mientras que la presencia de CT que desarrollan a 35°C, sólo indica existencia de contaminación, sin asegurar su origen.

Escherichia coli es el indicador de contaminación fecal más fiable para evaluar el riesgo para la salud de las personas que consuman o estén en contacto con una determinada fuente de agua. Si bien estudios recientes demuestran que esta bacteria pude sobrevivir y replicarse fuera del huésped, condición favorecida por la concentración de nutrientes y las temperaturas del clima tropical y subtropical, continúa siendo el microorganismo que mejor satisface los criterios de indicador [26,27]. La Comisión Europea, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos y la OMS recomiendan el uso de *E. coli* como el mejor indicador de contaminación fecal para predecir la presencia de patógenos en el agua de bebida y de recreación, criterio que fue adoptado por numerosos países [28,29].

1.2 Metodología para cuantificación de indicadores en muestras de agua

El análisis cuantitativo de bacterias indicadoras de contaminación en una muestra de agua puede realizarse por dos metodologías diferentes [21]:

• Recuento directo de microorganismos cultivables por siembra de la muestra sobre un medio de cultivo agarizado.

• Recuento indirecto (basado en cálculos estadísticos) después de sembrar diluciones seriadas de la muestra en medios de cultivos líquidos específicos denominado Número más Probable (NMP).

En Argentina no existe reglamentación que fije límites de concentración de indicadores bacterianos por lo que hasta el presente se han utilizado sólo niveles de calidad de acuerdo a estándares internacionales [6][19], lo cual constituye un riesgo ya que se debe tener en cuenta que la relación entre los patógenos y los indicadores propuestos puede ser muy variable de una población a otra [19].

Características del género *Campylobacter*

Las bacterias pertenecientes al género *Campylobacter* son bacilos Gram negativos de aspecto delgado, no formadores de esporas ni pigmentos, con morfología curvada o con tendencia a adoptar una forma espiral, aunque hay especies con aspecto de bacilos rectos. Pueden formar cadenas cortas que asemejan al microscopio una "S" o bien la forma de alas de gaviota [30].

La observación al microscopio óptico en una preparación en fresco de estas formas con alta movilidad, característica en "sacacorchos", nos permiten realizar un diagnóstico presuntivo rápido. Las dimensiones se encuentran entre 0,5 y 5 µm de largo y 0,2-0,8 µm de ancho. [31][32][33][30]. Una característica de este género es la aparición de formas cocoides en aquellos cultivos viejos, expuestos a altas concentraciones de oxígeno [33] y en las denominadas formas viables-no cultivables (VBNC)[30].

El pasaje de la forma en espiral a la forma cocoide es independiente de su capacidad de crecer en el medio en el que se encuentra la bacteria y puede relacionarse a la cantidad de nutrientes disponible en el ambiente [34].

Cuando se expone a *C. jejuni* a condiciones subóptimas de desarrollo, la forma espiral o curva atraviesa distintas formas hasta finalmente adoptar la forma cocoide, esto se acompaña también de una pérdida de cultivabilidad transformándolo en bacteria viable no cultivable (VBNC) [35]. La formación de células cocoides parece jugar un papel en la adaptación de las bacterias a condiciones ambientales adversas, y por lo tanto puede ser un proceso regulado y genéticamente determinado, como en el caso de otras bacterias.

Taxonomía y especies de importancia para el hombre

La taxonomía ha cambiado considerablemente a lo largo de los años y podría cambiar en el futuro [36]. Aun entre las especies de *Campylobacter* ampliamente reconocidas existe gran diversidad geno y fenotípica [37]. En los últimos años, las técnicas de biología molecular, han acelerado drásticamente la identificación de nuevas especies de *Campylobacter* [38]. Actualmente se reconocen 21 especies y 8 subespecies [39]. *C. jejuni, C. coli, C. lari* son las especies más frecuentemente aisladas a partir de muestras de origen humano [40] [39]. La aparición constante de nuevas especies refuerza sin duda la idea de que *Campylobacter*

posee la capacidad de adaptación a multitud de nichos ecológicos diferentes como son el tracto digestivo de diferentes animales [30].

Cuatro especies son conocidas como "Campilobacterias termotolerantes", ellas son *C. jejuni, C. coli, C. lari y C. upsaliensis* [36]. Las únicas especies de importancia para la salud pública debido a su rol como enteropatógenos son *C. jejuni* (80%), y *C. coli* (10%) [41][36].

Un número limitado de estudios se han centrado en este aspecto epidemiológico, en particular, para *C. jejuni* [39]. La denominación "termotolerantes" se debe a que las especies mencionadas son capaces de crecer "in vitro" entre 37ºC y 42ºC (con una temperatura óptima de 42ºC) pero nunca por debajo de los 30ºC.

Se cree que la ausencia de proteínas de shock térmico serían responsables de la imposibilidad de este patógeno de crecer a menores temperaturas [42]. Sin embargo, la bacteria muestra respiración y generación de ATP a temperaturas tan bajas como 4ºC, manteniendo su metabolismo activo, a bajas temperaturas por largos períodos de tiempo [42].

Condiciones necesarias para su crecimiento

La mayoría de las especies son microaeróbicas, es decir, necesitan una atmosfera con menor concentración de oxígeno y concentración mayor de hidrogeno y CO_2 [43]. El oxígeno lo usa para la respiración, como aceptor final de electrones, pero no puede crecer a la concentración de oxígeno presente en el aire (21%) ya que el oxígeno y sus derivados le son tóxicos [44] [45]. Requieren de una concentración mínima de oxígeno (5%) debido a que *C. jejuni* posee la enzima ribonucleotidoreductasa que es dependiente de oxígeno y necesaria en la síntesis de ADN [30]. Son especies catalasa positiva, lo que les permite también captar algunas de las formas tóxicas del oxígeno como H_2O_2 [44].

Estas bacterias son también citocromooxidasa positivas, por lo que aquellas bacterias aisladas en el laboratorio que no presenten actividad de catalasa y/o citocromooxidasa, deben descartarse como pertenecientes al Género *Campylobacter* [46][5].

En la Tabla I se muestran algunas de las condiciones necesarias para el crecimiento de *Campylobacter*

Tabla I: Condiciones necesarias para el crecimiento de *Campylobacter spp.* [47]

Factor	Optimo	Inhibición
Temperatura (ºC)	37-41,5	<30 ó >45
pH	6,5-7,5	<4,7 ó >8,2
O_2 (%)	5-10	0 ó >15-19
CO_2 (%)	10	-
NaCl (%)	0,5	1,5

Epidemiología de las infecciones por *Campylobacter*

La epidemiología de las campilobacteriosis en el hombre es compleja, con diferentes fuentes y rutas potenciales de infección, alguna de ellas no comprendida en su totalidad [48].

Las dificultades en la atribución del origen de la infección se deben principalmente a dos causas: i) existen numerosas fuentes potenciales de *Campylobacter*, puesto que puede colonizar el intestino de una gran variedad de animales y ii) el hombre parece desarrollar una cierta inmunidad frente a este patógeno y actuar como portador sano [49][30].

En países desarrollados como los de la Unión Europea y los Estados Unidos, *Campylobacter* es uno de los principales agentes bacterianos responsables de diarrea en humanos y es un problema aún más serio que una infección por *Salmonella* sp.[50]. La infección no ocurre solo a través de la comida, sino a través de agua de bebida contaminada no potabilizada [51][52].

En los últimos 5 años, la campilobacteriosis se ha convertido en la enfermedad zoonótica más frecuente en la Unión Europea (45 casos por 100.000 habitantes) seguido de la salmonelosis y shigelosis, estos datos son provistos por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC) [33][53][54].

En países en vías de desarrollo, como Argentina, *Campylobacter* es el segundo agente de diarrea, según el lugar geográfico, principalmente en niños [10][55]**.** Según datos del Hospital Pediátrico Avelino Castelán de Resistencia, *Campylobacter* constituye la tercera causa de enfermedad diarreica aguda en niños menores de 2 años, con una prevalencia de entre 5%-6% [56]

Principales reservorios

A pesar de que *Campylobacter* muestra características de crecimiento fastidiosas "in vitro" y pierde fácilmente su capacidad de ser cultivado así como su viabilidad, es capaz de colonizar el tracto digestivo de una amplio rango de huéspedes animales de sangre caliente [57], entre los que se incluyen animales domésticos (aves de corral, ganado, oveja, cabra, pato y cerdo) como salvajes y las heces de estos animales infectados son responsables de la carga ambiental de *Campylobacter* [58]. Animales de compañía como perros y gatos son también conocidos reservorios de especies de *Campylobacter* [41], siendo el hábito de alimentarlos con carne cruda un factor de riesgo importante de infección [59][60][61].

Las aves de corral constituyen el reservorio de mayor importancia, el cual puede constituir la fuente de contaminación para el hombre, otros animales, alimentos y cuerpos de agua [62][63].

Debido a que los animales son el principal reservorio de estos microorganismos y vehículo de transmisión del patógeno, las campilobacteriosis pueden ser clasificadas como zoonosis, [36][64][65][66], aunque también pueden ser asociadas con diversas fuentes ambientales [67][41].

Modo de transmisión

En los países industrializados el microorganismo se transmite principalmente a través de alimentos de origen animal (el consumo de carne de ave de corral mal cocida es responsable del 50-70% de las infecciones esporádicas) o contaminación cruzada al preparar los alimentos [41].

En los países menos desarrollados, como Argentina, predominan la transmisión por alimentos y aguas contaminadas con excretas así como el contacto directo con personas o animales enfermos según el lugar geográfico y principalmente en niños [10][55].

Algunos autores lo recuperaron a partir de aguas superficiales debido a la alta frecuencia de contaminación fecal, donde se ha asociado la presencia de estas bacterias con aguas contaminadas con efluentes cloacales [68].

Campylobacter jejuni y *C. coli* son agentes zoonóticos de infecciones intestinales que pueden contaminar cuerpos de agua [9] y ambas especies pueden sobrevivir en agua, desde unos pocos días a varias semanas dependiendo de la temperatura del agua [69].

Las pobres condiciones de higiene, el nivel de saneamiento básico, el medio ambiente y la proximidad a los animales en países en vías de desarrollo contribuye a la adquisición fácil y frecuente de cualquier patógeno entérico incluyendo *Campylobacter* [41][70].

El riesgo de adquisición de *Campylobacter* es casi el doble en áreas rurales que en áreas urbanas, asociado a la presencia de aves de corral conviviendo con el hombre y el uso de agua de pozo [58]. En un estudio realizado por Martikainen y cols. (1990) en aguas superficiales de Finlandia, recolectadas de un entorno rural y otro urbano, halló una mayor frecuencia de aislamientos de campilobacterias en aguas de origen rural que en la de origen urbano [71]

En otro estudio realizado para identificar la fuente responsable de la campilobacteriosis en el hombre se encontró que el origen de la infección en mayor porcentaje era atribuible al pollo (64,5%), seguido del ganado (25,8%) y en tercer lugar con un 7,4%, al uso y/o consumo del agua [58].

Dentro de las especies termotolerantes, las de mayor importancia clínica son *C. jejuni y C. coli* ya que producen gastroenteritis en el hombre. El hallazgo de una u otra especie se halla relacionada con la fuente de contaminación [7]. *C. jejuni* generalmente se halla asociado con descarga de aguas residuales [57] y es el responsable del 85 -90% delos casos de diarreas relacionadas con el género [41][36][72].

Manifestaciones clínicas de las campilobacteriosis

Comparado con otros patógenos de transmisión alimentaria, la dosis infectiva de *Campylobacter* es baja (de 500-800 UFC). La principal manifestación clínica de la infección por *Campylobacter* es la intestinal [70].

Las enteritis por *Campylobacter* poseen características indistinguibles de las producidas por *Salmonella* sp., produciendo diarreas que pueden ser desde leves y autolimitadas a graves acuosas, sanguinolentas y con reacción inflamatoria [67] [73].

Los síntomas de una gastroenteritis producida por *Campylobacter* suelen ser débiles o bien remitir a los pocos días. De ahí la razón de que no se declaren tantos casos como los que probablemente se producen en realidad [30]. La mayor parte de las personas se recuperan sin ningún tratamiento médico, excepto en casos severos donde es necesaria la administración de antibióticos [74][75].

La campilobacteriosis puede producir un desorden neurológico post infección por *C. jejuni*, conocido como Síndrome de Guillain Barré (GBS) [75]. Este es un trastorno autoinmune en el que el sistema inmunitario ataca a una parte del sistema nervioso periférico, produciendo una parálisis fláccida ascendente. Alrededor del 70% de los pacientes informan antecedentes de enteritis por *C. jejuni* en los 15 días previos al comienzo de la enfermedad. El 2- 3% de los pacientes muere, el 20% queda con secuelas neurológicas importantes y el resto se cura total o parcialmente [76].

Otras afecciones que también se pueden presentar tras una infección por *Campylobacter* son el síndrome de Miller Fisher [77] y artritis reactiva [78].

Papel del agua en la ecología de Campylobacter

El agua juega un rol importante en la ecología de *Campylobacter* spp.[79][80].

Campylobacter spp. es ubicuo en el medio ambiente ya que se ha aislado de arroyos, ríos, lagos, lagunas, estanques, estuarios, canales de drenaje, aguas subterráneas, bahías, aguas marinas, aguas no tratadas contaminadas con materia fecal [12][65][81][82][83]. Además se registraron brotes a partir de agua corriente [57].

Las condiciones ambientales juegan un rol importante en la supervivencia de *Campylobacter* spp., ya que este es particularmente sensible fuera del tracto intestinal de animales de sangre caliente [36][84].

El agua de uso recreacional frecuentemente está contaminada con efluentes cloacales por lo que contiene microorganismos productores de infecciones gastrointestinales humanas [85][86][87].

El destino de estos microorganismos suele ser más de supervivencia que de crecimiento, por lo cual el agua puede ser considerada como un importante reservorio y a la vez un vehículo de transmisión de los mismos [88].

Existen estudios previos en la región nordeste de Argentina, que demuestran que las aguas a estudiar en este trabajo reciben aportes de aguas residuales con valores de coliformes fecales y *E. coli* muy altos [16], lo que convierte a estas aguas en un reservorio ideal para estas bacterias.

Si bien es posible que el agua no sea un vehículo importante de la campilobacteriosis, hay reportes que señalan al agua ambiental como fuente de brotes de estas infecciones [30][51][89].

El uso recreativo como también actividades al aire libre, donde puede ocurrir la ingestión accidental de agua contaminada microbiológicamente, determina un riesgo potencial para la salud [8][31].

Nadar en aguas de fuentes naturales, también es un factor de riesgo para la adquisición de la infección [90].

Los asentamientos en zonas lindantes a espejos de agua además hacen que el hombre tenga estrecho contacto con estas aguas. La accesibilidad hace que sean usadas tanto para recreación en épocas de calor intenso como para riego de pequeñas quintas particulares [91].

Contribución del agua a la carga de infecciones por *Campylobacter*

La atribución al agua como causante de la infección por *Campylobacter* es significativamente subestimada ya que no todas las infecciones llegan a causar enfermedad y es común que no requieran atención médica [57].

Las enfermedades gastrointestinales producidas por *Campylobacter,* son autolimitadas y frecuentemente no son reportadas por lo cual es difícil de reconocer la asociación con el agua [57] por lo tanto las fuentes de agua representan una potencial fuente de contaminación para la adquisición domestica de la enfermedad [90]. Además, siempre deben tenerse en cuenta variables meteorológicas, como: radiación, temperatura, duración del día, humedad, precipitación como factores abióticos influyentes en las características del cuerpo de agua.

Los casos declarados y registrados de campilobacteriosis en humanos seguramente son inferiores a los que realmente ocurren. Debemos tener en cuenta que para que un caso de campilobacteriosis se registre, la sintomatología debe ser severa, acudiendo a un centro médico. Se deben tener en cuenta las condiciones para garantizar la supervivencia del patógeno en la muestra remitida al laboratorio. Se debe reportar el hallazgo a algún sistema de información o registro sanitario. Son, por lo tanto, muchas condiciones que no siempre se cumplen.

Condiciones que afectan la permanencia de la bacteria en el ambiente

La persistencia de *Campylobacter* en el ambiente depende de numerosos factores tales como el contenido de oxígeno, la concentración de nutrientes, la temperatura, el pH, el tipo de agua, la exposición a la luz UV, la humedad, el origen de la cepa, e interacciones bióticas [44][88][92][93][94].

A pesar de las discrepancias, la temperatura [94][95], la interacción con la flora autóctona [88][96] y la luz [12][97], son considerados como los factores determinantes de supervivencia más significativos dentro de los ambientes acuáticos [98].

Las condiciones ambientales por lo tanto, juegan un rol importante en la supervivencia de *Campylobacter* ya que éste es particularmente sensible fuera del tracto intestinal de animales [36][84][99].

Pickert y Botzenhart en 1985 observaron que la supervivencia de *C. jejuni* en aguas parece estar restringida a pocos días y que la concentración de oxígeno y nutrientes tampoco parece tener relevancia, sin embargo la variable más importante es la temperatura [69].

Aunque *C. jejuni* es un microorganismo microaerófilo fastidioso generalmente incapaz de crecer en los niveles atmosféricos de oxígeno, *C. jejuni* puede adaptarse a la supervivencia en el medio ambiente, exhibiendo aerotolerancia y la supervivencia a la inanición [100].

La depredación y la competencia por nutrientes también afectan la supervivencia de ambas especies de *Campylobacter* en el medio ambiente acuático [101].

Mecanismos de supervivencia de *Campylobacter*

Campylobacter spp. son exógenos de los medios acuáticos, no existen evidencias de que sean capaces de crecer en el medio ambiente [7], es decir que pueden sobrevivir pero no multiplicarse fuera de sus huéspedes de sangre caliente [102]. Esto es lógico ya que su temperatura de crecimiento mínima es mayor a 30ºC, por lo tanto, la presencia de *Campylobacter* spp. en una fuente de agua supone contaminación fecal reciente, por lo que los ambientes acuáticos que reciben contaminación fecal deben considerarse potencialmente contaminados por *Campylobacter* spp.[7].

El tiempo de supervivencia varía de pocos días a temperatura ambiente, hasta semanas e incluso meses a 4ºC [94]. Estas diferencias se pueden deber a las diferentes cepas como también a los sistemas experimentales utilizados.

La formación de biofilms, las formas viables no cultivable, las interacciones con otros microorganismos (protozoos) y la existencia de cepas especialmente adaptadas al ambiente acuático todo puede contribuir a la supervivencia fuera del huésped [30][100].

1.1 Formación de biofilms

La formación de biofilms o biopelículas juega un rol importante en la supervivencia de este microorganismo cuando se enfrenta a condiciones de estrés ambiental. *Campylobacter* no puede sobrevivir en condiciones aeróbicas lo que obliga a la bacteria a adaptarse para sobrevivir. Esto convierte al biofilm en un importante reservorio de células viables [96][103]. La formación de biopelículas es un modo bacteriano de crecimiento y supervivencia, donde la superficie atacada y la matriz bacteriana encerrada en ella son protegidas de condiciones de estrés ambiental como radiación UV, predación y desecación [103]. Este aporta un ambiente microaeróbico favorable para el crecimiento y/o supervivencia, generando células viables que son eventualmente liberadas al medio ambiente.

1.2 Formas viables no cultivables (VBNC)resultados del estrés acuático

*Campylobacte*r adquiere la forma viable no cultivable (VBNC) cuando se encuentran fuera del tracto gastrointestinal y expuesto a condiciones ambientales desfavorables lo cual incrementa su supervivencia en el ambiente y dificultad su detección por cultivo [104][36] [105][106][107]. Esto parece ser una respuesta de la bacteria a condiciones de estrés como son la concentración de oxígeno atmosférico, temperaturas extremas o ausencia de nutrientes [30]. En este estado, las células son metabólicamente activas y muestran signos de actividad respiratoria, pero no pueden ser detectadas por métodos de cultivo tradicionales [36]. En un estudio reciente se comprobó que *C. jejuni* mantiene la capacidad de adherirse a las células intestinales, luego de tres semanas de incubación a 4ºC, lo que indica que las formas VBNC retienen su capacidad infectiva [108].

Se demostró que se puede revertir a formas cultivables tras el paso por los animales [109]. El estado VBNC fue descripto por primera vez por Rollins y Colwell quienes postularon que esto podría jugar un papel importante en las infecciones humanas y en la enfermedad [36]. La transición al estado VBNC implica un aumento en la resistencia del microorganismo a los factores de estrés ambiental y proporciona un ejemplo interesante de

la modificación de la fisiología microbiana para la supervivencia en condiciones adversas [104].

A lo largo del declive de las poblaciones expuestas a un estrés acuático, las formas VBNC constituirían las subpoblaciones viables numéricamente más significativas y persistentes en el sistema acuático, extendiendo así el mantenimiento del potencial patógeno de estos entornos [98].

1.3 Asociación de Campylobacter a protozoos

Cuando *Campylobacter* spp. ingresa a una fuente de agua pueden asociarse con organismos unicelulares eucariotas (protozoos) como mecanismo de resistencia a las condiciones del medio [110]. Se sabe que algunas bacterias pueden sobrevivir, multiplicarse o ser transportadas en organismos protozoos. Muchas están adaptadas para la supervivencia en elementos de la ruta de maduración de vacuolas alimenticias, o bien sobrevivir con un crecimiento saprofito en la cubierta exterior de los protozoos, sobre materiales excretados por ellos. De entre los protozoos identificados se destacan especies como *Acanthamoeba castellanii, Acanthamoeba polyphaga* y *Tetrahymena pyriformis*, conocidos hospedadores de *Campylobacter* spp.[80][111].

King y cols. hallaron que en el interior de las células de *Tetrahymena pyriformis, C. jejuni* es hasta 50 veces más resistente a la cloración del agua [112].

Se cree que la presencia de celulosa en la pared celular de *Acanthamoeba* spp. es el único factor que podría contribuir a la resistencia a las condiciones adversas, aportando así una barrera física de protección y cuando están internalizadas en estos organismos, se observa un menor decrecimiento en la viabilidad en condiciones de baja temperatura y escasos nutrientes, por lo que el potencial de colonización aumenta [80].

1.4 Interacción de Campylobacter con los microorganismos presentes en las aguas

Es interesante señalar que se halló a *Campylobacter* asociado a la presencia de coliformes fecales, por lo que puede suponerse que la contaminación proviene de animales (aves y mamíferos) y, en algunas circunstancias del propio hombre [64]. Aunque no siempre hay una buena correlación entre la densidad de población de *Campylobacter* y la de los indicadores de contaminación dado que *Campylobacter* llega a ser no cultivables más

rápido que los indicadores y los orígenes de las bacterias pueden ser diferentes [113], así como las condiciones que necesitan para sobrevivir [102].

Esta falta de correlación sugiere que se necesitan más estudios para identificar posibles organismos indicadores que podría predecir la presencia de *Campylobacter* spp. en aguas [60].

Factores externos que afectan la supervivencia de *Campylobacter*

1.1 Influencia de la radiación solar y luz UV

La radiación solar es un factor relacionado directamente con la temperatura ya que es la principal fuente de calor para la columna de agua [114]. La cantidad de luz que es absorbida por un cuerpo de agua aumenta exponencialmente con la distancia del paso de la luz por la solución acuosa, 90% de longitudes de onda sobre 750 nm son absorbidas en un metro de profundidad [18].

La intensidad de luz en la superficie varía según la estación y con la cobertura de nubes y disminuye con la profundidad de la columna de agua [114].

Se encontró que niveles letales de luz UV afectan la sobrevida de las bacterias en el ambiente acuático [88].

La temperatura del cuerpo de agua dependerá de la cantidad de radiación incidente sobre la superficie ya que el agua actúa como receptora y por lo tanto permite la acumulación de esta longitud de onda como energía calórica.

Tanto la luz como la temperatura influirán directamente en la solubilidad de los gases oxígeno y dióxido de carbono, así como de las sales minerales conocidas como nutrientes, entre las cuales se encuentran los nitratos, fosfatos, sulfatos y silicatos, como integrantes importantes de la materia orgánica generada en los sistemas. La radiación solar incidente es una de las variables físicas de importancia significativa por el efecto directo que genera el clima óptico y térmico en los cuerpos de agua [18].

En aguas abiertas, la radiación solar es ampliamente considerada como un agente de inactivación dominante, lo que reduce directamente la densidad de patógenos.

La supervivencia de *Campylobacter* spp. es muy sensible a las altas temperaturas y a los altos niveles de radiación UVB en los meses de verano [97].

1.2 Influencia de la temperatura y variaciones estacionales

La temperatura ambiente dependerá tanto de la época del año como de la cantidad de horas de sol. Esto a su vez determinará la temperatura del cuerpo de agua. En invierno los días son más cortos con menor cantidad de horas de sol y en verano ocurre lo inverso, hay más cantidad de horas de sol y los días son más largos.

Existen estudios previos que relacionan la presencia de *Campylobacter* con la época del año.

En un estudio realizado por Van Dyke y cols. no se observaron variaciones estacionales, pero si se obtuvieron variaciones dependientes de la temperatura, ya que a <10ºC se obtuvieron mayores concentraciones de *Campylobacter* en las muestras de río estudiadas [107]. Otros estudios han demostrado buena recuperación de *Campylobacter* de superficies acuosas en meses de otoño e invierno [12][81][87], justificando dichos hallazgos a que las abundantes lluvias durante el invierno, lo que lleva a un arrastre de microorganismos y una disminución de los aislamientos en verano, donde las temperaturas son más altas y la incidencia de rayos UVB [81].

La mayor detección de *Campylobacter* en los meses más fríos puede ser debido a una mejor supervivencia celular o la longevidad de ADN a menor temperaturas o menor exposición a la luz ultravioleta [97][107].

La supervivencia en cuerpos de agua fríos puede permitir a *Campylobacter* spp. pasar el invierno y volver a entrar huéspedes animales en la primavera [94].

Un estudio realizado con muestras tomadas cerca de una planta de tratamiento de aguas residuales mostró una tendencia opuesta, con mayores concentraciones de *Campylobacter* a temperaturas mayores a 10°C lo que se puede relacionar con las campilobacteriosis humanas que ocurren con mayor frecuencia en los meses de verano [107].

El factor ambiental más importante regulador de la cantidad de O_2 en el agua es la temperatura. El incremento de la temperatura durante la primavera y verano disminuye la cantidad de O_2 hasta en 50% ya que la solubilidad del O_2 en agua es inversamente proporcional a la temperatura [114]; esta cantidad además está permanentemente modificada por las relaciones de respiración y fotosíntesis [18].

En general, en países en vías de desarrollo la enteritis por *Campylobacter* no tiene una preferencia estacional, en contraste a lo que ocurre en países desarrollados donde las

epidemias ocurren en los meses de verano y otoño coincidiendo con el aumento de la temperatura [41][115].

1.3 Asociación de *Campylobacter* con las lluvias

Dependiendo de las características del suelo, el agua puede absorberse, escurrirse sobre la superficie o evaporarse ya que el agua de lluvia que llega al pavimento y a los suelos es recolectada en canales y cañerías y sacada fuera de la ciudad por medio de una red de conducción para evitar derrames e inundaciones [6].

Fenómenos meteorológicos inusuales, como precipitaciones abundantes, se asocian con un aumento de la contaminación de las aguas [57]. Muchos de los residuos que se encuentran en las márgenes de las lagunas son arrastrados hacia ellas, y pasan a ser partes integrales de esos cuerpos, contaminándolos, es decir que las precipitaciones pueden facilitar el transporte de microorganismos indicadores y patógenos hacia ríos y lagunas como así también pueden diluir patógenos ya presentes en el agua [116].

Es decir que después de la lluvia, las cargas microbianas pueden aumentar significativamente debido al escurrimiento, los desbordamientos de los colectores de agua de lluvia y la re-suspensión de sedimentos [117].

En un estudio previo de las lagunas en cuestión, se observó que con las lluvias se produce un aumento en el recuento de bacterias coliformes totales, debido probablemente al rebalse de pozos negros cercanos a la ribera ya que el agua de gran parte de la ciudad drena hacia la laguna. Este drenaje aporta además líquidos cloacales de conexiones clandestinas lo cual lleva a tener valores más elevados aún [91]. El grado de conexiones clandestinas impacta en la calidad del agua de los efluentes pluviales y de las lagunas como cuerpos receptores [118], o sea que el agua de buena calidad fluvial o lacustre se degrada como resultado de las descargas de aguas residuales con o sin tratamiento insuficiente.

Concluyendo, los niveles de contaminación pueden por lo tanto elevarse después de un período de lluvias y los períodos de alto riesgo en algunas áreas costeras pueden relacionarse con dichos datos climatológicos.

Recuperación de campilobacterias a partir de muestras ambientales.

La importancia de *Campylobacter* en las enfermedades diarreicas se ha aclarado por el avance de la aparición de los métodos de cultivo y de identificación adecuadas [33].

No hay un único método "estándar" aceptado para el aislamiento de *Campylobacter* de alimentos, heces o muestras ambientales, los protocolos han sido publicados por autoridades reconocidas, incluida la Organización de Estandares Internacionales (ISO), los Servicios de Laboratorio de Salud Pública del Reino Unido (PHLS) y la Administración de Drogas y Alimentos de E.E.U.U. (FDA) [31].

Actualmente, muchos de los métodos disponibles para la detección de patógenos son modificaciones de los procedimientos empleados en muestras clínicas y no son eficaces en la detección de las bajas concentraciones en que los patógenos se encuentran en la mayoría de las muestras ambientales. Por otra parte, la mayoría de los métodos de detección aún no dan información sobre la virulencia de los patógenos; se requiere de herramientas sensibles, específicas, rápidas, y simples para detectar los patógenos en el ambiente [11].

Pese al uso de medios de enriquecimiento y técnicas de filtración, el cultivo de *Campylobacter* a partir de muestras de agua (como en la mayoría de muestras ambientales) es en mucha ocasiones de muy bajo rendimiento [30]. El aislamiento es rara vez exitoso y pocas veces intentado ya que de la lista de brotes reportados desde 1978 hasta el 2010 en el trabajo de Pitkänen, registran sólo 8 de los 29 brotes revisados [57].

Todo puede deberse a la falta de su búsqueda rutinaria en los laboratorios, por ello podemos pensar que *Campylobacter* podría estar presente en las muestras de agua de las que el patógeno no puede aislarse [88].

Campylobacter puede ser difícil de detectar en muestras ambientales, en parte debido a que el uso de medios de cultivo selectivos que pueden inhibir el crecimiento, bajas concentraciones de células a menudo estresadas o dañadas y la formación de células VBNC [107].

1.1 Métodos de concentración, enriquecimiento y cultivo

Debido a que el número de campilobacterias que podrían estar presentes en el agua generalmente es bajo, es necesario realizar un método que permita la concentración de microorganismos en la muestra como la filtración a través de membranas [31]. Rosef y cols. han comparado la eficiencia de los diferentes filtros hallando que el filtro de membrana de 0,45 µm es el que arroja mejores resultados y que la utilización del filtro de 0,22 µm no incrementa la recuperación [119].

De los diferentes medios de enriquecimiento, ninguno tiene la capacidad para enriquecer y seleccionar campilobacterias a un grado similar al mostrado por selenito o tetrationato de *Salmonellas* [5][31]. Se deben utilizar medios altamente selectivos cuando se tiene la intención de buscar determinados microorganismos en una muestra de agua, aunque su apariencia sea límpida o ligeramente turbia ya que en ella podemos encontrar gérmenes que viven y compiten por sobrevivir en ella.

Una revisión de los métodos fue publicada por Corry y cols. quienes concluyen que si bien no hay un método estándar, hay algunos procedimientos generalmente aceptados [120]. Estos incluyen la incubación previa a temperatura 37°C durante aproximadamente 4 horas antes de la incubación a 42°C lo que facilita la reactivación de las células que podrían estar injuriadas [31].

La inclusión en los medios de pre-enriquecimiento con suplementos de bloqueo del oxígeno (metabisulfito de sodio y piruvato de sodio) permiten que los caldos puedan ser incubados en atmósfera aerofílica [31][121].

En este trabajo de tesis se utilizó caldo Bolton que lleva en su composición sangre lisada de caballo y un suplemento antibiótico que inhibe el desarrollo de contaminantes. Este caldo parece ser la mejor alternativa para enriquecimiento, inhibición de competidores y el crecimiento de *Campylobacter* [122][123].

Para el cultivo de *Campylobacter* se requieren condiciones especiales. Siendo esencialmente microaerofílico, crecen mejor en un ambiente con baja tensión de oxígeno (5% O_2, 10% de CO_2 y 85% N_2) [124][125]. Debido a su sensibilidad al oxígeno y radicales oxidantes, numerosos medios selectivos se han desarrollado para su cultivo, que contiene quelantes de oxígeno, tales como sangre lisada de caballo o desfibrinada de otros animales, sulfato ferroso, metabisulfito de sodio, piruvato de sodio, sales de hierro [126], norepinefrina y carbón [125]. Estos suplementos cumplen la función de neutralizar los efectos tóxicos del oxígeno y ayudar a crear la atmósfera microaerofílica necesaria para el desarrollo adecuado de *Campylobacter* [125].

Existen numerosos medios de cultivo en el mercado, con diferentes componentes, y diferentes mezclas antibióticas. El medio selectivo más comúnmente utilizado para la siembra directa de *Campylobacter* es el mCCDA (agar desoxicolato, cefoperazona, carbón modificado). Este medio posee carbón activado en su composición que funciona como

quelante del oxígeno, además de una mezcla antibiótica que facilita también la eliminación de flora acompañante [31][33]. Sin embargo el uso de un único medio selectivo no es conveniente para el aislamiento óptimo de *Campylobacter* , una combinación de medios de cultivo, particularmente un medio selectivo y uno no selectivo utilizando una técnica de filtración previa son más adecuados [127].

Aunque el porcentaje de detección utilizando solamente cultivos es del 2,8% [84], debemos tener en cuenta que los métodos de cultivo son necesarios para tener la cepa aislada y viable para realizar otras pruebas o determinar la sensibilidad antibiótica. Esta baja frecuencia de aislamientos a partir de muestras de agua contaminada utilizando solo técnicas de cultivo, puede por lo tanto dar lugar a una subestimación de sus números, por lo que, para poder detectar la presencia de estas células injuriadas, y aumentar la sensibilidad, se realizó también a las muestras de aguas estudiadas la prueba de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).

1.2 Uso de PCR en la detección de Campilobacterias en aguas

Las dificultades en la detección de rutina, el aislamiento y la identificación de *Campylobacter* spp. hace a estos microorganismos candidatos ideales para la identificación mediante PCR [128][129][130].

Los métodos moleculares para el análisis de la calidad del agua son ampliamente utilizados para la identificación de patógenos en el agua. El objetivo final de las técnicas de base molecular no es simplemente acelerar los métodos de cultivo lentos, sino lograr un aumento de la exactitud y sensibilidad de los métodos de detección [131].

Las técnicas de PCR pueden ser utilizados en la detección de agentes patógenos que pueden estar presente por debajo del límite de detección de otros ensayos y permite combinar con encuestas epidemiológicas para llevar a cabo estudios de evaluación del riesgo que de otro modo sería difícil de lograr [131].

La detección de microorganismos en el agua por PCR puede depender del método de extracción de ADN y de las características fisiológicas del microorganismo que afectan la extracción y la estabilidad del ADN. Los cambios en la fisiología microbiana asociados con el estado VBNC, como el engrosamiento de la pared celular [132] o la condensación del ADN, pueden afectar la extracción de ADN [104]

La PCR es una técnica simple y sencilla y proporciona un resultado fidedigno y rápido en el transcurso de 32 horas de obtenida la muestra, considerando que la muestra debe ser concentrada previamente durante 24 hs. La aplicación de técnicas de PCR a muestras de agua para detección de *Campylobacter* spp. ha resultado difícil, porque si el patógeno está presente es probable que sea en números bajos y necesita una concentración de las células antes de la amplificación por PCR [129].

Los métodos moleculares pueden incluir un paso previo de enriquecimiento en caldo para aumentar la recuperación de células injuriadas [31][131].

Los métodos de filtración permiten concentrar las células, pero algunos filtros de membrana inhiben la posterior PCR debido a la unión del ADN a ellos [129].

Para subsanar este inconveniente, Kirk y cols (1994) incorporaron una etapa de sonicación posterior a la filtración para eliminar las células del filtro, cabe aclarar que en su estudio utilizaron filtros de membrana de policarbonato y no de nitrocelulosa, como son los que se utilizaron en el presente trabajo de tesis [131].

En este trabajo las muestras se concentraron primero mediante un paso de filtración seguida de la utilización de un caldo altamente selectivo como el caldo Bolton.

La presencia de inhibidores presentes en las muestras, para los ensayos moleculares, representa una limitación en el análisis de muestras en general y especialmente en las ambientales. La eficiencia de extracción de ácidos nucleicos varía considerablemente entre los diferentes métodos y el rendimiento final depende de los métodos utilizados y el tipo de la muestra ambiental [131].El uso de DNA lisado por calor (boiling), puede llevar a obtener subproductos inespecíficos de bajo peso molecular, que son observados al realizar la electroforesis en gel de agarosa, esto no ocurre si se utiliza DNA purificado, por lo que la calidad del templado es crucial [133].

Se demostró que el ADN bacteriano persiste en las muestras ambientales y muestras clínicas aun cuando los cultivos aparezcan como negativos [134].

Reportes en la literatura sugieren que existe un número importante de laboratorios que están usando métodos moleculares para identificar especies de *Campylobacter* o para confirmar la identidad de la especie aislada [85][135]. La mayoría de los métodos basados en PCR que existen actualmente, no pueden proporcionar una comprensión de la viabilidad

de los organismos [11] y fueron puestos a punto para detectar solo campilobacterias termotolerantes como *C. jejuni, C. coli* y en algunos casos *C. lari* [136].

En el estudio realizado por Van Dyke y cols. se observó que con la técnica de PCR se podría detectar *Campylobacter* a bajas concentraciones, con frecuencias que van desde 57% hasta 79% y utilizando un método basado en cultivo entre 0% a 23% [107]. Esto se debe a que con la técnica de PCR se detectan células en estado VBNC, células muertas y ADN libre en las muestras de agua que con el cultivo tradicional no sería posible detectarlos [107].

Van Lit y cols. (2015) comparó la PCR con técnicas de cultivo tradicional, siendo la PCR 1,35 veces más sensible que el cultivo. La PCR detectó significativamente más casos positivos de *C. jejuni* que el cultivo [137].

Diferentes estudios han demostrado que el ADN de las células bacterianas podría persistir por más de tres semanas después de la muerte celular [138], esto podría llevar a resultados falsos positivos que podrían sobreestimar el número de células viables [139].

Según Hazeleger y cols. (1994), tanto las formas cultivables como las no cultivables son detectadas por PCR, sin embargo los niveles de detección podrían ser diferentes [140].

Para la detección de los genes específicos de *C. jejuni y C. coli*, en este trabajo se utilizó una técnica de PCR múltiple descripta por Hoffer y Farace que permite la diferenciación de *C. jejuni y C. coli* con el uso de primers según la secuencia nucleotídica de sondas monoespecíficas basadas en el gen altamente conservado *glyA* que codifica para una serinhidroximetiltransferasa [141][142][143]. Esta técnica fue puesta a punto por Hoffer y Farace para detectar y caracterizar especies termotolerantes de *Campylobacter* a partir de aislamientos procedentes de muestras de alimentos, materia fecal, agua o desde cepa pura. La sensibilidad de esta técnica reportada en la literatura es de 93-100% y la especificidad del 100% [133][141].

Se emplearon como controles positivos cepas que pertenecen a la colección del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas “Carlos Malbran” *C. jejuni* y *C. coli* y como pruebas de control de especificidad de la reacción *E. coli* ATCC 25922.

La técnica de PCR ha sido utilizada en este estudio, como una técnica más que aporta seguridad a los resultados obtenido por cultivo, ya que *Campylobacter* puede hallarse en un estado VBNC y solo con el cultivo la detección podría ser errónea. Por otra parte, la

diferenciación de *C. jejuni* de otros microorganismos del mismo género basada solo en la prueba de hipurato, no siempre define con precisión la identificación ya que se ha descripto la existencia de cepas de *C. jejuni* con ausencia de la enzima hipuricasa (además el gen puede estar alterado, o presente pero no transcripto).

Estudios previos realizados en aguas

Como resultado de la complejidad y variaciones estacionales dentro de ambientes acuáticos naturales y las variaciones vistas entre la supervivencia de las diferentes cepas, estudios comparables no han llegado a obtener resultados concluyentes.

Los resultados sobre la presencia de *Campylobacter* en ríos varían ampliamente entre los distintos investigadores, probablemente debido a las diferencias en cuanto a metodología de toma de muestra y de aislamiento [81].

Existen trabajos realizados en otros países donde se ha documentado el hallazgo de *Campylobacter* en aguas [12][13][65][85][86][84][88][92][107][144][145], aunque también fueron reportados resultados negativos [69].

Las tasas de aislamiento varían desde 0% a 87,5% y esta diferencia podría estar relacionada con los métodos utilizados para detección de *Campylobacter* del agua, aunque otros estudios sugieren que las diferencias están relacionadas con el momento del año en que se realiza el muestreo [146].

La mayoría de los estudios de los distintos autores, que reportan la presencia de especies del género *Campylobacter* han sido de naturaleza cualitativa [57].

Varios brotes de gastroenteritis por *Campylobacter* spp. asociados al consumo de agua han sido descritos [9].

En un estudio realizado en el Reino Unido se demostró que las aguas superficiales estaban contaminadas regularmente con *Campylobacter*, introducción producida por las aguas residuales no tratadas o escorrentía superficial [81], y que los números se redujeron después de la exposición prolongada a los rayos UVB [97].

Bolton y cols (1987) han demostrado que las aguas del río contienen una variedad de *Campylobacter* spp. y que, si bien existe contaminación ambiental, el efecto de los efluentes cloacales vertidos en los ríos es muy importante [12].

De las diferentes especies de *Campylobacter, C. jejuni* es el principal agente causal de brotes de enfermedades transmitidas por el agua alrededor del mundo [12][88][101] [147], aunque la mayoría datan de países Nórdicos [57]. La determinación de especies distintas de *C jejuni* podrían estar subestimadas, debido a que no son llevadas a cabo y los procedimientos de cultivo y especiación podrían no ser los adecuados para la mayoría de las otras especies detectadas [107]. El primer brote identificado de *Campylobacter* transmitido por el agua fue reportado en 1978 y tuvo lugar en Bennington Vermont, US, y afectó a 3000 personas [148]. Actualmente los brotes permanecen subestimados en muchos países debido al deficiente sistema de notificación específica de casos [57].

Fernández y cols. en un estudio realizado en aguas de río hallaron *C. coli* con mayor frecuencia (77,3%) que *C. jejuni* (22,7%), contrariamente a lo reportado por otros autores.

A pesar de esta diferencia, es necesario tener en cuenta que ambas especies son consideradas como importantes agentes de las enfermedades diarreicas, y las aguas contaminada son reconocidos como una fuente epidemiológica de los brotes, así como casos esporádicos de la campilobacteriosis intestinal [9][13].

FUNDAMENTACIÓN

La presencia de campilobacterias en ambientes acuáticos ha sido estudiada por diferentes autores con resultados variables: algunos autores no lograron detectarlo y otros informan altas frecuencias de aislamiento.

Fueron reportados diferentes factores, bióticos y abióticos, que podrían influir sobre la presencia de especies de *Campylobacter* en aguas superficiales.

De la exhaustiva revisión bibliográfica realizada en bases de datos nacionales e internacionales, no se encontraron trabajos hechos en Argentina en los que se estudiara la presencia de *Campylobacter* en ambientes acuáticos.

Debe destacarse que la vigilancia de los microorganismos patógenos en los ambientes frecuentados por la población es clave para entender la epidemiología de las enfermedades humanas y poder establecer medidas profilácticas y /o de control.

Teniendo en consideración que en nuestra región coexisten muchos factores ecológicos que podrían facilitar la transmisión de campilobacterias, el conocimiento que se tenga de la distribución de estas bacterias, podría ser un dato epidemiológico que contribuiría a mejorar las medidas de prevención y control de esta zoonosis.

Todo lo antedicho despertó el interés por conocer cuál es la relación entre estos patógenos a fin de descartar o incluir al medio acuático natural como reservorio de campilobacterias.

Adicionalmente, se propone estudiar la sobrevida de estas bacterias en el laboratorio bajo condiciones controladas similares a las de los ambientes acuáticos de nuestra región, a fin de conocer si los factores ambientales condicionan la presencia de *Campylobacter* en aguas de uso recreacional de nuestra región.

HIPOTESIS

- Los ambientes acuáticos de uso recreacional de nuestra zona se comportan como reservorios de especies termotolerantes de *Campylobacter* patógenas para el hombre.
- La presencia de estas especies en dichas fuentes de agua está condicionada por la contaminación fecal y determinadas variables ambientales propias de estos espacios.
- La sobrevida de *Campylobacter* spp. en condiciones experimentales controladas permite explicar la presencia o ausencia de especies de este patógeno en ambientes naturales.

OBJETIVOS

- Objetivo 1: Evaluar el papel del agua de uso recreacional como reservorio de dos especies termotolerantes de *Campylobacter*.
    a. Estudiar la presencia de *C. jejuni* y *C. coli* en ambientes acuáticos de uso recreacional mediante técnicas de cultivo y PCR.
    b. Determinar el grado de contaminación fecal de las lagunas mediante el recuento de *E. coli* y coliformes totales.
    c. Registrar variables ambientales al momento de la recolección de muestras.

- Objetivo 2: Estudiar el tiempo de supervivencia de *C. jejuni* bajo diferentes condiciones experimentales controladas:
    a. A diferentes temperaturas (ambiente y de refrigerador).
    b. En presencia de radiación solar UV por exposición directa a la luz solar.
    c. En presencia y ausencia de flora acompañante.

- Objetivo 3: Relacionar los resultados obtenidos en los ambientes naturales con la supervivencia de *C. jejuni* en condiciones controladas de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Detección de *Campylobacter* en muestras de agua

Descripción del área de estudio

La ciudad de Resistencia se sitúa en el sudeste de la provincia del Chaco, Argentina. Posee una población del orden de 400.000 habitantes y una superficie de 202 km². La precipitación media anual es de 1415 mm, y el clima es cálido subtropical húmedo. Se asienta sobre la llanura aluvial del río Paraná, a 50 metros sobre el nivel del mar y está atravesada por el meandroso Río Negro en sentido noroeste-sudeste, con un gran número de lagunas asociadas. Muchas de las lagunas existentes antes de la fundación de Resistencia fueron rellenadas, quedando hoy unas 20 en el área metropolitana. Entre ellas se puede destacar la laguna Argüello, que hoy es el centro de un parque a 10 cuadras de la plaza central, y que puede alcanzar los 4 m de profundidad. Estas lagunas de forma semilunar son en general tramos que el río Negro abandonó.

El sistema de drenaje pluvial está integrado al sistema natural de lagunas asociadas al Río Negro. Está conformado por conductos subterráneos y zanjas poco profundas que descargan en las lagunas; las mismas actúan como reservorios temporales para finalmente descargar en el Río Negro, mediante bombas o por gravedad a través de alcantarillas con compuertas, según el nivel de restitución. Dicha cuenca abarca zonas más o menos céntricas y zonas periurbanas, en su cuenca se desarrollan diferentes actividades [16].

La ciudad de Corrientes limita al norte y al oeste con el Río Paraná, encontrándose a 1208 km aguas arriba de su desembocadura en el Río de la Plata. Predomina el clima subtropical sin estación seca, con una temperatura media anual de 21°C y abundantes precipitaciones, entre 1400 y 1900 milímetros anuales, con escasas variaciones diarias y estacionales.

La ciudad de Resistencia se halla a 17 km de la ciudad de Corrientes, a la cual la vincula el Puente General Belgrano. Entre ambas forman un conurbano de casi 800.000 habitantes.

En ambas provincias fueron seleccionados diferentes puntos dentro de los ríos y lagunas, que actúan como centros recreativos y donde la población se halla en estrecho contacto con el agua ya sea a través de actividades recreacionales de contacto primario o secundario.

Respecto a las lagunas elegidas, en las zonas periurbanas más próximas a la ribera de la laguna, las actividades o usos del suelo dominantes son: residencial y comercial-administrativa, también existen algunos talleres mecánicos, lavaderos, pequeñas explotaciones hortícolas y ganaderas familiares [17].

Una de las lagunas más estudiadas de Resistencia fue la Laguna Argüello, por ser la misma la más céntrica y la de más fácil acceso para la población ya que ha sido recuperada para ser utilizada como espacio recreativo.
En agosto del año 2002, la Administración Provincial del Agua (APA) tomó la iniciativa de recuperar la laguna a través de un proyecto solicitado a la Facultad de Arquitectura – U.N.N.E. y mediante un convenio con la Municipalidad de Resistencia, aunaron esfuerzos para lograr dicho fin. El proyecto consistió en la creación de espacios comunitarios, terrestres y acuáticos, para poder desarrollar el esparcimiento, la recreación, los deportes, etc. En una segunda etapa, se realizó la ampliación de la capacidad del reservorio de la Laguna Argüello en el sector comprendido entre la Avenida Paraguay y la Avenida Laprida; con el objeto de almacenar y retener los excesos hídricos de la cuenca urbana de la laguna, para su posterior escurrimiento en forma controlada hacia la Laguna Los Lirios [149].

Para el desarrollo de este trabajo se seleccionaron ríos y lagunas utilizados con fines recreativos por los habitantes de las ciudades de Resistencia y Corrientes.
En Resistencia, fueron elegidas las lagunas Argüello (Calle Ayacucho), Francia (Avenida Rissione), Colussi (Avenida Sarmiento), Los Lirios (Avenida 9 de Julio y calle 12, sobre puente a la altura de Avenida Paraguay) y Navarro (Avenida 9 de Julio y Avenida Urquiza, a la altura de calle Arturo Illia), el Río Negro a la altura del Puente Ejército Argentino, Puente San Fernando en Club de Regatas Resistencia y Playa Río Bermejito (Figuras 1 a 5). En Corrientes, sobre el Río Paraná fueron elegidas las playas Arazatí, Club de Regatas Corrientes, Molina Punta y Punta San Sebastián (Figura 6).

Tipos de sitios muestreados

Se estudiaron muestras de agua provenientes de **fuentes superficiales** (ríos y lagunas) utilizadas con fines recreacionales para contacto primario (natación, surf, etc.) o secundario (pesca, canotaje, remo, etc.).

A continuación, se presentan fotos algunos de los lugares muestreados

Fig. 1: Laguna Navarro Avenida 9 de Julio y Avenida Urquiza (Resistencia)

Fig. 2: Laguna Los Lirios - Avenida 9 de Julio y calle 12 (Resistencia)

Fig. 3: Laguna Argüello - Calle Ayacucho (Resistencia)

Fig. 4: Río Negro - Puente Ejército Argentino (Resistencia)

Fig. 5: Laguna Colussi - Avenida Sarmiento (Resistencia)

Fig. 6: Río Paraná: Altura Club de Regatas (Corrientes)

Los sitios muestreados son los señalados en los mapas satelitales presentados a continuación

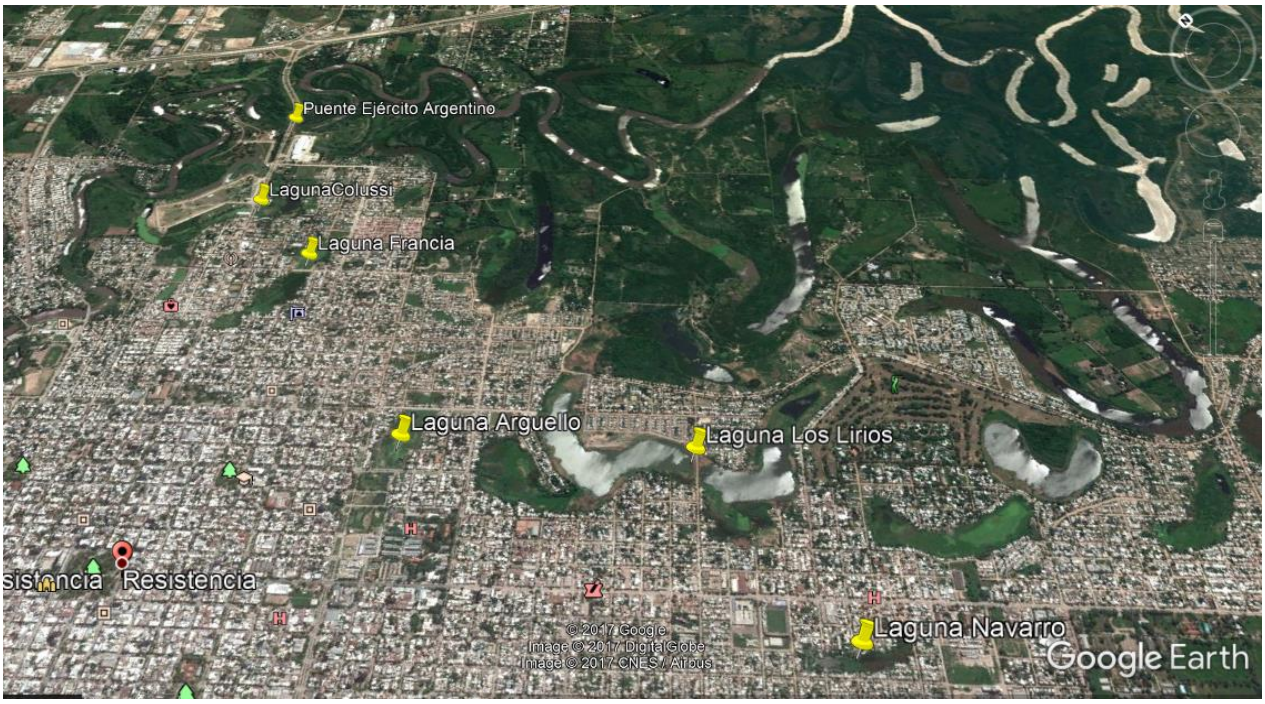


Figura 7: Mapa sitios de muestreo ciudad de Resistencia

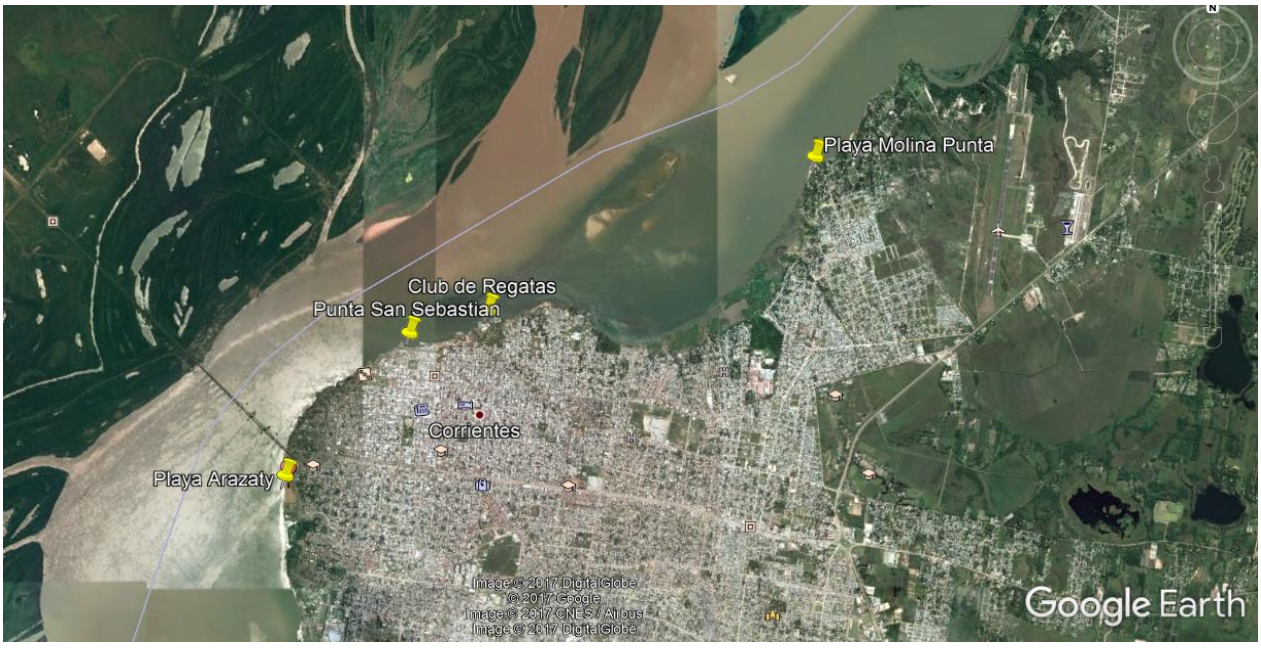


Figura 8: Mapa sitios de muestreo ciudad de Corrientes

Registro de datos de las muestras

Cada muestra incorporada estuvo acompañada de datos acerca de su origen, fecha y hora de la recolección, turbidez, temperatura y pH del agua y precipitaciones previas (considerando este dato como positivo cuando la muestra se tomó dentro de las 72 horas posteriores a la precipitación pluvial) [107].

Obtención de las muestras

La toma de las muestras se realizó desde los márgenes a un metro de la costa y en sentido contrario a la corriente o desde los puentes. Se recolectaron en frascos estériles de 5 litros, a 20 cm de profundidad, en cada una de las estaciones del año.

Se recolectaron muestras en las primeras horas de la tarde, en diversas condiciones ambientales y climáticas.

Las muestras fueron transportadas protegidas de la luz solar al laboratorio a temperatura ambiente dentro de las 2 horas de su recolección [150].

Durante las tomas de muestra, también se tomaron fotografías que brindan una rápida y clara idea de las características actuales del entorno de estos ambientes.

Procesamiento de las muestras

1 Filtración a través de membranas

El aspecto general de las muestras fue de límpido a ligeramente turbio por lo cual luego de homogeneizarlas por inversión varias veces se procedió a la filtración de 1 litro de agua [83]. La metodología general que se empleó fue la de filtración a través de membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm para cada muestra de agua [151].

La Técnica de filtración de membranas utiliza un mecanismo mediante el cual se atrapan en la superficie de una membrana microorganismos cuyo tamaño es mayor que el tamaño del poro empleado. Esto es posible gracias a una bomba de vacío eléctrica que ejerce una presión diferencial sobre la muestra de agua haciendo que se filtre. Los microorganismos de menor tamaño que el específico del poro pasan la membrana o quedan retenidos en su interior. Las bacterias quedan retenidas en la superficie de la membrana y luego esta es llevada a un medio enriquecido selectivo, quien a través de un intercambio metabólico y

una incubación, evidencian el crecimiento de microorganismos y unidades formadoras de colonias (UFC) [127][31][23].

Frente a muestras de aguas turbias, se utilizó más de una membrana filtrante hasta lograr filtrar todo el volumen de la muestra [152].

Aunque la mayoría de las células bacterianas quedan retenidas en la membrana del filtro con poros de 0,45 µm, la gran movilidad y la forma alargada de *Campylobacter* spp. facilita el paso de algunas células a través de los pequeños poros [125][153]. Teniendo en cuenta esto, se incorporó un filtro de poros de 0,2 µm a fin de detectar las formas más móviles o las forma cocoides [5][151]. Es decir, se realizó un primer filtrado utilizando una membrana de 0,45 µm y toda el agua que pasó a través de ese filtro se volvió a filtrar utilizando una membrana de 0,2 µm. Cada filtro por separado se colocó en caldo de enriquecimiento selectivo Bolton.

En las figuras 9 a 11 se presentan los componentes del equipamiento necesario para el proceso de filtración.

Fig. 9: Equipo de filtración
bomba de vacío, portafiltro y frasco de Kitasato

Fig. 10: Dispositivo con membrana filtrante

Fig. 11: membranas filtrantes

2 Enriquecimiento de las muestras

Las membranas filtrantes fueron colocadas asépticamente en caldo de enriquecimiento Bolton teniendo la precaución de no dejar más de 20 mm entre la superficie del caldo y la tapa del contenedor que debe cerrarse herméticamente [5][151][154].

Estos caldos se incubaron primero 4 horas a 37°C, para permitir la recuperación de células de *Campylobacter* que podrían estar injuriadas y luego durante 20 horas a 42ºC en aerofilia [31][154][155]. Los componentes de este caldo (piruvato de sodio y metabisulfito de sodio) permiten la captación de derivados tóxicos del $O_{2,}$ posibilitando la incubación aeróbica de los mismos.

3 Recuento de coliformes totales y E. coli

Para determinar el número de coliformes totales y *E. coli*, se utilizaron ampollas con medio de cultivo ENDO-050 (MICROCLAR). Una vez filtradas las muestras, estas ampollas se depositaron sobre el filtro obteniendo resultados simultáneos para coliformes totales y para *E. coli*. En este medio las colonias de coliformes totales muestran un color rojo, mientras que las de *E. coli* muestran además un brillo metálico característico. A estas colonias que presentaron brillo metálico se le realizaron pruebas adicionales para corroborar que fueran *E. coli.*

Para realizar los recuentos, se filtró una alícuota de 100 ml de una dilución 1:100 de muestra de agua utilizando membranas filtrantes de 0,45 µm de poro. Estas membranas se incubaron por 24 horas en aerobiosis a 37°C.

En la figura 12 se pueden observar los colores de las colonias de *E. coli* y coliformes totales en la membrana filtrante

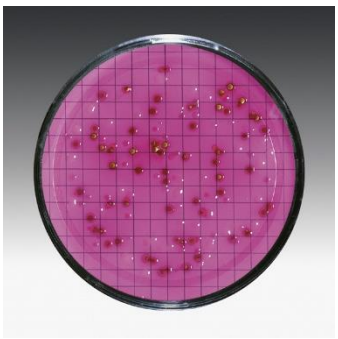


Fig. 12: Membrana filtrante con medio mENDO para el recuento de coliformes totales (colonias rojizas sin brillo) y *E. coli* (colonias con brillo metálico)

4 Aislamiento bacteriano

Transcurridas las 24 horas de incubación del caldo Bolton, se realizó un repique en medio mCCDA (Agar modificado Desoxicolato Cefoperazona Carbón). Estas placas de cultivo se incubaron durante 48 horas a 42°C en atmósfera microaerofílica (10% CO_2, 5% O_2) [154] [143]. Como control aeróbico de crecimiento se realizó un repique en medio Agar Base Columbia (ABC) adicionado con 5% (v/v) de sangre lisada de caballo el cual se incubó en atmosfera aerofílica durante 48 horas a 42ºC.

5 Identificación bacteriana

Finalizado el tiempo de incubación de las placas de medio de cultivo, se observaron las colonias sospechosas que desarrollaron en el medio mCCDA. La falta de desarrollo en ABC confirmó su naturaleza microaerofílica. Se consideraron como posibles aislamientos de *C. jejuni* en mCCDA las colonias planas, no hemolíticas de aspecto acuoso, grisáceas, con bordes irregulares y con tendencia a diseminarse [5] [154][156][157] [152]. En la figura 13 se muestra el desarrollo de colonias típicas de *C. jejuni* en medio mCCDA.

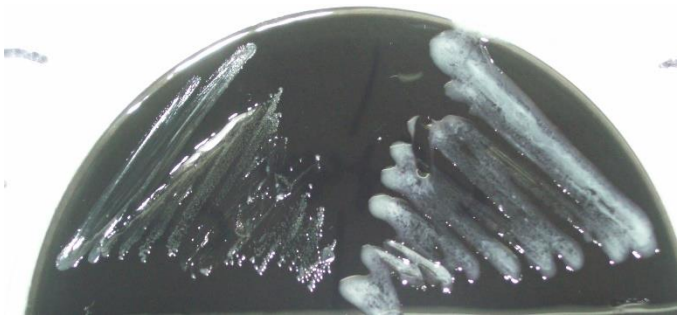


Fig. 13: Desarrollo de colonias de *Campylobacter* spp. en el medio de cultivo CCDA modificado luego de 48 horas de incubación a 42°C en microaerofilia. A la izquierda, *C. coli* y a la derecha, *C. jejuni*

El cultivo se deteriora rápidamente en el aire por lo que las placas debieron ser examinadas inmediatamente después de ser extraídas del ambiente microaerofílico y las pruebas bioquímicas debieron realizarse inmediatamente después de la lectura de las placas ANEXO I [5][31][158].

A cada colonia compatible con *Campylobacter* spp. se le realizó una extendido que se coloreó con la tinción de Gram modificada utilizando carbolfucsina al 0,8% como colorante de contraste en lugar de safranina [154]. Se continuó con la identificación frente a aislamientos de bacilos gramnegativos curvos, espirilados o en forma de "S" [46][5][156].
En la figura 14 se presenta una imagen de la coloración de Gram realizada a partir de las colonias que desarrollaron en microaerofilia.

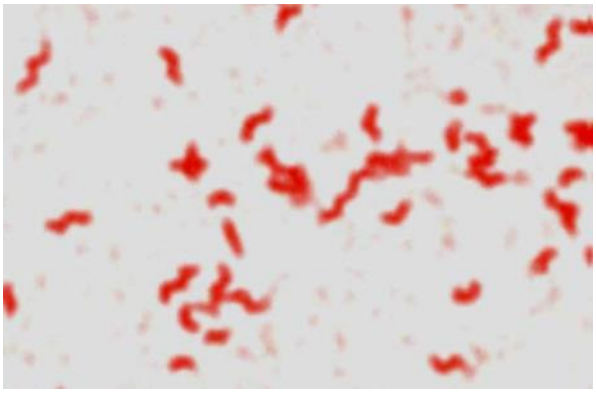


Fig. 14: Coloración de Gram de una colonia que desarrolló en microaerofilia (1000X). Obsérvese las características células espiraladas, con forma de coma y de "S"

La motilidad se estudió mediante la observación de una porción de la colonia suspendida en solución salina, mediante un microscopio óptico, considerándose positiva al observarse bacterias con gran motilidad en forma circular o de sacacorchos.
A las colonias seleccionadas se les realizaron las siguientes pruebas [154]: producción de catalasa y oxidasa, sensibilidad al ácido nalidíxico y cefalotina, hidrolisis de hipurato de sodio, producción de ácido sulfhídrico y crecimiento en NaCl al 3,5%. En las figuras 15 y 16 se muestran algunas pruebas bioquímicas realizadas para *C. jejuni* y *C. coli*

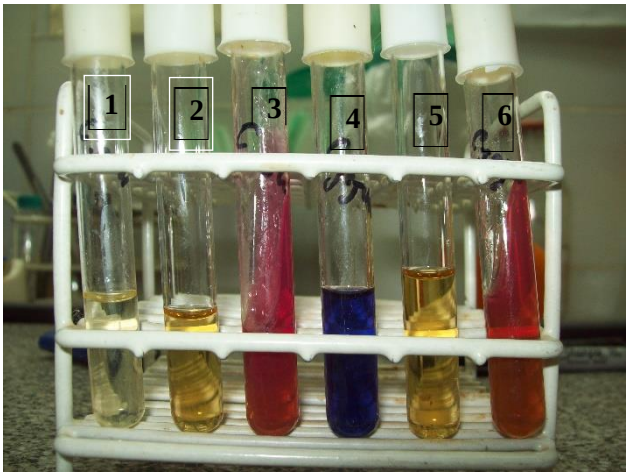


Fig. 15: Pruebas bioquímicas. Hidrólisis de Hipurato (4) Reacción positiva, (1) Reacción negativa. Crecimiento en NaCl 3,5%: (2) y (5) Negativo. TSI: (3) y (6) sin producción de H2S

Fig. 16: Prueba de oxidasa: derecha: reacción positiva; izquierda: reacción negativa

6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La extracción del DNA bacteriano se realizó a partir del caldo Bolton, luego de transcurridas 24 hs. de incubación, una alícuota de 10 ml se centrifugó durante 10 minutos a 3500 RPM, se eliminó el sobrenadante y se guardó el sedimento a -20ºC para su posterior estudio mediante técnicas moleculares.

Al momento de realizar la PCR, se procedió primero a un lavado de las muestras con buffer PBS, luego se aplicó el método de Boiling que consiste en el calentamiento a 100°C durante 10 minutos para la lisis celular y finalmente se realizó un centrifugado durante 10 minutos a 12.000 RPM y luego, se utilizó el sobrenadante como templado.

Para la detección de los genes específicos de *C. jejuni* y *C. coli*, se aplicó la técnica de PCR múltiple descripta por Hoffer y Farace, la cual se detalla en el ANEXO II [143][159]. Luego de la amplificación los productos fueron revelados en gel de agarosa utilizando el colorante intercalante Gel Red®. El gel fue observado y fotografiado utilizando un transiluminador UV. Los productos de amplificación fueron una banda de 773 pb correspondiente a *Campylobacter jejuni* y una banda de 364 pb correspondiente a *Campylobacter coli* que los podemos observar en la figura 17.

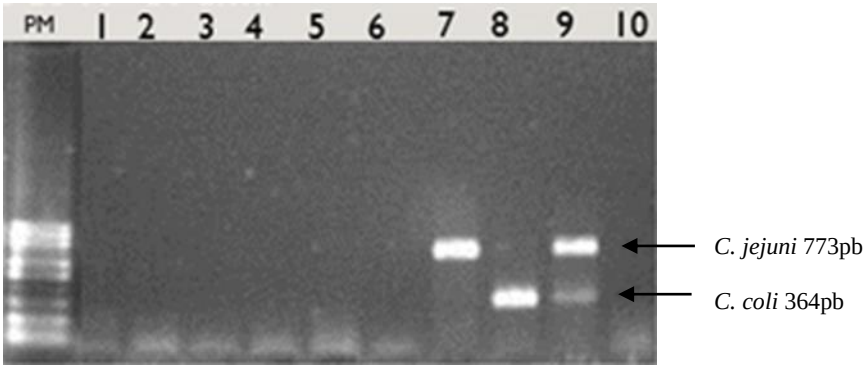


Fig. 17: PCR múltiple para detección simultanea de *C. jejuni* y *C. coli*
Marcador de PM 100pb. Calle 1-6: Muestras Negativas. Calle 7: *C. jejuni* a 773 pb*; Calle 8: C. coli* a 364 pb*;* Calle 9*: C. jejuni y C. coli;* Calle 10 Control negativo

Se emplearon como controles positivos cepas de *C. jejuni* y *C. coli* pertenecientes a la colección del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS "Carlos G. Malbrán". Como control negativo se utilizó la cepa *E. coli* ATCC 25922.

Toda la metodología utilizada fue probada y controlada inoculando muestras de agua mineral estéril y muestras extraídas de laguna con dichas cepas control.

Procesamiento estadístico de datos

Los datos obtenidos fueron ingresados en el programa *Epi Info 6.0* para su posterior análisis

2.- Estudio de la sobrevida de *Campylobacter* bajo condiciones controladas de laboratorio

Para evaluar la sobrevida en el tiempo de *Campylobacter jejuni* se utilizó una cepa patrón provista por el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", la que fue inoculada en diferentes muestras de agua obtenidas de la Laguna Argüello, pues es la que se halla en el casco céntrico de la ciudad y por lo tanto es la más utilizada actualmente con fines recreativos.

Se realizaron 3 estudios de supervivencia: 1) a temperatura ambiente sin exposición a la luz solar, 2) a temperatura de refrigerador y 3) a temperatura ambiente con exposición a la luz solar. Cada prueba fue realizada por duplicado.

Estudio de supervivencia a temperatura ambiente sin exposición a la luz solar

Se tomaron dos muestras de agua de 5 litros cada una y fueron llevadas inmediatamente al laboratorio para su procesamiento.

Una de ellas fue sometida a un proceso de esterilización a 120 ºC durante 15 minutos (LEC), con el objeto de eliminar microorganismos presentes en la misma y que solo se conserven las condiciones fisicoquímicas del agua.

La otra muestra, se utilizó para conocer las condiciones iniciales de la muestra del agua de laguna y para el estudio de *E. coli* y coliformes totales según el método previamente descripto.

Ambas muestras se inocularon con una suspensión 0,5 de McFarland preparada a partir de la cepa patrón de *C. jejuni,* a fin de obtener una concentración bacteriana final de 10^5 UFC/ml.

Ambos recipientes fueron cubiertos con una bolsa negra de residuos para evitar el contacto con la luz y colocados en la mesada del laboratorio a temperatura ambiente.

Luego de 24 horas, 7, 14, 21 y 28 días de incubación, se aplicó la metodología de filtración del agua a través de membranas utilizando filtros de 0,45 µm y 0,20 µm; se realizó el cultivo de enriquecimiento en caldo Bolton, y el posterior subcultivo en medio selectivo mCCDA. Tras incubación en microaerofilia durante 48 horas se procedió a la identificación bioquímica de las colonias presuntivas, según protocolos previamente descriptos.

Estudio de supervivencia a temperatura en refrigerador

Se tomaron dos muestras de agua al mismo tiempo, de 5 litros cada una, y fueron llevadas inmediatamente al laboratorio para su procesamiento. Una de ellas fue sometida a un proceso de esterilización a 120ºC durante 15 minutos (LEC).

Ambas muestras se inocularon con una suspensión 0,5 de McFarland preparada a partir de la cepa patrón de 24 horas de *C. jejuni* hasta obtener una concentración bacteriana final de 10^5 UFC/ml.

Los dos recipientes fueron cubiertos con una bolsa negra de residuos y colocados en la heladera.

Luego de 24 horas, 7, 14, 21 y 28 días de incubación, se aplicó la metodología de filtración del agua a través de membranas utilizando filtros de 0,45 µm y 0,20 µm; se realizó el

cultivo de enriquecimiento en caldo Bolton, y el posterior subcultivo en medio selectivo mCCDA. Tras incubación en microaerofilia durante 48 horas se procedió a la identificación bioquímica de las colonias presuntivas, según protocolos previamente descriptos.

Estudio de supervivencia a temperatura ambiente con exposición a la luz solar

Se tomaron dos muestras de agua de laguna al mismo tiempo de 5 litros cada una, y fueron llevadas inmediatamente al laboratorio para su procesamiento.

Una de ellas fue sometida a un proceso de esterilización a 120ºC durante 15 minutos (LEC). Ambas muestras se inocularon con una suspensión 0,5 de McFarland de la cepa patrón de 24 horas de *C. jejuni* obteniéndose una concentración bacteriana final de 10^5 UFC/ml.

Se colocó cada una de las muestras en un recipiente plástico transparente de 5 litros cada uno previamente esterilizados, para permitir el paso de la luz solar a través de ellos y así evaluar el efecto de la radiación solar sobre las muestras.

Luego de 24 horas, 7, 14, 21 y 28 días de incubación, se aplicó la metodología de filtración del agua a través de membranas utilizando filtros de 0,45 µm y 0,20 µm; se realizó el cultivo de enriquecimiento en caldo Bolton, y el posterior subcultivo en medio selectivo mCCDA. Tras incubación en microaerofilia durante 48 horas se procedió a la identificación bioquímica de las colonias presuntivas, según protocolos previamente descriptos.

RESULTADOS

1- Estudio de muestras ambientales

Durante todo el estudio se recolectaron 75 muestras de agua de ríos (28) y lagunas (47) provenientes de los puntos detallados previamente. Dentro de los lugares citados para la realización de los muestreos cabe destacar que, en determinadas épocas del año, algunos lugares (por ejemplo: Laguna Francia, Laguna Colussi) se hallaron cubiertos de camalotes lo cual dificultó el muestreo por lo que se estudiaron muchas más muestras de algunos lugares que de otros (ANEXO IV).

Ninguna de las 75 muestras analizadas resultó positiva para *C. jejuni* ni para *C. coli* mediante cultivo ni mediante PCR.

Las temperaturas medias, máximas y mínimas halladas fueron de: 25,3°C; 32,6°C y 16,7°C, respectivamente.

El valor de pH promedio de todas las muestras estudiadas fue de 7,50, aunque debe considerarse que los valores de pH fueron muy fluctuantes dependiendo el momento de la toma de muestra, pasando de valores de pH cercanos a 5, hasta valores de pH 9.

El 55% de las muestras presentó aspecto ligeramente turbio, el 35% turbio y solo un 10% de las muestras fueron límpidas.

La media de los recuentos de coliformes totales fueron de 3,6 x 10^4 UFC/ml y los recuentos de *Escherichia coli* se presentaron con una media de 1,2 x 10^3UFC/ml. En el 72% de las ocasiones de muestreo no se registraron lluvias durante las 72 previas.

2- Estudios de supervivencia en condiciones controladas

2.1- Prueba de supervivencia a temperatura ambiente al resguardo de la luz solar

La temperatura promedio fue de 25,2ºC y el pH promedio de 7,53.

Se observó desarrollo de *Campylobacter* hasta los 21 días de estudio en la muestra esterilizada, mientras que en la muestra sin tratar los cultivos fueron positivos solo hasta los 14 días.

En la muestra sin tratar el recuento de coliformes totales fue incrementándose hasta el día 14 para luego negativizarse al cabo de 28 días, mientras que el recuento de *Escherichia coli* se negativizó al cabo de 14 días.

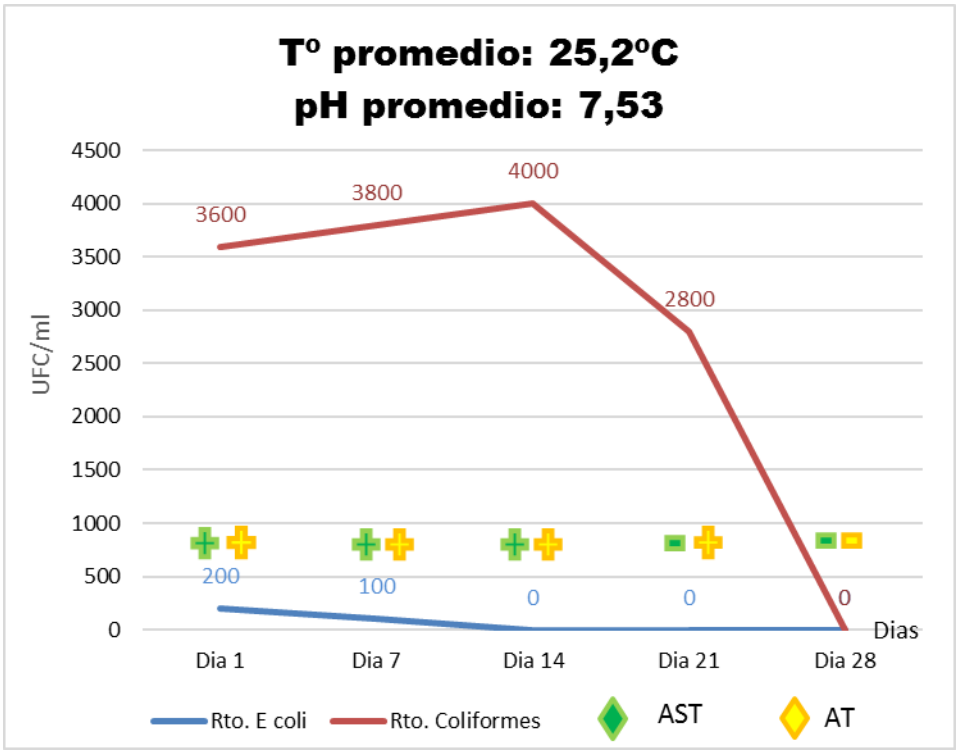
Los parámetros observados se muestran en la Tabla II y se observan a continuación en el Gráfico I.

Tabla II Resultados obtenidos durante 28 días de incubación a temperatura ambiente sin exposición a la luz solar del agua inoculada con *C. jejuni*

	Dia 1		Dia 7		Dia 14		Dia 21		Dia 28	
Parametros	AST	AT	AST	AT	AST	AT	AST	AT	AST	AT
Rto. *E coli*	200	NC	100	NC	SD	NC	SD	NC	SD	NC
Rto. Coliformes totales	3600	NC	3800	NC	4000	NC	2800	NC	SD	NC
Desarrollo de *C. jejuni*	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
TºC	26,5		26		25,8		25,3		22,4	
pH	7,45		7,4		7,6		7,58		7,6	

Abreviaturas: AST: agua sin tratar; AT: agua tratada en autoclave; SD: sin desarrollo; NC: no corresponde

Gráfico I: UFC/ml en función de los días de estudio



2.2- Prueba de supervivencia a temperatura de refrigerador

Durante el período de estudio la temperatura promedio de la muestra inoculada fue de 8,4ºC y el pH promedio fue de 8,7.

El recuento de *E. coli* prácticamente se mantuvo en el tiempo ($2x10^2$ UFC/ml) mientras que el de coliformes totales disminuyó de $1,1x10^4$ a $3x10^3$ UFC/ml.

Las muestras presentaron desarrollo de *C. jejuni* durante 21 días en presencia de flora autóctona y solamente resultaron positivas hasta el día 7 en la muestra previamente esterilizada.

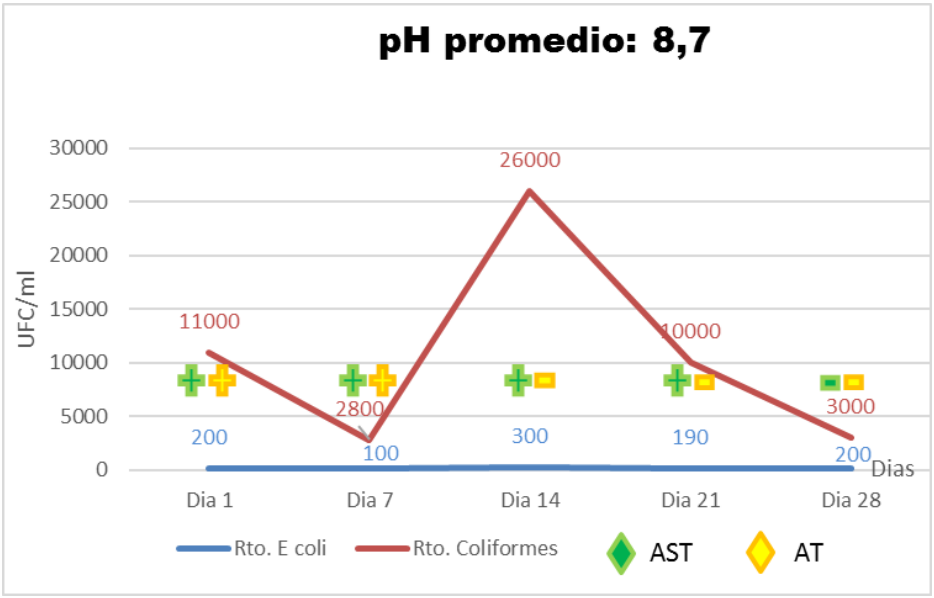
Los parámetros observados se muestran en la Tabla III y se observan a continuación en el Gráfico II.

Tabla III: Resultados obtenidos durante 28 días de incubación a temperatura de refrigerador sin exposición a la luz solar del agua inoculada con *C. jejuni*

	Dia 1		Dia 7		Dia 14		Dia 21		Dia 28	
Parametros	AST	AT	AST	AT	AST	AT	AST	AT	AST	AT
Rto. *E coli*	200	NC	100	NC	300	NC	190	NC	200	NC
Rto. Coliformes totales	11000	NC	2800	NC	26000	NC	10000	NC	3000	NC
Desarrollo de *C. jejuni*	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
pH	8,7		7,46		8,69		9,9		9	

Abreviaturas: AST: agua sin tratar; AT: agua tratada en autoclave; SD: sin desarrollo; NC: no corresponde

Gráfico II: UFC/ml en función de los días de estudio



2.3- Prueba de supervivencia a temperatura ambiente con exposición a la luz solar

La sobrevida de *C. jejuni* en ambas muestras fue menor a 24 horas.

La temperatura promedio de la muestra durante el período de estudio fue de 24,7ºC y el pH promedio de 8,9.

El recuento de *E. coli* en la muestra sin tratar fue de 100 UFC/ml y el de coliformes totales de $2,5x10^4$ UFC/ml.

DISCUSIÓN

El presente trabajo de tesis se focalizó en detectar la presencia de campilobacterias en ambientes acuáticos recreacionales y determinar los factores que influyen en su supervivencia. El propósito fue obtener información que permita comprender la ecoepidemiología de estos patógenos en relación con la enfermedad diarreica aguda, dado que nuestra región la prevalencia de *Campylobacter* spp. en la población pediátrica en nuestra zona fue del 6,5% en el año 2013 [56].

Con igual finalidad, las campilobacterias termotolerantes patógenas para el hombre han sido objeto de numerosas publicaciones científicas llevadas a cabo en diferentes países en los últimos años.

Las campilobacterias termófilas son ubicuas en los medios acuáticos, pero su detección puede ser difícil ya que el organismo puede estar presente en números bajos y/o sub-letalmente lesionados [82].

En investigaciones previas, *C. jejuni* y organismos estrechamente relacionados fueron recuperados de las aguas con frecuencia variable [60][57][84][160][161][162] [163].

En un estudio realizado por Bolton y cols. donde se han podido aislar distintas especies de *Campylobacter* spp. a partir de muestras de río, se concluye que el aislamiento de biotipos patógenos y serotipos conocidos de *C. jejuni* confirma que el agua del río es una fuente potencial de infección para los animales que beben el agua y para las personas que usan el sistema fluvial con fines recreativos [12]. Según estos autores, las aguas de río contienen una variedad de *Campylobacter* spp. y si bien la contaminación ambiental realmente ocurre, el efecto de los efluentes cloacales vertidos en los ríos es un factor muy importante [12].

Detección de campilobacterias en ambientes acuáticos

Hay varios problemas relacionados a la detección de *Campylobacter* en aguas, incluyendo su presencia en números bajos y la interferencia de otras bacterias debido al lento crecimiento de los organismos.

En nuestro caso, los medios utilizados arrojaron excelentes resultados en muestras con baja y mediana turbidez inoculadas con la cepa patrón de *C. jejuni*. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por otros autores [93][123].

Respecto al método de filtración por membranas, según lo reportado por Donnison, solo algunas células de *Campylobacter* quedarían retenidas en el filtro de 0,45 µm**,** pero por su movilidad, la mayoría lo atravesarían y quedarían retenidas en el filtro de 0,2 µm. Además bajo las condiciones de estrés ambiental, estas bacterias adquieren forma cocobacilar que también es probable que solo puedan recuperarse con el filtro de menor tamaño [31].

Es por lo antedicho que se consideró de suma importancia incorporar el uso de los dos filtros en el estudio de *Campylobacter* a partir de muestras de agua ya que este comportamiento podría afectar su recuperación si la bacteria se halla estresada o en muy bajas concentraciones en el agua [164].

Algunos autores consideran innecesario la utilización de este segundo filtro. Los estudios de Rosef y cols. demostraron que la mayor recuperación se obtuvo con filtros de membrana Millipore de 0,45 µm y la filtración posterior a través de una membrana de 0,22 µm no aumentó el rendimiento [119] .Este resultado también es coincidente con lo observado por Martikainen y cols. (1990) quien comparó el rendimiento de distintos tamaños de filtro no obteniendo recuperación con filtros de 0,2 µm, considerando que el filtro de 0,45 µm retiene eficientemente las células de *Campylobacter* [71].

En nuestro estudio, pudo observarse que a medida que pasa el tiempo, *Campylobacter* desarrolla en los repiques obtenidos de los caldos donde se colocaron los filtros de 0,2 µm. Esto podría deberse, según Donnison, a que *Campylobacter* adquiere forma cocobacilar como respuesta al estrés al que está sometido lo que le permitiría atravesar con facilidad el filtro de 0,45 µm y por ende quedar atrapado en el de 0,2 µm [31].

El medio mCCDA es un medio selectivo que permite eliminar la flora acompañante. Mateo y cols., en su trabajo concluyen que la recuperación de *Campylobacter* en mCCDA fue negativa afectada por el sobrecrecimiento bacteriano de flora acompañante; sin embargo, la detección de *Campylobacter* y la identificación de especies por PCR no se vieron afectadas [165].

En cuanto a la técnica de amplificación de ADN, su sensibilidad y especificidad son ideales para el monitoreo de microorganismos patógenos en el agua aunque la metodología de PCR puede detectar células viables (cultivables y no cultivables), células muertas o ADN extracelular y los resultados pueden depender de la técnica de extracción de ADN y la fisiología de la especie en particular [104].

En este trabajo, mediante PCR no se obtuvieron resultados positivos a partir del caldo de enriquecimiento, aunque, como se indicó más arriba, posee una elevada sensibilidad (93-100%).

Los límites de detección reportados en la literatura son variables, de alrededor de 10- 20 UFC/ml agua [129], 30 UFC/ 100 ml de agua [166] o 10-100 UFC/ 100 ml agua [167].

En este trabajo el límite de detección de la PCR a partir de caldo fue obtenido utilizando diluciones seriadas de las cepas de referencia provista por el Instituto ANLIS Malbran de *C. jejuni* y de *C. coli* (ver ANEXO III). Según nuestra experiencia la PCR a partir de caldo permite detectar hasta 10^2 UFC/ml.

Esto en realidad resulta insuficiente si se pretende determinar el riesgo sanitario de los espacios recreativos ya que deberían utilizarse técnicas que detecten solo las células viables (cultivables y no cultivables) que son las que realmente comprometerían a la salud de los ocupantes de dichos espacios. En nuestro caso no se detectó material genético asociado a estas especies patógenas por lo que podemos asegurar que los cuerpos de agua estudiados no se comportan como reservorio de campilobacterias patógenas para el hombre.

Influencia de la temperatura del agua en la sobrevida de *Campylobacter*

La supervivencia de *C. jejuni,* en ambientes acuáticos también ha sido un tema abordado por diferentes autores. Los sistemas experimentales utilizados, sin embargo, han variado, por lo que la evaluación sistemática de los resultados resulta difícil.

La supervivencia en estos "microcosmos de agua" ha demostrado ser mejorada a bajas temperaturas [69][94][168][169], en particular a temperaturas de alrededor de 4°C. Los tiempos de supervivencia previamente determinados para *C. jejuni* en agua varían ampliamente desde unos pocos días a temperaturas ambientales hasta semanas e incluso meses a 4°C [94][96]. Estas diferencias pueden reflejar variaciones de tensión de oxígeno o simplemente las diferencias en los sistemas experimentales utilizados [96].

Según estudios previos, al parecer el factor que determina la permanencia de *Campylobacter* en agua es la temperatura, la cual juega un rol clave en la determinación de la persistencia y porcentaje de decaimiento de las cepas de *Campylobacter* [44].

Es por ello que en el presenta trabajo las muestras fueron tomadas en las distintas estaciones del año, lo que implica también distintas temperaturas correspondientes a la estación.

Existe una relación inversa entre la temperatura del agua y el porcentaje de la población cultivable al igual que en otros estudios [44][94][95][96].

Temperaturas por debajo de los 22ºC incrementan la supervivencia de *Campylobacter* [96][113][169]. La persistencia de *Campylobacter* en microcosmos acuosos se ve mejorada a bajas temperaturas, especialmente a temperaturas alrededor de 4°C [97]. En los casos donde se aisló *Campylobacter* del agua o se sospechó el agua como fuente de contaminación, la temperatura media fue de 5ºC [170] y el número de aislamientos aumentó cuando la temperatura se halló entre 1,7ºC y 11,5ºC [52].

En el presente trabajo, se comprobó que *Campylobacter* permaneció más tiempo viable a bajas temperaturas que a temperatura ambiente, lo que coincide con estudios previos consultados. En general, al igual que en otros estudios, la capacidad de crecer en medios de cultivo disminuyó progresivamente con el tiempo [96].

Blaser y cols. estudiaron el efecto de la temperatura sobre la supervivencia de *C. jejuni* en agua [168]. Encontraron que a 4°C el microorganismo podía sobrevivir durante 1 a más de 4 semanas, mientras que a 25°C la bacteria persistía sólo durante 4 días [87].

Según Buswell y cols. los tiempos de supervivencia fueron mucho mayores a 10ºC y 4°C (7 y 8 días respectivamente) que a 37°C y 22ºC (1 y 2 días, respectivamente), y el mayor cambio en los tiempos de supervivencia se produjo entre 10ºC y 22°C (7 días a 2 días) [96].

A pesar de que utilizaron un sistema experimental diferente, Terzieva y McFeters también coinciden en que los aislamientos permanecen cultivables entre los 4 y 10ºC por largos períodos (más de 10 días), pero que la supervivencia de *Campylobacter* a temperaturas entre 22ºC y 37ºC es como máximo de 48 horas [169]. Estos autores concluyen diciendo que la temperatura de umbral a la que los tiempos de supervivencia se vuelven marcadamente más corta es de entre 16°C y 22°C [169].

Hazeleger y cols. en su estudio, hallaron que las cepas de *Campylobacter jejuni* se volvieron no cultivables después de aproximadamente 1 semana a 25°C, de 3 semanas a 12°C y de 6 semanas a 4°C [140].

Estos resultados son bastante similares a los obtenidos en este estudio en las muestras inoculadas y conservadas en refrigerador, donde *Campylobacter* desarrolló hasta 21 días (tres semanas), pero a diferencia de estos autores, a 25ºC, nosotros obtuvimos desarrollo. La temperatura promedio de los muestreos (25,3ºC), fue similar a la obtenida en el estudio de supervivencia a temperatura ambiente en condiciones de laboratorio controladas, tanto en oscuridad (25,2ºC) como expuesto a la luz solar (24,7ºC), pero se pudo obtener desarrollo de *Campylobacter jejuni* hasta 14 días en agua de laguna inoculada mantenida en oscuridad, lo cual sugiere que tal vez la temperatura no sería el factor determinante de la ausencia en las aguas recreacionales.

Estos resultados confirman que 25ºC no es la temperatura más favorable para la supervivencia y/o crecimiento de campilobacterias.

En nuestro estudio la temperatura promedio del agua en las muestras ambientales estudiadas fue de 25,3ºC lo cual podría ser uno de los factores que influyeron en la falta de detección de campilobacterias en los ambientes acuáticos.

Esto también fue lo reportado en el estudio de Hu y cols. en aguas de río de Taiwán, donde la mayoría de las muestras estudiadas presentaron una temperatura cercana a los 25ºC y debido a ello la detección por cultivo les resultó difícil [84]. Los autores atribuyen el bajo porcentaje de aislamientos positivos (2/78) para *Campylobacter* en los cuerpos de agua a que este podría hallarse muerto o en estado VBNC. *C jejuni* puede permanecer en este estado durante 4 a 5 meses (138 a 152 días respectivamente)[109].

La transición al estado VBNC se debe a otros factores además de la temperatura, por ejemplo inanición, y el este estado se ve favorecido por la incubación a 37 °C en lugar de 4 °C [104]

En nuestro caso podemos descartar la presencia del estado VBNC en las aguas recreacionales estudiadas ya que todas las muestras fueron sometidas a la prueba de PCR y ninguna de ellas arrojó resultados positivos.

Influencia de la radiación UV en la sobrevida de *Campylobacter*

El elevado porcentaje de radiación UV durante la mayor parte del año es otro factor que pudo haber influido en nuestros resultados, ya que según estudios previos se ha demostrado el efecto esterilizante que tiene este factor sobre la aguas poco profundas [97].

Fue demostrado que los rayos ultravioleta dañan e incluso matan las células de *Campylobacter* en un corto tiempo [85].

También existe evidencia de que *Campylobacter jejuni* es más sensible a la radiación UV que algunos otras bacterias patógenas [171].

Experimentos previos en los cuales se estudiaron los efectos de la luz demostraron que *Campylobacter* en las aguas residuales y el agua de mar, demostraron que se eliminaron dentro de los 60 y 30 minutos de luz del día, respectivamente, pero sobrevivieron durante 24 horas en la oscuridad [172]. La evidencia indirecta de los efectos de la luz solar también fue presentada por Obiri-Danso y cols. (1999), quienes demostraron que *Campylobacter* estaba presente en las aguas salinas por la mañana (presumiblemente como resultado de la entrada durante la noche) pero ausente por la tarde después de medio día de exposición a la luz solar [173].

En base a lo mencionado, puede afirmarse que la radiación solar sería el factor crucial que afecta directamente la sobrevida de estas bacterias en el agua, independientemente de la presencia de microbiota acompañante.

Los períodos más largos de exposición a la radiación UV en nuestra zona podrían contribuir a reducir la supervivencia de estas bacterias en ambientes acuáticos y las tasas de aislamiento concomitantes [85].

En nuestro estudio de supervivencia, la temperatura promedio de las muestras de agua que estuvieron a temperatura ambiente, es similar entre los estudios realizados en oscuridad (25,2ºC) y el que se dejó expuesto a la luz solar directa (24,7ºC), con la diferencia que en las muestras expuestas a la radiación solar, la sobrevida de *Campylobacter* no superó las 24 horas, a diferencia de lo ocurrido con aquellas muestras mantenidas alejadas de la radiación UV, en las cuales el tiempo de recuperación de la bacteria fue muy superior.

Influencia de las precipitaciones en la presencia de *Campylobacter* en ambientes acuáticos

Precipitaciones abundantes 72 horas previas a la toma de muestras sólo se registraron en el 28% de las ocasiones. Es sabido que las precipitaciones pluviales pueden facilitar el transporte de microorganismos indicadores y patógenos, así como también pueden diluir patógenos presentes en la misma [116][117], y esto directamente se asocia con un aumento de la contaminación de las aguas [57].

Las heces en las cercanías de los cuerpos de agua pueden ser arrastradas por acción del viento y las lluvias a las aguas superficiales [174].

Aun así, en estos casos no se han hallado resultados positivos en las muestras ambientales estudiadas, y ello puede deberse a la escasez de entornos con elevado contenido de heces animales en las lagunas y ríos de nuestra región.

Influencia del origen de las cepas en la sobrevida de *Campylobacter*

Aunque hubieron pocos estudios sistemáticos sobre la supervivencia de diferentes cepas de *C. jejuni* en sistemas de agua, todos coinciden en que la capacidad de *C. jejuni* para sobrevivir en ambientes acuáticos pobres en nutrientes pueden diferir según el origen de las cepas [113][169].

Es por lo antedicho que debe tenerse en cuenta que la supervivencia varía en función del origen de la cepa [96], de la especie involucrada y del microcosmo en el cual las campilobacterias se adaptan para vivir [88].

Es comprobado que la depredación y la competencia con otros microorganismos reducen los tiempos de supervivencia de C. *jejuni* y *E. coli* en agua [101][175].

En el experimento realizado por Buswell y cols. a 4ºC el tiempo de supervivencia en el agua fue de 29 días para una cepa aislada de la piel de pollo, mientras que para otra proveniente de una muestra clínica fue de 14 días [96].

También existen diferencias respecto a la especie involucrada, por ejemplo, existen estudios previos que demuestran que *C. coli* sobrevive mucho menos que *C. jejuni* en aguas superficiales [101][176], en tanto que en otros no hallaron diferencias significativas [96].

La cepa utilizada como control positivo en este trabajo fue una cepa de *C. jejuni* de origen humano, que representa uno de los serotipos más comunes aislados en el hombre, pero la recuperación de otras cepas debe ser estudiada y validada [93].

Relación de la presencia de *Campylobacter* con indicadores de contaminación fecal

Los elevados recuentos de coliformes totales encontrados en las muestras ambientales de este estudio evidencian una importante contaminación bacteriana, lo cual se correlaciona con trabajos previos que documentan la contaminación de las lagunas dentro del ejido

urbano de Resistencia con residuos cloacales provenientes de desagües clandestinos [16][17][118].

En Argentina no existe reglamentación que fije los límites de concentración de indicadores bacterianos en aguas recreacionales [19] ni estándares que regulen en forma completa y segura la calidad del agua destinada a actividades recreativas, incluso en el ámbito internacional las regulaciones existentes son escasas [4].

A la vez existen discrepancias respecto a si este los indicadores bacterianos de contaminación afectan la presencia de *Campylobacter* en aguas.

Carter y cols. no hallaron correlación entre sus resultados y los parámetros microbiológicos medidos, sugiriendo que los indicadores bacteriológicos de calidad del agua no son buenos predictores de la presencia de *Campylobacter* spp [87].

Dorner y cols. observaron que los niveles de *Campylobacter* frecuentemente aumentan antes que los coliformes y que además llegan a ser indetectables también mucho antes [177].

Saint Pierre y cols concluyen que la presencia o ausencia de campilobacterias termófilas no puede ser inferida a partir de los valores de indicadores de contaminación fecal o turbidez debido a que existe pobre correlación entre los mismos [102].Estos resultados coinciden con los reportados por Van Dyke y cols. quienes consideraron que los parámetros de calidad del agua no son útiles para predecir la presencia o las concentraciones de *Campylobacter* en agua de río [107]. Según Savill y cols. (2001) *Campylobacter* fue detectado aun en muestras donde *E. coli* estuvo ausente [85].

En el estudio realizado por Bolton y cols. *Campylobacter* solo fue aislado a partir de muestras que contenían *E. coli* pero no hubo correlación entre los recuentos de estos dos organismos [12].

Según Korhonen y Martikainen, *Escherichia coli* sobrevive mejor que *C. jejuni* en agua de lago en distintas condiciones [175] [178]. Similares resultados fueron reportados por Cook y cols., donde adujeron que *E. coli* puede estar presente en las aguas por mucho más tiempo y responder a la composición del agua de forma muy diferente a *C. jejuni* [34].

El diferente comportamiento de los indicadores de contaminación fecal y de *Campylobacter* bajo condiciones controladas fue puesto en evidencia en este trabajo de tesis.

A temperatura ambiente el recuento de *E. coli* de la muestra inoculada con *C. jejuni* fue disminuyendo con el tiempo (se negativizó al cabo de 14 días) y mientras que el recuento de coliformes totales fue incrementándose hasta el día 14 para luego negativizarse a los 28 días de incubación. Aquí se observa que se produce una multiplicación de coliformes seguramente favorecida por la temperatura. En estas condiciones se obtuvo desarrollo de *C. jejuni* hasta el día 14.

En las muestras incubadas en heladera, el recuento de *E. coli* se mantuvo en el tiempo (con un recuento promedio de 200 UFC/ml), mientras que el recuento de coliformes totales primero sufre una disminución para hacer un pico máximo al día 14 y luego disminuir sin negativizarse al final del estudio. Esto, puede atribuirse a que la temperatura óptima de crecimiento de coliformes totales es de 35ºC por lo que la baja temperatura no favorecería su desarrollo. Aquí la cepa de *C. jejuni* se mantuvo viable hasta los 21 días.

Debido a que *Campylobacter* pueden sobrevivir en el agua pero no puede multiplicarse en las condiciones normales del agua natural, el hallazgo de campilobacterias en el agua puede ser considerado como un indicador de contaminación fecal reciente [168].

Puede afirmarse que, si los indicadores de contaminación indican polución del cuerpo de agua con materia fecal humana o animal, implica que cualquier enteropatógeno podría estar presente incluyendo *Campylobacter* spp, pero tal vez por su labilidad a las condiciones ambientales o por su asociación a biofilms o a protozoos presentes en los medios acuáticos la detección puede no ser satisfactoria.

En nuestro estudio de supervivencia, pudimos observar que el comportamiento de *Campylobacter* y el de los indicadores de contaminación fecal fue diferente y que no podemos descartar la presencia de campilobacterias en nuestras lagunas, aun en ausencia de *E. coli.*

En general, puede concluirse que el comportamiento de los organismos indicadores no siempre se correlaciona con el patógeno buscado.

Es prudente entonces considerar a estos cuerpos de agua que presentan indicios de contaminación fecal, como fuentes potenciales de *Campylobacter* spp., como así también de cualquier enteropatógeno.

Relación de la sobrevida de *Campylobacter* con la flora autóctona

La depredación y la competencia con otros microorganismos podrían reducir los tiempos de supervivencia de *C. jejuni y C. coli* en agua [101][178]. Nosotros obtuvimos resultados variables cuando realizamos el estudio en presencia y en ausencia de flora autóctona.

La presencia de flora autóctona juega un rol importante en la supervivencia de los microorganismos y observamos que la interacción con la misma en algunos casos puede mejorar la supervivencia de patógenos dependiendo de la temperatura.

En el estudio *in vitro* que se realizó a temperatura ambiente, *C. jejuni* sobrevivió mucho menos (14 días) en la muestra que conservó la flora autóctona de la laguna que en la muestra previamente esterilizada (21 días), lo cual da indicios de que existe competencia por nutrientes y/o depredación que afectan a la supervivencia de las especies en el medio ambiente acuático. Esto coincide con lo reportado por Korhonen y Martikainen quienes en su estudio concluyen que todas las especies sobrevivieron mejor en agua pretratada (autoclavada/filtrada) que en el agua no tratada [175][176].

Sin embargo, en la muestra que se estudió en heladera se observó un comportamiento contrario, ya que *C. jejuni* sobrevivió por mucho más tiempo en la muestra que conservó su flora autóctona que en la misma muestra que se esterilizó. Esto no se ha podido observar en el experimento realizado en heladera donde ocurrió lo inverso. Una posible razón podría ser que durante la esterilización en autoclave algunos nutrientes lábiles al calor esenciales para la supervivencia de *C. jejuni* en forma cultivable se destruyan, o que se produzcan subproductos tóxicos que afecten a las células [175].

Pareciera que la combinación de la temperatura y la microflora autóctona del agua mejoran la supervivencia del agente patógeno considerablemente. Esta observación está de acuerdo con estudios sobre otros patógenos que han demostrado que la interacción con la microflora constituyente pueden mejorar la supervivencia de patógenos [179][180].

Influencia del pH en la sobrevida de *Campylobacter*

El pH de las aguas puede variar según los distintos tipos de vertidos que reciban las mismas. Valores de pH en el agua entre 6 y 9 son los más aptos para el desarrollo de la vida acuática [4]. En el presente trabajo, descartamos el pH como factor relevante para la

ausencia de su recuperación en ambientes acuáticos ya que el pH óptimo de crecimiento *Campylobacter* está entre 6,50 y 7,50 y el pH promedio observado de las muestras estudiadas se halló dentro del óptimo para su crecimiento [181]. Aunque pudimos observar que, en nuestra prueba de supervivencia a temperatura del refrigerador, el pH promedio fue de 8,7 y aun así pudo desarrollar *Campylobacter,* acentuando más la idea de que el pH no sería un factor tan relevante.

Influencia del ambiente circundante en la presencia de *Campylobacter*

Otro factor, y no menos importante, es el sitio de muestreo, ya que la mayoría de las muestras estudiadas de la ciudad de Resistencia, pertenecen a lagunas que quedan dentro del entramado urbano; sólo unas pocas corresponden a lugares periurbanos donde personas de bajos recursos viven en viviendas precarias en las riberas de las lagunas y áreas próximas, utilizando dicha fuente de agua para lavado de alimentos y como vertederos o receptor de residuos sólidos urbanos y residuos cloacales en algunos casos, aumentando aún más el riesgo sanitario que implica la contaminación de las lagunas para la población asentada en sus inmediaciones [17].

Además, las lagunas estudiadas actúan como reservorios temporales del sistema de drenaje pluvial para finalmente descargar en el Río Negro. Según estudios previos, en los distintos puntos de las lagunas estudiadas no existen diferencias significativas entre parámetros fisicoquímicos aunque si los valores de coliformes totales difieren significativamente entre algunos puntos [91].

Los sitios de muestreo fueron elegidos estratégicamente incluyendo los lindantes con asentamientos poblacionales, cercanos a huertas familiares y, los menos por su escasez, próximos a gallineros, todos potenciales hábitats predisponentes para el desarrollo de *Campylobacter* y que podrían actuar como potenciales reservorios, considerando que estos microorganismos podrían ser transportados hacia la laguna aumentando la posibilidad de contaminación de las aguas.

El punto de muestreo en Laguna Los Lirios, por ejemplo, corresponde a un lugar que recibe contaminación antrópica de los asentamientos ilegales en las orillas de la laguna [17] [91].

De las lagunas estudiadas, a nivel provincial no se han realizado controles rutinarios ni un seguimiento programado de las mismas. Solo se realizaron eventuales tareas de

desmalezado y mantenimiento por parte de la Municipalidad de Resistencia y monitoreos por parte de la Administración Provincial de Agua (APA), por lo que actualmente se desconoce el estado trófico de las mismas.

En los últimos años, se han llevado adelante tareas tendientes a la recuperación de los ambientes lacustres, como el caso de las lagunas Colussi (con parquizado y limpieza periódica) y Argüello (aumento de la capacidad, mejoramiento del funcionamiento, vegetación) [182].

Los datos disponibles que se tienen en cuanto al estado de alguna de las lagunas son escasos y datan del año 2011 [183].

Dentro de los lugares citados para la realización de los muestreos cabe destacar que, en determinadas épocas del año, algunos lugares se hallaron cubiertos de irupés y vegetación variada, lo cual dificultó la toma de la muestra por lo que se estudiaron muchas más muestras de algunos lugares que de otros. Esto se puede observar en la Tabla IV, donde se muestran las frecuencias por sitios de muestreo

Tabla IV: Tabla de frecuencia según sitio de muestreo

Nombre de la fuente	Tipo de fuente	Número de Muestras
Laguna Arguello	Laguna	29
Puente Ej. Argentino	Río Negro	15
Laguna Colussi	Laguna	8
Laguna Los Lirios	Laguna	6
Laguna Francia	Laguna	3
Laguna Navarro	Laguna	1
Puente San Fernando	Río Negro	1
Club Regatas Rcia.	Río Negro	1
Rio Bermejito	Río Bermejito	3
Club Regatas Ctes.	Río Paraná	3
Playa Arazaty Ctes.	Río Paraná	3
Punta San Sebastián	Río Paraná	1
Playa Molina Punta	Río Paraná	1

La proliferación de algas, cianobacterias y macrófitos se observa en los ecosistemas acuáticos eutrofizados donde se comienza a dar una alteración de la biota y de la diversidad biológica [184]. Este proceso de eutrofización de las lagunas favorecería en principio el desarrollo de *Campylobacter*, en caso de estar presente, ya que el fitoplancton que ocupa la superficie deja un ambiente propicio reducido en oxigeno por debajo de él.

Otra observación importante es que el Río Negro a la altura del Puente Ejército Argentino se comporta como un ecosistema lentico, proporcionando un sitio favorable para el reservorio de enteropatógenos.

CONCLUSIONES

- En ninguna de las muestras de aguas recreacionales estudiadas pudo detectarse la presencia de campilobacterias termotolerantes patógenas para el hombre por cultivo tradicional, resultado que fue confirmado por PCR.
- Contrariamente a lo planteado en la hipótesis del trabajo, no puede afirmarse que las aguas de uso recreacional se comporten como reservorio y/o vehículo de transmisión de estas especies causantes de gastroenteritis en el hombre, las que en otros países del mundo son los principales agentes etiológicos de dichas patologías.
- De acuerdo a los estudios de supervivencia, podemos aseverar que las condiciones del ambiente acuático de nuestras aguas recreacionales son propicias para la supervivencia de *Campylobacter*.
- La detección de *Campylobacter* por parte de otros autores en diferentes partes del mundo no implica que todos medios acuáticos se comporten de igual manera, ya que las condiciones ambientales del agua en sí misma y de su entorno condicionan la contaminación con esta bacteria y su sobrevida en el agua.
- Pudo demostrarse que en las muestras ambientales analizadas los organismos indicadores de contaminación fecal como *E. coli* y coliformes totales presentan un comportamiento diferente al de *Campylobacter*, hecho que fue corroborado por los estudios de las muestras artificialmente contaminadas.
- En base a los resultados de las pruebas de supervivencia bajo condiciones controladas, puede concluirse que las elevadas temperaturas y las fuertes radiaciones UV a las que se hallan expuestas las aguas de uso recreacional de nuestra zona durante la mayor parte del año son dos factores claves que impiden la sobrevida de *Campylobacter* en dichos ambientes.
- En base a lo antedicho se pone de manifiesto que la ausencia de *Campylobacter* en los ambientes estudiados no depende de un solo factor, sino de una suma de factores bióticos y abióticos que convergen para condicionar la presencia y/o sobrevida de estas bacterias.
- Este estudio, el primero en su tipo realizado en nuestro país, representa un aporte no sólo desde el punto de vista de la epidemiología de C*ampylobacter* en nuestras aguas, sino también soporta la idea de que la doble filtración es una metodología validada que

resulta ser la más adecuada para la detección de campilobacterias a partir de muestras de agua, en las cuales la carga bacteriana es baja y puedan existir formas cocoides.

RECOMENDACIONES

- Debido a que el hábitat natural de *Campylobacter* está constituido principalmente por las aves de corral y que existen granjas con instalaciones precarias en algunos de los puntos de acceso a las lagunas y ríos estudiados, es necesario continuar con el monitoreo de la calidad del agua en estos espacios.
- La vigilancia debe ser continua y no dar por descartada la posibilidad de contaminación del ambiente sólo ante la presencia de una muestra negativa.
- Para llevar a cabo actividades de vigilancia se justifica la incorporación del equipamiento y los recursos humanos necesarios en las ciudades que comparten su espacio de desarrollo con ambientes lacustres.
- Ante la ausencia de recuperación de campilobacterias en aguas de uso recreacional deberían buscarse otros reservorios y vehículos de transmisión de estas bacterias en el contexto epidemiológico de la salud humana.
- Aunque es vasto el conocimiento acerca de la variedad de patógenos en el ambiente y su asociación con la producción de enfermedades, mucho queda aún por hacer, especialmente en lo que se refiere a la detección de reservorios acuáticos de patógenos tanto viables cultivables como en la forma viable no cultivable.

ANEXO I: Pruebas de identificación bacteriana y tablas de diferenciación de especies

Para la identificación de colonias presuntivas de Campylobacter se realizaron las siguientes pruebas:

1-Tinción de Gram

Se utilizó carbolfucsina al 0,8% como colorante de contraste (este microorganismo no se tiñe bien con safranina)[185][185]. Se debe observar la presencia de los bacilos Gram negativos curvos, espiralados o en forma de "S"[156][46][5]. En cultivos viejos se pueden observar con morfología cocoide [5].

2-Observación del fresco

Con un microscopio óptico o de campo oscuro, se deben observar entre portaobjetos y cubreobjetos, bacilos curvos y/o espirilados con gran motilidad en forma circular o de sacacorchos.

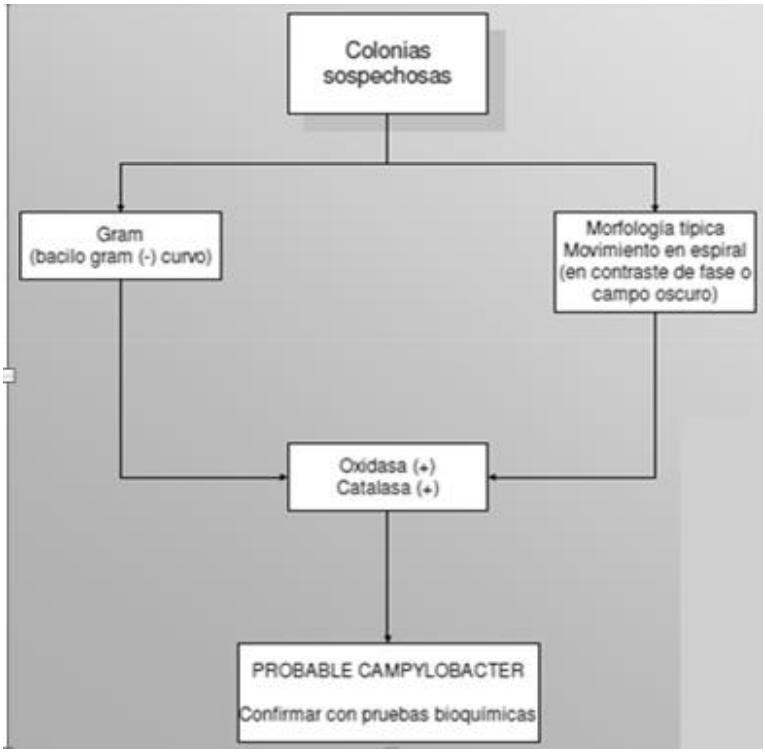
3-Catalasa

Se coloca sobre un portaobjetos limpio una colonia de cultivo fresco, se agrega una gota de peróxido de hidrógeno al 3%. Una reacción positiva se evidencia por la formación de burbujas producto de la liberación de oxígeno a partir de la reducción del peróxido de hidrógeno [185].

4-Oxidasa

En un tubo de hemólisis conteniendo 0,2 ml de agua destilada se coloca un buen inóculo, con un ansa plástica y luego se introduce un disco impregnado en la solución de oxalato de p-aminodimetilamina. La reacción positiva se evidencia por el desarrollo de color fucsia dentro de los 10 segundos posteriores [185][5]. Las colonias oxidasa negativa no requieren la realización de pruebas confirmatorias para *Campylobacter*. Las colonias de *Campylobacter* son oxidasa positivas [5].

Cuadro para Identificación Presuntiva de Campylobacter



Tomado de Viñas MR, Carrera de Especialización en Bacteriología Clínica, UNNE (2015)

Para llegar a la identificación bioquímica final, se realizaron otras pruebas adicionales:

5-Sensibilidad al ácido nalidíxico y cefalotina

Una suspensión (1 en la escala de McFarland) se siembra con hisopo sobre la superficie de una placa de ABC y se coloca un disco de ácido nalidíxico de 30 µg (Britania) y un disco de cefalotina de 30 µg (Britania). Se incuba 48 horas en microaerofilia y se observa la presencia o no de halo de inhibición de manera de determinar si la cepa es sensible a los antimicrobianos estudiados.

6-Hidrolisis de hipurato de sodio

Se suspende una ansada de la cepa en 400µl de una solución hipurato de sodio al 1%. Luego se incuba a 37°C durante 2 horas, se le agrega 200 µl de solución de ninhidrina al

3,5% en acetona-butanol 1:1 por la pared del tubo, se deja en reposo a 37ºC observándolo entre 10 minutos y 2 horas.

La aparición de una coloración azul-púrpura indica una reacción positiva que revela la presencia de glicina, producto final de la hidrólisis del hipurato. Solo *C. jejuni* es hipurato de sodio positivo [31]. Algunas cepas pueden dar negativa la reacción ya que presentan mutación en la enzima hipuricasa *(hipO*) [142]

7-Producción de ácido sulfhídrico

Se siembra una ansada en estría y profundidad del medio TSI (Triple azúcar hierro). El tubo se incuba durante 48 horas a 42°C en microaerofilia.

La producción de ácido sulfhídrico se pone en evidencia al formar sulfuro de hierro de color negro en el tubo.

8-Crecimiento en NaCl al 1,5%

Se siembra 0,1 ml de suspensión de una cepa en un tubo con agar Brucella semisólido con 1,5% de cloruro de sodio y rojo neutro como indicador.

Se incuba 3-5 días a 37°C en microaerofilia. Si se forma una delgada línea de desarrollo por debajo de la superficie la reacción es positiva.

Diferenciación de las especies termófilas de *Campylobacter* estudiadas

	C. jejuni	***C. coli***
Oxidasa	+	+
Catalasa	+	+
Crecimiento a 25ºC	-	-
Crecimiento a 42ºC	+	+
Desarrollo en Glicina 1%	+	+
Desarrollo en NaCl 1,5%	-	-
TSI (SH_2)	-	-
Hidrolisis de Hipurato	+	-
Sensibilidad a Acido Nalidíxico	S	S
Sensibilidad a Cefalotina	R	R

V= Variable; R= Resistente; (+) Positivo; (-) Negativo

ANEXO II: Protocolo de trabajo para la reacción PCR para detección de *Campylobacter jejuni y Campylobacter coli* en muestras de agua ambiental

Para la detección de los genes específicos de *C. jejuni y C. coli*, se usó una técnica de PCR múltiple descripta por Hoffer y Farace [143]

Muestra:

Aguas de ríos y lagunas

Obtención de la muestra:

1. La muestra de agua se filtra utilizando una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm y 0,20 µm de diámetro
2. Se colocan los filtros (uno o más de uno, según la turbidez del agua) en Caldo Bolton.
3. Se incuban los caldos 4 horas a 37ºC y luego 20 horas a 42ºC.
4. A las 24 horas se sacan de la estufa y se centrifugan 10 ml a 3500 RPM durante 10 minutos.
5. Descarto el sobrenadante y conservo el culote a -20ºC hasta su utilización.

Extracción del DNA

1. Sacar los tubos que contienen el culote del freezer
2. Resuspender en 5 ml de PBS o Solución Fisiológica estéril (SF)
3. Vortexear
4. Centrifugar
5. Eliminar el sobrenadante y realizar el lavado con buffer PBS o SF tres veces.
6. Eliminar el sobrenadante y conservar el culote
7. Resuspender el culote en 1 ml de agua de calidad molecular
8. Calentar durante 10 minutos a 100ºC en bloque térmico o a baño maría [186]
9. Dejar enfriar y centrifugar a 12000 RPM durante 10 min
10. Colocar el sobrenadante en otro tubo eppendorf
11. Guardo en freezer a -20ºC

Iniciadores

• Col 1: 5’ – AGG CAA GGG AGC CTT TAA TC – 3’

• Col 2: 5’ – TAT CCC TAT CTA CAA ATT CGC – 3’

• Jun 3: 5’ – CAT CTT CCC TAG TCA AGC CT – 3’

• Jun 4: 5’ – AAG ATA TGG CAC TAG CAA GAC – 3’

Mezcla de reacción

Para la preparación de los reactivos se utilizó como referencia el Manual de Biología Molecular 2011 [187]

Para preparar la mezcla de reacción “mix”

- Calcular según las concentraciones finales, los volúmenes de reactivos que se necesitan por tubo

Reactivos	**Cf**	Volumen necesario de reactivo (µl) a agregar según el número de tubos				
		1 tubo	**5 tubos**	**10 tubos**	**12 tubos**	**15 tubos**
Buffer 10X	**1X**	5	25	50	60	75
$MgCl_2$ 25 mM	**2 mM**	4	20	40	48	60
dNTPs 10 mM	**0,2 mM**	1	5	10	12	15
Jun 3 10 µM	**0,8 µM**	4	20	40	48	60
Jun 4 10 µM	**0,8 µM**	4	20	40	48	60
Col 1 10 µM	**0,8 µM**	4	20	40	48	60
Col 2 10 µM	**0,8 µM**	4	20	40	48	60
Agua		18.5	92.5	185	222	277.5
Taq pol 5 U/µl	**0,05 U/µl**	0.5	2.5	5	6	7.5
DNA		5				
Volumen final de Mix		**50**	245	500	600	750

Una vez que se han preparado los reactivos en las concentraciones de trabajo establecidas, y se han calculado los volúmenes de reactivo para cada tubo, se procede a preparar la “**mix de trabajo”.**

En dicha **mix**, se coloca el volumen de reactivo en función del número de tubos de trabajo, colocando por último el volumen de la Taq pol necesario ya que desde el momento de ponerse en contacto con los otros reactivos comienza a reaccionar.

- Rotular todos los tubos con los números correspondientes a las muestras y enumerar dos tubos más, uno para el control positivo y otro para el control negativo.
- Agregar el volumen de muestra (5 µl) en cada tubo
- Agregar 45 µl de la mix de trabajo
- Llevar los tubos al ciclador

Protocolo de amplificación:

- Un paso inicial de: 5 minutos a 94°C
- 2 ciclos de: 1 minutos a 94°C, 1 minutos a 64°C, 1 minutos a 72°C
- 2 ciclos de: 1 minutos a 94°C, 1 minutos a 62°C, 1 minutos a 72°C
- 2 ciclos de: 1 minutos a 94°C, 1 minutos a 60°C, 1 minutos a 72°C
- 2 ciclos de: 1 minutos a 94°C, 1 minutos a 58°C, 1 minutos a 72°C
- 2 ciclos de: 1 minutos a 94°C, 1 minutos a 56°C, 1 minutos a 72°C
- 30 ciclos de: 1 minutos a 94°C, 1 minutos a 54°C, 1 minutos a 72°C
- Un paso final de: 10 minutos a 72°C.
- Mantener a 4ºC

Corrida electroforética:

Pesar la cantidad necesaria de gel de agarosa al 2% (2 g/ 100 ml) y llevar a volumen utilizando buffer TAE 1X

Calentar a baño maría o en microondas hasta que quede una solución transparente.

Cuando se halla más o menos a 45°C se coloca el intercalante Gel Red® (3 µl por cada 100 ml de gel de agarosa). Si no tuviera Gel Red® se revelará al final con bromuro de etidio.

Colocar el peine correspondiente y dejar solidificar el agar.

Colocar en la cuba electroforética y llenarla con buffer TAE 1X hasta que tape completamente el gel.

Se deben largar las muestras, los controles positivo y negativo y el marcador de peso molecular.

Al momento de la siembra se mezclan 2µl de marcador de corrida con **10 µl de muestra** y luego se siembra en el pocillo correspondiente. Lo mismo se repite, sembrando **2 µl de marcador de peso molecular de100 pares de bases**, mezclado con el marcador de corrida. Una vez realizadas todas las siembras, se deja correr a 100 voltios 40 minutos.

Visualización

El gel fue observado y fotografiado utilizando un transiluminador UV.

Productos de amplificación

• Una banda de 773 pb correspondiente a *Campylobacter jejuni*

• Una banda de 364 pb correspondiente a *Campylobacter coli.*

ANEXO III: Límite de detección de la PCR

El límite de detección de la PCR a partir de caldo fue obtenido utilizando diluciones seriadas de las cepas de referencia provista por el Instituto ANLIS Malbran de *C. jejuni* y de *C. coli.*

Las cepas fueron repicadas en Agar Sangre (AS). Se incubaron a 42 ºC durante 48 hs en condiciones microaerofílicas. Una vez desarrollada la cepa se realizó una suspensión 0,5 McFarland con cada una de las cepas, medida con un nefelómetro (Este estándar de turbidez corresponde aproximadamente a una suspensión homogénea del orden de 10^8 UFC/ml). Se inocularon 10µl de cada suspensión 0,5 McFarland en 1 ml de caldo Bolton (10^6 UFC/ml). A partir de esta se realizaron diluciones seriadas 1/100 hasta llegar a tener una concentración de 1 UFC/ml (10^6 UFC/ml- 10^4 UFC/ml-10^2 UFC/ml- 1 UFC/ml). Estas diluciones de caldo sin incubar, se centrifugaron y con el culote se procedió a realizar la extracción de DNA y posterior PCR como se indicó más arriba. Además, se repicaron en mCCDA para corroborar su concentración en UFC/ml. Según nuestra experiencia, la PCR a partir de caldo permite detectar hasta 10^2 UFC/ml.

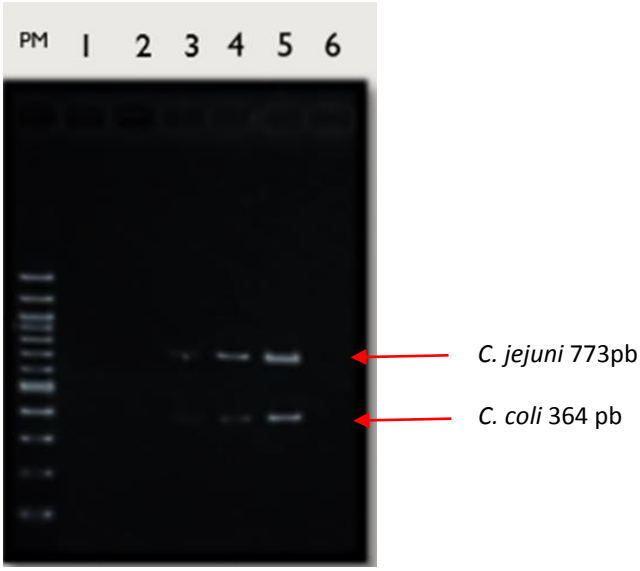


Figura 18: corrida electroforética. Límite de detección PCR
Marcador de Peso molecular 100 pb. Calle 1: Control negativo; Calle 2: 1 UFC/ml; Calle 3: 10^2 UFC/ml; Calle 4: 10^4 UFC/ml; Calle 5: 10^6 UFC/ml.

ANEXO IV: Datos de las muestras ambientales

Lugar de muestreo	Fecha y hora	Tipo de lugar	Lluvias previas	Aspecto	pH	T°	Rto Coliformes Totales	Rto *E. coli*	Desarrollo en CCDA	PCR
LAGUNA ARGUELLO	16/03/2009 17:15	Laguna	No	turbio	9,32	30,6	18800	300	No	No
LAGUNA ARGUELLO	20/04/2009 14:50	Laguna	No	turbio	8,58	29,1	15200	900	No	No
LAGUNA ARGUELLO	29/06/2009 16:15	Laguna	Si	ligeramente turbio	7,68	17	1000000	10000	No	No
LAGUNA ARGUELLO	25/08/2009 16:30	Laguna	No	ligeramente turbio	8,3	26,5	100000	1200	No	No
LAGUNA ARGUELLO	02/11/2009 17:30	Laguna	No	turbio	5,58	29,8	180000	1120	No	No
LAGUNA ARGUELLO	02/03/2010 17:00	Laguna	No	ligeramente turbio	7,86	30,5	20000	5300	No	No
LAGUNA ARGUELLO	14/03/2010 18:00	Laguna	No	ligeramente turbio	7,52	26,8	61000	1100	No	No
LAGUNA ARGUELLO	12/04/2010 14:00	Laguna	No	turbio	7,02	27,6	370000	90000	No	No
LAGUNA ARGUELLO	05/05/2010 13:50	Laguna	Si	ligeramente turbio	5,81	26,4	160000	12000	No	No
LAGUNA ARGUELLO	05/07/2010 13:40	Laguna	No	turbio	7,6	25,8	1400000	1400	No	No
LAGUNA ARGUELLO	16/11/2010 13:30	Laguna	No	ligeramente turbio	6,84	29,3	193200	1490	No	No
LAGUNA ARGUELLO	17/05/2011 17:30	Laguna	No	turbio	5,53	22,6	142600	1630	No	No
LAGUNA ARGUELLO	09/10/2011 17:30	Laguna	No	ligeramente turbio	7,9	30	124000	1340	No	No
LAGUNA ARGUELLO	25/10/2011 16:20	Laguna	Si	turbio	7,44	24,5	33600	4000	No	No
LAGUNA ARGUELLO	10/04/2012 17:30	Laguna	Si	ligeramente turbio	8,43	28,1	136000	1200	No	No
LAGUNA ARGUELLO	25/06/2012 17:30	Laguna	Si	turbio	7,46	20,8	154000	1560	No	No
LAGUNA ARGUELLO	13/08/2012 18:00	Laguna	No	límpido	7,76	22,6	196000	1450	No	No
LAGUNA ARGUELLO	12/11/2012 16:20	Laguna	No	ligeramente turbio	7,55	25,1	126000	1000	No	No
LAGUNA ARGUELLO	19/11/2012 16:15	Laguna	Si	turbio	7,55	25,1	141000	1260	No	No
LAGUNA ARGUELLO	05/03/2013 15:30	Laguna	No	ligeramente turbio	7,32	27	270000	9000	No	No
LAGUNA ARGUELLO	12/03/2013 11:30	Laguna	Si	turbio	7,51	25,1	15200	900	No	No
LAGUNA ARGUELLO	14/05/2013 15:10	Laguna	No	ligeramente turbio	7,55	23,5	19200	8800	No	No
LAGUNA ARGUELLO	11/06/2013 20:30	Laguna	Si	ligeramente turbio	8,01	20	70000	300	No	No
LAGUNA ARGUELLO	02/08/2013 15:00	Laguna	No	ligeramente turbio	8,04	21,1	40000	3800	No	No
LAGUNA ARGUELLO	15/10/2013 15:10	Laguna	No	turbio	9,12	26,4	7800	400	No	No
LAGUNA ARGUELLO	22/10/2013 13:10	Laguna	Si	turbio	7,7	25,9	13000	400	No	No
LAGUNA ARGUELLO	05/11/2013 9:00	Laguna	No	turbio	6,93	24,1	72000	600	No	No
LAGUNA ARGUELLO	13/05/2014 13:00	Laguna	No	ligeramente turbio	7,71	25,3	2800	200	No	No
LAGUNA ARGUELLO	26/05/2014 14:00	Laguna	Si	turbio	8,28	20	3600	200	No	No
PUENTE EJERCITO ARGENTINO	30/03/2009 8:50	Rio	No	ligeramente turbio	7,4	28,3	1600	120	No	No
PUENTE EJERCITO ARGENTINO	18/05/2009 15:20	Rio	Si	ligeramente turbio	7,47	23	1680	90	No	No
PUENTE EJERCITO ARGENTINO	02/08/2009 17:00	Rio	No	ligeramente turbio	7,88	18	4500	2400	No	No
PUENTE EJERCITO ARGENTINO	18/11/2009 16:30	Rio	Si	turbio	4,94	29	35600	100	No	No
PUENTE EJERCITO ARGENTINO	15/03/2010 17:10	Rio	Si	turbio	8,72	28,5	10000	1000	No	No
PUENTE EJERCITO ARGENTINO	08/11/2010 16:15	Rio	No	ligeramente turbio	6,01	29	193000	1430	No	No
PUENTE EJERCITO ARGENTINO	11/04/2011 17:30	Rio	No	turbio	4,84	26	132000	1420	No	No
PUENTE EJERCITO ARGENTINO	17/10/2011 17:50	Rio	No	turbio	7,47	25,4	1340000	340000	No	No
PUENTE EJERCITO ARGENTINO	25/06/2012 17:10	Rio	Si	ligeramente turbio	7,52	20,1	142300	1320	No	No
PUENTE EJERCITO ARGENTINO	30/07/2012 18:45	Rio	No	ligeramente turbio	8,1	17,7	152100	1200	No	No
PUENTE EJERCITO ARGENTINO	12/11/2012 16:00	Rio	No	ligeramente turbio	8,1	26	64000	2100	No	No
PUENTE EJERCITO ARGENTINO	18/03/2013 17:15	Rio	No	turbio	7,81	24,3	18900	980	No	No
PUENTE EJERCITO ARGENTINO	09/04/2013 13:30	Rio	No	turbio	7,71	26,8	191600	1420	No	No
PUENTE EJERCITO ARGENTINO	25/06/2013 15:20	Rio	No	turbio	7,73	16,7	44000	3400	No	No
PUENTE EJERCITO ARGENTINO	04/11/2013 15:30	Rio	No	turbio	6,86	25,3	21200	1000	No	No
LAGUNA COLUSSI	05/03/2009 16:30	Laguna	Si	ligeramente turbio	7,9	32,6	18400	2300	No	No
LAGUNA COLUSSI	11/05/2009 16:15	Laguna	Si	ligeramente turbio	7,78	27	1920	80	No	No
LAGUNA COLUSSI	23/09/2010 16:30	Laguna	No	ligeramente turbio	8,1	23,5	148000	13900	No	No
LAGUNA COLUSSI	17/10/2011 17:30	Laguna	No	ligeramente turbio	7,6	24,5	91600	3700	No	No
LAGUNA COLUSSI	17/10/2011 17:30	Laguna	No	ligeramente turbio	9,6	25,6	26800	7000	No	No
LAGUNA COLUSSI	31/10/2011 17:30	Laguna	No	ligeramente turbio	9,28	26	16000	360	No	No
LAGUNA COLUSSI	08/10/2013 15:00	Laguna	No	límpido	8,12	26,3	1000	100	No	No
LAGUNA COLUSSI	22/10/2013 13:30	Laguna	Si	ligeramente turbio	8,91	28,6	6900	1500	No	No

Lugar de muestreo	Fecha y hora	Tipo de lugar	Lluvias previas	Aspecto	pH	Tº	Rto Coliformes totales	Rto *E. coli*	Desarrollo en CCDA	PCR
LAGUNA LOS LIRIOS	21/05/2013 15:30	Laguna	No	turbio	7,66	18,6	33600	1500	No	No
LAGUNA LOS LIRIOS	04/06/2013 13:00	Laguna	No	ligeramente turbio	7,79	23,3	40000	2200	No	No
LAGUNA LOS LIRIOS	15/10/2013 13:00	Laguna	No	ligeramente turbio	7,81	27,1	17900	600	No	No
LAGUNA LOS LIRIOS	12/11/2013 13:30	Laguna	Si	límpido	7,45	29,6	15600	100	No	No
LAGUNA LOS LIRIOS	11/03/2014 13:30	Laguna	Si	ligeramente turbio	6,94	29	3600	900	No	No
LAGUNA LOS LIRIOS	08/04/2014 13:00	Laguna	No	ligeramente turbio	7,99	31,2	3000	72	No	No
LAGUNA FRANCIA	01/09/2009 16:30	Laguna	No	ligeramente turbio	6,7	27,8	1000	100	No	No
LAGUNA FRANCIA	01/09/2009 16:30	Laguna	No	ligeramente turbio	6,7	27,8	100000	1000	No	No
LAGUNA FRANCIA	12/10/2009 17:00	Laguna	No	ligeramente turbio	7,5	22	100000	1000	No	No
LAGUNA NAVARRO	02/07/2013 11:30	Laguna	No	turbio	7,22	17,9	195000	100	No	No
PUENTE SAN FERNANDO	28/05/2013 15:00	Rio	No	turbio	7,87	24,2	36000	3500	No	No
CLUB DE REGATAS- RESISTENCIA	30/07/2012 18:45	Rio	No	ligeramente turbio	7,98	18,7	121100	1000	No	No
RIO BERMEJITO- CHACO	23/08/2010 10:00	Rio	No	límpido	7,73	20	17500	100	No	No
RIO BERMEJITO- CHACO	23/08/2010 10:00	Rio	No	límpido	7,71	20	8500	160	No	No
RIO BERMEJITO (PLAYA MUNICIPAL A 3 KM)	23/09/2010 10:00	Rio	No	límpido	7,6	20	17900	200	No	No
CLUB DE REGATAS- CORRIENTES	17/05/2010 8:00	Rio	Si	límpido	6,2	22	14000	100	No	No
CLUB DE REGATAS- CORRIENTES	06/04/2012 8:30	Rio	No	ligeramente turbio	8,74	24	20800	800	No	No
CLUB DE REGATAS- CORRIENTES	01/07/2013 7:45	Rio	No	ligeramente turbio	8,27	18,8	2800	170	No	No
PLAYA BALNEARIO ARAZATY- CORRIENTES	03/02/2009 15:15	Rio	No	límpido	7,59	29	1600	570	No	No
PLAYA BALNEARIO ARAZATY- CORRIENTES	29/09/2010 8:15	Rio	No	límpido	6	20	27900	1230	No	No
PLAYA BALNEARIO ARAZATY- CORRIENTES	16/04/2013 11:30	Rio	No	ligeramente turbio	8,01	26,5	35600	860	No	No
PUNTA SAN SEBASTIAN- CORRIENTES	23/06/2013 8:30	Rio	Si	ligeramente turbio	7,98	18,9	25200	500	No	No
PLAYA MOLINA PUNTA- CORRIENTES	16/12/2010 11:20	Rio	No	límpido	5,07	24	46400	2200	No	No

Rto. Coliformes totales y *E. coli* en 100 UFC/ml

BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality. 4 th. WHO. Geneva , Switzerland; 2011. 564 p.
2. Cabral J. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. Int J Environ Res Public Health. 2010;7(10):3657–703.
3. Instituto Nacional de Estadísticas y Censo. Censo Nacional de Población. Hogares y Viviendas. Censo INDEC 2010. COBERTURA Hogares con servicio de Agua Potable y Desagües Cloacales por red pública. 2010.
4. López Sardi E, García B, Reynoso Y, Gonzalez P, Larroudé V. Calidad del agua para usos recreativos desde las perspectivas de la seguridad e higiene laboral y la salud pública . Estudio de caso . [Internet]. Available from: http://www.palermo.edu/ingenieria/investigaciondesarrollo/pdf/Trabajo_Completo_Lopez_Sardi_Estela_Monicav3.pdf
5. Health Protection Agency. Detection of Campylobacter in water. National Standard Method W8 Issue 4 [Internet]. 2007. Available from: http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp.
6. Anton D, Delgado CD. Sequia en un mundo de agua. Anton D, Diaz Delgado C, editors. San Jose , Montevideo URUGUAY / Toluca, MEXICO: Piriguazu Ediciones/ CIRA-UAEM; 2000. 420 p.
7. Abulreesh H, Paget T, Goulder R. Campylobacter in waterfowl and aquatic environments: incidence and methods of detection. Environ Sci Technol. 2006;40(23):7122–31.
8. Straub TM, Chandler DP. Towards a unified system for detecting waterborne pathogens. J Microbiol Methods. 2003;53(2):185–97.
9. Fernandez H, Otth L, Wilson M. Isolation of thermotolerant species of Campylobacter from river water using two collection methods. Arch Med Vet XXXV. 2003;1:95–8.
10. Giugno S, Oderiz S. Etiología bacteriana de la diarrea aguda en pacientes pediátricos. Acta Bioquímica Clínica Latinoam. 2010;44(1):63–70.
11. Botero de Ledesma L. Calidad de aguas. In: XXIX Jornadas Venezolanas de Microbiologia "Dr Vidal Rodríguez Lemoine." Cumaná, Estado de Sucre (Venezuela); 2005. p. 1–3.
12. Bolton F, Coates D, Hutchinson D, Godfree A. A study of thermophilic campylobacters in a river system. J Appl Bacteriol. 1987;62(2):167–76.
13. Diergaardt S, Venter S, Spreeth A, Theron J, Brözel V. The occurrence of campylobacters in water sources in South Africa. Water Res. 2004;38(10):2589–95.
14. Richardson G, Thomas D, Smith R, Nehaul L, Ribeiro C, Brown A, et al. A community

outbreak of Campylobacter jejuni infection from a chlorinated public water supply. Epidemiol Infect. 2007;135:1151–8.

15. World Health Organization. Guidelines for safe recreational water environments. VOLUME 1 COASTAL AND FRESH WATERS. Vol. 1, WHO. Geneva , Switzerland; 2003. 253 p.
16. Bianucci S, Depettris C, Clemente M, Ruberto A. Riesgo Sanitario Asociado al Uso Recreativo de Lagunas en Áreas Urbanas. In: Comunicaciones Cientificas y Tecnologicas 2005 UNNE. Resistencia, Chaco, Argentina; 2005.
17. Bianucci S, Clemente M, Depettris C. Degradación ambiental de las lagunas ubicadas en áreas urbanas. In: Comunicaciones Científicas y Tecnologicas 2004- UNNE. Resistencia, Chaco, Argentina; 2004.
18. Díaz Delgado C, Esteller Alberich M, Lopez-Vera F. Recursos Hídricos. Conceptos básicos y estudio de caso en iberoamerica. Díaz Delgado C, Esteller Alberich M, Lopez-Vera F, editors. Montevideo, URUGUAY / Toluca, MEXICO: Piriguazú Ediciones/ CIRA-UAEM; 2005. 747 p.
19. Folabella A, Escalante A, Deza A, Pérez Guzzi J, Zamora A. Indicadores bacterianos de calidad de agua recreacional en la laguna de los padres (Buenos Aires, Argentina). In: 1º Congreso Internacional sobre Gestión y Tratamiento Integral del Agua. Córdoba - Argentina; 2006. p. 1–8.
20. Nadal F, Ruiz M, Rodríguez MI, Halac S, Olivera P. Evaluación de la calidad de agua para uso recreativo del embalse San Roque, Córdoba, Argentina. In: I Encuentro de Investigadores en Formación en Recursos Hídricos Instituto Nacional del Agua (INA). Ezeiza, Buenos Aires; 2012.
21. Apella M, Araujo P. Microbiología del agua. Conceptos básicos. In: Blesa, M.A., Blanco G., editor. Tecnologías Solares para la Desinfección y Descontaminación del Agua. Buenos Aires, Argentina: Solar Safe Water; 2005. p. 33–50.
22. Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación. República Argentina. Metodologia para el establecimiento de niveles guia de calidad de agua ambiente para recreacion humana. In: Niveles Guia Nacionales de Calidad de Agua Ambiente [Internet]. 2003. p. 1–6. Available from: http://www.pnuma.org/aguamiaac/CODIA CALIDAD DE LAS AGUAS/MATERIAL ADICIONAL/PONENCIA%0AS/PONENTES/Tema 5 Niveles Guias Calidad de Aguas/NIVELES GUI%0AA/2 - Metodologias/5 - Metodologia Recreacion.pdf
23. APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works, Association), WPCF (Water Pollution Control Federation). Metodos Normalizados Analisis Aguas potables y residuales. Diaz de Sa. Madrid, España; 2005.

24. Salusso A, Mónica M, Beatriz L. Calidad del Agua de Uso Agropecuario en los Valles Intermontanos de Lerma , Metán y Calchaquíes (Salta). In: CONGRESO REGIONAL de Ciencia y Tecnología NOA 2002 Secretaría de Ciencia y Tecnología Universidad Nacional de Catamarca. 2002. p. 1–28.
25. Emiliani F, González de Paira SM. [Bacteriological quality of Bendetti Lake (Santo Tomé, Santa Fe Province, Argentina) and associated environmental variables]. Rev Argentina Microbiol. 1998;30(1):30–8.
26. Van Elsas J, Semenov A V, Costa R, Trevors J. Survival of Escherichia coli in the environment: Fundamental and public health aspects. ISME J. 2011;5(2):173–83.
27. Ishii S, Sadowsky M. Escherichia coli in the Environment: Implications for Water Quality and Human Health. Microbes Environ. 2008;23(2):101–8.
28. Saxena G, Bharagava R, Kaithwas G, Raj A. Microbial indicators, pathogens and methods for their monitoring in water environment. J Water Health. 2015;13(2):319–39.
29. Mendes Silva D, Domingues L. On the track for an efficient detection of Escherichia coli in water: A review on PCR-based methods. Ecotoxicol Environ Saf. 2015;113:400–11.
30. Pérez Boto D. Campylobacter jejuni y Campylobacter coli aisladas en etapas iniciales de la producción de pollo de engorde en España. Relaciones con cepas de origen clínico. TESIS DOCTORAL. Universidad Complutense de Madrid; 2014.
31. Donnison Andrea. Isolation of Thermotolerant Campylobacter – Review & Methods for New Zealand Laboratories [Internet]. Wellington, New Zealand; 2003. Available from: http://www.moh.govt.nz/notebook/nbbooks.nsf/0/73166EB251837F95CC257834000271DB/$file/IsolationOfThermotolerantCampylobacter.pdf
32. Chanqueo C. L, García C. P, Leon C. E, BluF. A. Evaluación de la tinción de Hucker para la búsqueda rutinaria de Campylobacter sp en el estudio de un síndrome diarreico agudo. Rev Chil Infect. 2005;22(3):242–6.
33. Kovács JK. Investigation of virulence-associated factors in the pathogenesis of Campylobacter jejuni , and the anti- Campylobacter mode of action of clove essential oil.TESIS DOCTORAL. University of Pécs, Hungary; 2014.
34. Cook K, Bolster C. Survival of Campylobacter jejuni and Escherichia coli in groundwater during prolonged starvation at low temperatures. J Appl Microbiol. 2007;103(3):573–83.
35. Thomas C, Hill D, Mabey M. Morphological changes of synchronized Campylobacter jejuni populations during growth in single phase liquid culture. Lett Appl Microbiol. 1999;28:194–8.
36. Cox N, Richardson L, Musgrove M. Campylobacter jejuni and Other Campylobacters. In:

Juneja VK, Sofos JN, editors. Pathogens and toxins in Foods: Challenges and Interventions. Washington, DC: ASM Press; 2010. p. 20–30.

37. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schrenckenberger P, et al. Koneman: Diagnóstico microbiológico. Texto y Atlas en color. 6ta ed. Editorial Medica Panamericana S.A., editor. Buenos Aires, Argentina; 2008. 1691 p.
38. Debruyne L, Gevers D, Vandamme P. Taxonomy of the Family Campylobacteraceae. In: Nachamkin I, Szymanski C BM, editor. Campylobacter. Third ed. Washington, DC.: ASM Press; 2008. p. 3–25.
39. Debruyne L, Broman T, Bergström S, Olsen B, On SLW, Vandamme P. Campylobacter volucris sp. nov., isolated from black-headed gulls (Larus ridibundus). Int J Syst Evol Microbiol. 2010;60(8):1870–5.
40. Butzler JP. Campylobacter, from obscurity to celebrity. Clin Microbiol Infect. 2004;10(10):868–76.
41. Coker A, Isokpehi R, Thomas B, Amisu K, Obi C. Human campylobacteriosis in developing countries. Emerg Infect Dis. 2002;8(3):237–44.
42. Hazeleger W, Wouters J, Rombouts F, Abee T. Physiological activity of Campylobacter jejuni far below the minimal growth temperature. Appl Environ Microbiol. 1998;64(10):3917–22.
43. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaüer MA. Microbiología Médica. 5ª edición. GEA CONSULTORÍA EDITORIAL, editor. España: Elsevier; 2017. 836 p.
44. Tatchou-Nyamsi-König J, Moreau A, Fédérighi M, Block J. Behaviour of Campylobacter jejuni in experimentally contaminated bottled natural mineral water. J Appl Microbiol. 2007;103(2):280–8.
45. Hoffman PS, George HA, Krieg NR, Smibert RM. Studies of the microaerophilic nature of Campylobacter fetus subsp. jejuni. II. Role of exogenous superoxide anions and hydrogen peroxide. Can J Microbiol. 1979;25(1):8–16.
46. Health Protection Agency. Identification of Campylobacter species. National Standard Method BSOP ID 23 Issue 2. [Internet]. 2007. Available from: http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp.
47. Fernández H. CAMPYLOBACTER: UN PATÓGENO TRANSMITIDO POR ALIMENTOS. In: Tercer encuentro del Programa Reducción de Patógenos. Chile; 2011.
48. Skelly C, Weinstein P. Pathogen survival trajectories: an eco-environmental approach to the modeling of human campylobacteriosis ecology. Environ Health Perspect. 2003;111(1):19–28.

49. Strachan NJC, Forbes KJ. The growing UK epidemic of human campylobacteriosis. Lancet (London, England). 2010;376(9742):665–7.
50. Nakari Ulla-Maija. Identification and Epidemiological Typing of Campylobacter Strains Isolated from Patients in Finland-Research 61. National Institute for Health and Welfare. Helsinki, Finland; 2011. p. 80.
51. Kuusi M, Nuorti J, Hänninen M, Koskela M, Jussila V, Kela E, et al. A large outbreak of campylobacteriosis associated with a municipal water supply in Finland. Epidemiol Infect. 2005;133:593–601.
52. Rosef O, Rettedal G, Lågeide L. Thermophilic campylobacters in surface water: a potential risk of campylobacteriosis. Int J Environ Health Res. 2001;11(4):321–7.
53. Havelaar AH, Ivarsson S, Löfdahl M, Nauta MJ. Estimating the true incidence of campylobacteriosis and salmonellosis in the European Union, 2009. Epidemiol Infect. 2013;141(2):293–302.
54. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on Campylobacter in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. EFSA J [Internet]. 2011;9(4):141 pp. Available from: online: www.efsa.europa.eu/efsajournal
55. Maria Rosa Viñas. Campylobacter spp. diagnóstico y caracterización. Especialización en Bacteriología Clínica UNNE. Resistencia, Chaco, Argentina; 2015.
56. García Saito V, Gariboglio Vázquez M, Zaloff Dakoff A, Álvarez Estigarribia M, Sucin M, Moreira G, et al. Prevalencia de bacterias enteropatógenas en niños que asisten a un. Rev Fac Med UNNE. 2017;37(1):15–20.
57. Pitkänen T. Review of Campylobacter spp. in drinking and environmental waters. J Microbiol Methods. 2013;95(1):39–47.
58. Lévesque S, Fournier E, Carrier N, Frost E, Arbeit RD, Michaud S. Campylobacteriosis in urban versus rural areas: a case-case study integrated with molecular typing to validate risk factors and to attribute sources of infection. PLoS One. 2013;8(12):e83731.
59. Chaban B, Ngeleka M, Hill J. Detection and quantification of 14 Campylobacter species in pet dogs reveals an increase in species richness in feces of diarrheic animals. BMC Microbiol. 2010;10(73):1–7.
60. Whiley H, Van den Akker B, Giglio S, Bentham R. The role of environmental reservoirs in human campylobacteriosis. Int J Environ Res Public Health. 2013;10(11):5886–907.
61. Mughini Gras L, Smid JH, Wagenaar JA, Koene MGJ, Havelaar AH, Friesema IHM, et al. Increased risk for Campylobacter jejuni and C. coli infection of pet origin in dog owners and

evidence for genetic association between strains causing infection in humans and their pets. Epidemiol Infect. 2013;141(12):2526–35.

62. Blaser M, Cody H. Methods for isolating Campylobacter jejuni from low-turbidity water. Appl Environ Microbiol. 1986;51(2):312–5.
63. Tresierra-Ayala A, Bendayan Acosta M, Bernuy Rodriguez A, Pereyra Panduro G, Espinoza Campos F. Campylobacters termotolerantes en aves de corral de la ciudad de Iquitos. Folia Amaz. 1995;7(1–2):187–94.
64. Acha P, Szyfres B. Campylobacteriosis. In: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales Volumen I Bacteriosis y Micosis. 3rd ed. Washington, DC: Organizacion Panamericana de Salud; 2001. p. 56–67.
65. Horman A, Rimhanen-finne R, Maunula L, Von Bonsdorff C, Torvela N, Heikinheimo A, et al. Campylobacter spp ., Giardia spp ., Cryptosporidium spp ., Noroviruses , and Indicator Organisms in Surface Water in Southwestern Finland, 2000-2001. Appl Environ Microbiol. 2004;70(1):87–95.
66. Tamborini A, Casanova L, Viñas M, Asato V, Hoffer A, Lucero M, et al. Campylobacter spp .: prevalencia y caracterización feno-genotípica de aislamientos de pacientes con diarrea y de sus mascotas en la provincia de La Pampa , Argentina. Rev Argent Microbiol. 2012;44(4):266–71.
67. Hofreuter D. Defining the metabolic requirements for the growth and colonization capacity of Campylobacter jejuni. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2014;4:1–19.
68. Stanley K, Cunningham R, Jones K. Isolation of Campylobacter jejuni from groundwater. J Appl Microbiol. 1998;85:187–8.
69. Pickert A, Botzenhart K. Survival of Campylobacter jejuni in drinking water, river water and sewage. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B. 1985;182(1):49–57.
70. Fernández H. Campylobacter and campylobacteriosis: a view from South America. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2011;28(1):121–7.
71. Martikainen PJ, Korhonen LK, Kosunen TU. Occurrence of thermophilic campylobacters in rural and urban surface waters in Central Finland. Water Res. 1990;24(1):91–6.
72. PitkänenTarja. Studies on the Detection Methods of Campylobacter and Faecal Indicator Bacteria in Drinking Water Studies on the Detection Methods of Campylobacter and Faecal Indicator Bacteria in Drinking Water- Research 39. National Institute for Health and Welfare- Kuopio, Finland; 2010. p. 116.
73. Allos BM. Campylobacter jejuni Infections: Update on Emerging Issues and Trends. Clin Infect Dis. 2001;32(8):1201–6.

74. Nachamkin I, Allos B, Ho T. Campylobacter Species and Guillain-Barre ´ Syndrome. Clin Microbiol Rev. 1998;11(3):555–67.
75. Zumbado-Gutierrez L, Arévalo- Madrigal A, Donado Godoy M, Romero-Zúniga J. Diagnóstico molecular de Campylobacter en la cadena avícola destinada para consumo humano en Costa Rica. Agron Mesoam. 2014;25(2):357–63.
76. Moore J, Corcoran D, Dooley J, Fanning S, Lucey B, Matsuda M, et al. Campylobacter. Vet Res. 2005;36:351–82.
77. Ostia Garza P, Fuentes Cuevas M. Síndrome de Guillain-Barré variedad Miller-Fisher. Reporte de un caso. Arch Inv Mat Inf. 2011;3(1):30–353.
78. Pope J, Krizova A, Garg A, Thiessen-Philbrook H, Ouimet J. Campylobacter reactive arthritis: a systematic review. Semin Arthritis Rheum. 2007;37(1):48–55.
79. Altekruse S, Stern N, Fields P, Swerdlow D. Campylobacter jejuni--an emerging foodborne pathogen. Emerg Infect Dis. 1999;5(1):28–35.
80. Snelling W, Mckenna J, Lecky D, Dooley JSG. Survival of Campylobacter jejuni in Waterborne Protozoa. Appl Environ Microbiol. 2005;71(9):5560–71.
81. Obiri-Danso K, Jones K. Distribution and seasonality of microbial indicators and thermophilic campylobacters in two freshwater bathing sites on the River Lune in northwest England. J Appl Microbiol. 1999;87:822–32.
82. Abulreesh H, Paget T, Goulder R. Recovery of thermophilic campylobacters from pond water and sediment and the problem of interference by background bacteria in enrichment culture. Water Res. 2005;39(13):2877–82.
83. Hänninen M-L, Haajanen H, Pummi T, Wermundsen K, Katila M-L, Sarkkinen H, et al. Detection and Typing of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli and Analysis of Indicator Organisms in Three Waterborne Outbreaks in Finland. Appl Environ Microbiol. 2003;69(3):1391–6.
84. Hu T-L, Kuo P-C. Isolation of Campylobacter sp in surface waters of Taiwan. J Microbiol Immunol Infect. 2011;44(1):15–20.
85. Savill M, Hudson J, Ball A, Klena J, Scholes P, Whyte R, et al. Enumeration of Campylobacter in New Zealand recreational and drinking waters. J Appl Microbiol. 2001;91:38–46.
86. Jones K. Campylobacters in water, sewage and the environment. J Appl Microbiol. 2001;90:68–79.
87. Carter A, Pacha R, Clark G, Williams E. Seasonal occurrence of Campylobacter spp. in surface waters and Their Correlation with Standard Indicator Bacteria. Appl Environ

Microbiol. 1987;53(3):523–6.

88. Thomas C, Gibson H, Hill D, Mabey M. Campylobacter epidemiology : an aquatic perspective. J Appl Microbiol Symp Suppl. 1999;85:168–77.

89. Clark CG, Price L, Ahmed R, Woodward DL, Melito PL, Rodgers FG, et al. Characterization of Waterborne Outbreak – associated Walkerton , Ontario. Emerg Infect Dis. 2003;9(10):1232–41.

90. Schönberg-Norio D, Takkinen J, Hänninen ML, Katila ML, Kaukoranta S, Mattila L, et al. Swimming and Campylobacter infections. Emerg Infect Dis. 2004;10(8):1474–7.

91. Farías A, Utgés E, Tenev M, Roshdestwensky S, Pereyra F, Herrendorf F. Contaminación microbiológica de la laguna Los Lirios, Resistencia, Chaco. In: Puliafito A y P, editor. CONTAMINACION ATMOSFERICA E HIDRICA EN ARGENTINA, TOMO II Contribuciones del IV Congreso PROIMCA Y II Congreso PRODECA. 1er ed. Buenos Aires, Argentina: Universidad Tecnológica Nacional; 2013. p. 122–30.

92. Vereen E, Lowrance R, Cole D, Lipp E. Distribution and ecology of campylobacters in coastal plain streams (Georgia, United States of America). Appl Environ Microbiol. 2007;73(5):1395–403.

93. Cools I, Uyttendaele M, Caro C, Haese E, Nelis H, Debevere J. Survival of Campylobacter jejuni strains of different origin in drinking water. J Appl Microbiol. 2003;94:886–92.

94. Rollins DM, Colwell RR. Viable but nonculturable stage of Campylobacter jejuni and its role in survival in the natural aquatic environment. Appl Environ Microbiol. 1986;52(3):531–8.

95. Thomas C, Hill D, Mabey M. Evaluation of the effect of temperature and nutrients on the survival of Campylobacter spp. in water microcosms. J Appl Microbiol. 1999;86(6):1024–32.

96. Buswell C, Herlihy Y, Lawrence L, McGuiggan T, Marsh P, Keevil C, et al. Extended Survival and Persistence of Campylobacter spp in Water and Aquatic Biofilms and Their Detection by Immunofluorescent-Antibody and rRNA Staining. Appl Environ Microbiol. 1998;64(2):733–41.

97. Obiri-Danso, K; Paul N, Jones K. The effects of UVB and temperature on the survival of natural populations and pure cultures of Campylobacter jejuni , Camp . coli , Camp . lari and urease-positive thermophilic campylobacters (UPTC) in surface waters. J Appl Microbiol. 2001;90:256–67.

98. Thomas C, Hill D, Mabey M. Culturability, injury and morphological dynamics of thermophilic Campylobacter spp. within a laboratory-based aquatic model system. J Appl

Microbiol. 2002;92:433–42.

99. Diaz Ganaim C, Vizcaya Delgado L, Velasco Carrillo J. Evaluación de un medio de cultivo y la técnica de filtración para el aislamiento de Campylobacter sp . en un grupo de riesgo. Rev LA Fac Farm. 2003;45(1):13–8.
100. Bronowski C, James CE, Winstanley C. Role of environmental survival in transmission of Campylobacter jejuni. FEMS Microbiol Lett. 2014;356(1):8–19.
101. Korhonen LK, Martikainen PJ. Comparison of the survival of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in culturable form in surface water. Can J Microbiol. 1991;37(7):530–3.
102. St-Pierre K, Lévesque S, Frost E, Carrier N, Arbeit R, Michaud S. Thermotolerant coliforms are not a good surrogate for Campylobacter spp. in environmental water. Appl Environ Microbiol. 2009;75(21):6736–44.
103. Reuter M, Mallett A, Pearson BM, Vliet AHM Van. Biofilm Formation by Campylobacter jejuni Is Increased under Aerobic Conditions. Appl Environ Microbiol. 2010;76(7):2122–8.
104. McKay A. Viable but non-culturable forms of potentially pathogenic bacteria in water. Lett Appl Microbiol 1992,. 1992;14:129–35.
105. Kassem II, Chandrashekhar K, Rajashekara G. Of energy and survival incognito: A relationship between viable but non-culturable cells formation and inorganic polyphosphate and formate metabolism in Campylobacter jejuni. Front Microbiol. 2013;4(JUL):1–8.
106. Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. FEMS Microbiol Rev. 2010;34(4):415–25.
107. Van Dyke MI, Morton VK, McLellan NL, Huck PM. The occurrence of Campylobacter in river water and waterfowl within a watershed in southern Ontario, Canada. J Appl Microbiol. 2010;109(3):1053–66.
108. Patrone V, Campana R, Vallorani L, Dominici S, Federici S, Casadei L, et al. CadF expression in Campylobacter jejuni strains incubated under low-temperature water microcosm conditions which induce the viable but non-culturable (VBNC) state. Antonie Van Leeuwenhoek. 2013;103(5):979–88.
109. Baffone W, Casaroli A, Citterio B, Pierfelici L, Campana R, Vittoria E, et al. Campylobacter jejuni loss of culturability in aqueous microcosms and ability to resuscitate in a mouse model. Int J Food Microbiol. 2006;107(1):83–91.
110. Young K, Davis L, Dirita V. Campylobacter jejuni: molecular biology and pathogenesis. Nat Rev Microbiol. 2007;5(9):665–79.
111. Bui X, Winding A, Qvortrup K, Wolff A, Bang D, Creuzenet C. Survival of Campylobacter jejuni in co-culture with Acanthamoeba castellanii: Role of amoeba-mediated depletion of

dissolved oxygen. Environ Microbiol. 2012;14(8):2034–47.

112. King C, Shotts E, Wooley R, Porter K. Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. Appl Environ Microbiol. 1988 Dec;54(12):3023–33.

113. Jones D, Sutcliffe E, Curry A. Recovery of viable but non-culturable Campylobacter jejuni. J Gen Microbiol. 1991;137(10):2477–82.

114. Horne A, Goldman C. Understanding Lake Ecology.LAKE ECOLOGY OVERVIEW. In: Limnology. 2nd ed. New York, USA: McGraw-Hill; 1994. p. 57.

115. Hurtado Diaz L, Rojas Mendoza R. Incidencia de Campylobacter sp . en pacientes ambulatorios menores de cinco años con diarrea aguda en dos hospitales de Lima : octubre 2005- enero 2006. TESIS. Universidad Nacional Mayor de San Marcos- Facultad de Farmacia y Bioquimica- E.A.P. de Farmacia y Bioquimica. Lima – Perú; 2008.

116. Jokinen C, Schreier H, Mauro W, Taboada E, Isaac-Renton J, Topp E, et al. The occurrence and sources of Campylobacter spp., Salmonella enterica and Escherichia coli O157:H7 in the Salmon River, British Columbia, Canada. J Water Health. 2010;8(2):374–86.

117. Sails A, Bolton F, Fox AJ, Wareing DRA, Greenway DLA. Detection of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in Environmental Waters by PCR Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Appl Environ Microbiol. 2002;68(3):1319–24.

118. Bianucci Paola. Interferencias de la red de desagües cloacales sobre el sistema de drenaje pluvial . In: Comunicaciones Cientificas y Tecnologicas 2003- UNNE. Resistencia - Chaco - Argentina; 2003.

119. Rosef O, Kapperud G, Skjerve E. Comparison of media and filtration procedures for qualitative recovery of thermotolerant Campylobacter spp. from naturally contaminated surface water. Int J Food Microbiol. 1987;5(1):29–39.

120. Corry J, Post D, Colin P, Laisney M. Culture media for the isolation of campylobacters. Int J Food Microbiol. 1995;26:43–76.

121. Bolton F, Hutchinson D, Coates D. Blood-free selective medium for isolation of Campylobacter jejuni from feces. J Clin Micrbiology. 1984 Feb;19(2):169–71.

122. Williams A, Oyarzabal O. Prevalence of Campylobacter spp. in skinless, boneless retail broiler meat from 2005 through 2011 in Alabama, USA. BMC Microbiol. 2012;12(1):184.

123. Baylis C, MacPhee S, Martin K, Humphrey T, Betts R. Comparison of three enrichment media for the isolation of Campylobacter spp . from foods. J Appl Microbiol. 2000;89:884–91.

124. Garenaux A, Jugiau F, Rama F, de Jonge R, Denis M, Federighi M, et al. Survival of Campylobacter jejuni strains from different origins under oxidative stress conditions: Effect

of temperature. Curr Microbiol. 2008;56(4):293–7.

125. Gharst G, Oyarzabal O a., Hussain SK. Review of current methodologies to isolate and identify Campylobacter spp. from foods. J Microbiol Methods. 2013;95(1):84–92.
126. Silva J, Leite D, Fernandes M, Mena C, Gibbs PA, Teixeira P. Campylobacter spp . as a foodborne pathogen : a review. Frontiers in microbiology. 2011;2(September):1–12.
127. Albert M, Tee W, Leach A, Asche V, Penner JL. Comparison of a blood-free medium and a filtration technique for the isolation of Campylobacter spp. from diarrhoeal stools of hospitalised patients in central Australia. J Med Microbiol. 1992;37(3):176–9.
128. Oyofo B, Thornton S, Burr D, Trust T, Pavlovskis O, Guerryl P. Specific Detection of Campylobacterjejuni and Campylobacter coli by Using Polymerase Chain Reaction. J Clin Microbiol. 1992;30(10):2613–9.
129. Kirk R, Rowe M. A PCR assay for the detection of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in water. Lett Appl Microbiol. 1994;19:301–3.
130. Koenraad P, Ayling R, Hazeleger W, Rombouts F, Newell D. The speciation and subtyping of campylobacter isolates from sewage plants and waste water from a connected poultry abattoir using molecular techniques. Epidemiol Infect. 1995;115:485–94.
131. Girones R, Ferrús M, Alonso J, Rodriguez-Manzano J, Calgua B, de Abreu Corrêa A, et al. Molecular detection of pathogens in water - The pros and cons of molecular techniques. Water Res. 2010;44(15):4325–39.
132. Brauns LA, Hudson MC, Oliver JD. Use of the Polymerase Chain Reaction in Detection of Culturable and Nonculturable Vibrio vulnificus Cells. Appl Environ Microbiol. 1991;57(9):2651–5.
133. On S, Jordan P. Evaluation of 11 PCR Assays for Species-Level Identification of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. J Clin Microbiol. 2003;41(1):330–6.
134. Bui X, Wolff A, Madsen M, Duong Bang D, Rantsiou K, Dodd E, et al. Fate and survival of Campylobacter coli in swine manure at various temperatures. Front Microbiol. 2011;2:1–8.
135. On SLW. Identification methods for campylobacters, helicobacters, and related organisms. Clin Microbiol Rev. 1996;9(3):405–22.
136. Diergaardt S, Venter S, Chalmers M, Theron J, Brözel V. Short communication. Evaluation of the Cape Town Protocol for the isolation of Campylobacter spp . from environmental waters. Water SA. 2003;29(2):225–9.
137. Van Lint P, De Witte E, De Henau H, De Muynck A, Verstraeten L, Van Herendael B, et al. Evaluation of a real-time multiplex PCR for the simultaneous detection of Campylobacter jejuni, Salmonella spp., Shigella spp./EIEC, and Yersinia enterocolitica in fecal samples. Eur

J Clin Microbiol Infect Dis. 2015;34(3):535–42.

138. Josephson KL, Gerba CP, Pepper IL. Polymerase Chain-Reaction Detection of Nonviable Bacterial Pathogens. Appl Environ Microbiol. 1993;59(10):3513–5.

139. Wolffs P, Norling B, Rådström P. Risk assessment of false-positive quantitative real-time PCR results in food, due to detection of DNA originating from dead cells. J Microbiol Methods. 2005;60(3):315–23.

140. Hazeleger W, Arkesteijn C, Toorop-Bouma A, Beumer R. Detection of the coccoid form of Campylobacterjejuni in chicken products with the use of the polymerase chain reaction. Int J Food Microbiol. 1994;24:273–81.

141. Vandamme P, Van Doorn L, al Rashid S, Quint W, van der Plas J, Chan V, et al. Campylobacter hyoilei Alderton et al. 1995 and Campylobacter coli Véron and Chatelain 1973 are subjective synonyms. Int J Syst Bacteriol. 1997;47(4):1055–60.

142. Kolackova I, Karpiskova R. Species level identification of thermotolerant campylobacters. Vet Med. 2005;50(12):543–7.

143. Hoffer A, Farace M. Detección e identificación molecular de especies termotolerantes de Campylobacter. In: Merino L, Giusiano G, editors. Manual de Metodos Molecculares para Estudios Microbiologicos. 1st ed. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología; 2011. p. 215–7.

144. Lauria-Filgueiras A, Hofer E. Diversity of Campylobacter Isolates from Three Activated Sludge Systems. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998;93(3):295–8.

145. Fernandez H. Thermotolerant campylobacter species associated with human diarrhea in Latin America. Ciênc cult (Säo Paulo). 2002;44(1):39–43.

146. Denis M, M Tanguy, Chidaine B, Laisney M-J, Mégraud F, Fravalo P. Description and sources of contamination by Campylobacter spp. of river water destined for human consumption in Brittany, France. Pathol Biol. 2011;59(5):256–63.

147. Ahmed W, Sawant S, Huygens F, Goonetilleke A, Gardner T. Prevalence and occurrence of zoonotic bacterial pathogens in sur1. Ahmed W, Sawant S, Huygens F, Goonetilleke A, Gardner T. Prevalence and occurrence of zoonotic bacterial pathogens in surface waters determined by quantitative PCR. Water Res. 2009;43(19): Water Res. 2009;43(19):4918–28.

148. Vogt RL, Sours HE, Barrett T, Feldman RA, Dickinson RJ, Witherell L. Campylobacter enteritis associated with contaminated water. Ann Intern Med. 1982;96(3):292–6.

149. Administración Provincial el Agua (APA). LAGUNA ARGÜELLO [Internet]. Resistencia - Chaco - Argentina: ECOM Chaco S.A.; 2002. Available from: www.ecomchaco.com.ar/apa/institucional/amgr/Argüello.pdf

150. Mendez Novelo R, San Pedro Cedillo L, Castillo Borges E, Vázquez Borges E. Tiempo de conservación de muestras biologicas en agua. Rev Int Contam Ambient. 2010;26(4):327–35.
151. Health Protection Agency. General technique for the detection and enumeration of bacteria by negative pressure membrane filtration. National National Standard Method W1 Issue 4 [Internet]. 2007. Available from: http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp.
152. World Health Organization. A global Salmonella surveillance and laboratory support project of the World Health Organization. Isolation of thermotolerant Campylobacter from water. Laboratory Protocols. Step 2 Training Course. 2003.
153. Leslie Nicole Speegle. Use of Cellulose Filters to Isolate Naturally Occurring Campylobacter spp. from Contaminated Retail Broiler Meat and Survival of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in Retail Broiler Meat. THESIS. Auburn University; 2009.
154. Farace M, Viñas M. Manual de Procedimientos Para el Aislamiento y Caracterización de Campylobacter spp. [Internet]. Buenos Aires, Argentina; 2007. Available from: bvs.panalimentos.org/local/File/Manual_Campylobacter_31-08-2007.pdf
155. Williams L, Jørgensen F, Grogono-Thomas R, Humphrey T. Enrichment culture for the isolation of Campylobacter spp: Effects of incubation conditions and the inclusion of blood in selective broths. Int J Food Microbiol. 2009;130(2):131–4.
156. Gariboglio Vázquez M, Tracogna M, Lösch L, Merino L. Campylobacter spp, un patógeno humano de origen zoonótico y presencia ambiental. Rev la Fac Med la Univ Nac del Nord. 2015;25(1).
157. Cortes P, Contreras Funes V. Campylobacter jejuni proveniente de materia fecal de pacientes pediátricos. Rev Argent Microbiol. 2008;40:171.
158. World Health Organization. A global Salmonella surveillance and laboratory support project of the World Health Organization. Identification of thermotolerant Campylobacter.Laboratory Protocols Level 2 Training Course [Internet]. 2003. Available from: antimicrobialresistance.dk/...protocols/68_campylobacter1-pdf.pdf
159. World Health Organization. A global Salmonella surveillance and laboratory support project of the World Health Organization.Multiplex PCR for differentiation of C. coli and C. jejuni.Laboratory Protocols Level 4 Training Course [Internet]. 2010. Available from: http://antimicrobialresistance.dk/CustomerData/Files/Folders/6-pdf-protocols/64_camp-pcr-coli-jejuni-100909.pdf
160. Khan I, Hill S, Nowak E, Palmer M, Jarjanazi H, Lee D-Y, et al. Investigation of the prevalence of thermophilic Campylobacter species at Lake Simcoe recreational beaches. Inl Waters. 2013;3:93–104.

161. Ugboma A, Salihu M, Magaji A, Abubakar M, Saulawa M. Prevalence of Campylobacter Species in Sokoto River , Sokoto State , Nigeria. J Vet Adv. 2012;2(1):55–9.
162. Ghane M, Moein F, Massoudian S. The First Isolation of Campylobacter jejuni from Caspian Sea ' s Water. Adv Stud Biol. 2012;4(9):407–18.
163. Rosef O, Paulauskas A, Stolan A, Moen Brathen E. Diversity of thermophilic Campylobacter isolated from the Bø River, Southeast Norway. Vet Medica Zootec. 2009;45(67):47–53.
164. Gariboglio Vázquez M, Lösch S, Merino L. IMPORTANCIA DE LA UTILIZACIÓN DEL DOBLE FILTRADO EN LA DETECCIÓN DE CAMPYLOBACTER EN AGUAS. In: XXI Reunión de Comunicaciones Cientiíficas y Tecnologicas UNNE. Resistencia, Chaco, Argentina; 2015.
165. Mateo E, Cárcamo J, Urquijo M, Perales I, Fernández-Astorga A. Evaluation of a PCR assay for the detection and identification of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in retail poultry products. Res Microbiol. 2005;156(4):568–74.
166. Hernandez J, Alonso JL, Fayos A, Amoros I, Owen robert J. Development of a PCR assay combined with a short enrichment culture for detection of Campylobacter jejuni in estuarine surface waters. FEMS Microbiol Lett. 1995 Apr 1;127(3):201–6.
167. Oyofo B a., Rollins DM. Efficacy of filter types for detecting Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in environmental water samples by polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol. 1993;59(12):4090–5.
168. Blaser M, Hardesty H, Powers B, Wang W. Survival of Campylobacter fetus subsp. jejuni in Biological Milieus. J Clin Microbiol. 1980;11(4):309–13.
169. Trigui H, Thibodeau A, Fravalo P, Letellier A, P. Faucher S. Survival in water of Campylobacter jejuni strains isolated from the slaughterhouse. Springerplus. 2015;4(1):799.
170. Aho M, Kurki M, Rautelin H, Kosunen TU. Waterborne outbreak of Campylobacter enteritis after outdoors infantry drill in Utti, Finland. Epidemiol Infect. 1989;103(1):133–41.
171. Butler R, Lund V, Carlson D. Susceptibility of Campylobacter jejuni and Yersinia enterocolitica to UV radiation. Appl Environ Microbiol. 1987;53(2):375–8.
172. Jones K, Betaieb M, Telford DR. Thermophilic campylobacters in surface waters around Lancaster, UK: Negative correlation with campylobacter infections in the community. J Appl Bacteriol. 1990;69(5):758–64.
173. Obiri Danso K, Jones K, Paul N. The effect of the time of sampling on the compliance of bathing water in NW England with the EU Directive on bathing water quality. J Coast Conserv. 1999;5(1):51–8.

174. Mora L, Martínez I, Figuera L, Segura M, Del Valle G. Protozoarios en aguas superficiales y muestras fecales de individuos de poblaciones rurales del municipio Montes , estado Sucre , Venezuela . Invest Clin. 2010;51(4):457–66.
175. Korhonen LK, Martikalnon PJ. Survival of *Escherichia coli* and *Campylobacter jejuni* in untreated and filtered lake water. J Appl Bacteriol [Internet]. 1991 Oct [cited 2016 Jun 23];71(4):379–82. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.1991.tb03804.x
176. Korhonen L, Martikainen P. Comparison of some enrichment broths and growth media for the isolation of thermophilic campylobacters from surface water samples. J Appl Bacteriol. 1990 Jun;68:593–9.
177. Dorner SM, Anderson WB, Gaulin T, Candon HL, Slawson RM, Payment P, et al. Pathogen and indicator variability in a heavily impacted watershed. J Water Health. 2007;5(2):241–57.
178. Korhonen L, Martikainen P. Survival of Escherichia coli and Campylobacter jejuni in untreated and filtered lake water. J Appl Bacteriol. 1991;71:379–82.
179. Rogers J, Dowsett A, Dennis P, Lee J, Keevil C. Influence of Plumbing Materials on Biofilm Formation and Growth of Legionella pneumophila in Potable Water Systems. Appl Environ Microbiol. 1994;60(6):1842–51.
180. Carvalho FRS, Foronda AS, Pellizari VH. Detection of Legionella pneumophila in water and biofilm samples by culture and molecular methods from man-made systems in S??o Paulo - Brazil. Brazilian J Microbiol. 2007;38(4):743–51.
181. Ahmed M, Schulz J, Hartung J. Survival of Campylobacter jejuni in naturally and artificially contaminated laying hen feces. Poult Sci. 2013;92:364–9.
182. Bianucci S, Clothos S. Influencia de la contaminacion de lagunas en Salud Pública. In: CUARTO BOLETÍN III CONGRESO DE INGENIERÍA CIVIL, TERRITORIO Y MEDIO AMBIENTE “Agua, Biodiversidad e Ingeniería.” Zaragoza, España: COLEGIO DE INGENIEROS DE CAMINOS, CANALES Y PUERTOS; 2006.
183. Hervot, Prieto, Farías, Roshdestwensky, Utgés, Tenev Vázquez FA. Comparación de los Indices de Calidad de Agua de las Lagunas Argüello y Los Lirios – Resistencia – Chaco [Internet]. Editorial de la Universidad Tecnológica Nacional – edUTecNe; 2011 p. 1–10. Available from: http://www.edutecne.utn.edu.ar/investigacion_fr_res/Farias_Ambiente.pdf
184. Moreno Franco D, Quintero Manzano J, Lopez Cuevas A. Metodos para identificar , diagnosticar y evaluar el grado de eutrofia. ContactoS 78. 2010;25–33.
185. Farace M, Viñas M. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA EL AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE Campylobacter spp. Buenos Aires, Argentina; 2008.

186. Denis M, Refrégier- Petton J, Laisney M, Ermel G, Salvat G. Campylobacter contamination in French chicken production from farm to consumers . Use of a PCR assay for detection and identification of Campylobacter jejuni and Camp . coli. J Appl Microbiol. 2001;91:255–67.

187. Merino L. Principios y aplicaciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). In: Manual de Biología Molecular. 1st ed. 2011. p. 14–9.

PRESENTACIONES A CONGRESO Y PUBLICACIONES EN REVISTAS

Presencia de bacterias enteropatógenas en fuentes de aguas de las provincias de Chaco y Corrientes. Tracogna, MF; Gariboglio Vázquez, ML; Lösch, LS, Alonso, JM; Merino, LA. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2009. Resistencia, Chaco

Optimización de una técnica molecular para la detección de *Campylobacter* spp. en aguas recreacionales. Gariboglio Vázquez, ML; Tracogna, MF; Lösch, LS, Medina, ML; Merino, LA. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2010. Corrientes

Campilobacterias termotolerantes en ambientes acuáticos de uso recreacional de las provincias de Chaco y Corrientes. Gariboglio Vázquez, ML; Tracogna, MF; Lösch, LS, Merino, LA. MICROAL 2012- 26 al 29 de noviembre de 2012. Buenos Aires. Argentina

Adaptación de una técnica para la detección simultánea de *Salmonella* spp. *y Campylobacter jejuni.* Gómez, MV; Tracogna, MF; Medina, MG; Gariboglio Vázquez, ML; Lösch, LS; Merino, LA. MICROAL 2012- 26 al 29 de noviembre de 2012. Buenos Aires. Argentina

Búsqueda de campilobacterias termotolerantes en aguas recreacionales de las provincias de Chaco y Corrientes. Gariboglio Vázquez, ML; Tracogna, MF; Lösch, LS. Comunicaciones científicas y Tecnológicas 2013. Resistencia, Chaco

Adaptación de una técnica para la detección simultánea de *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli* O157 Gómez, MV; Tracogna, MF; Medina, MG; Gariboglio Vázquez, ML; Lösch, LS; Merino, LA. XIII Congreso Argentino de Microbiología y II Congreso Microbiología Agrícola y Ambiental. 23 al 26 de septiembre de 2013 Buenos Aires, Argentina

Supervivencia de campilobacterias termotolerantes en ambientes acuáticos. Gariboglio Vázquez, ML; Lösch, LS; Merino, LA. Comunicaciones científicas y Tecnológicas 17 al 19 de junio 2014. Corrientes

Detección de campilobacterias termotolerantes ambientales: un verdadero desafío. Gariboglio Vázquez, ML; Lösch, LS; Borges, E; Merino, LA. XV Jornadas Argentinas de Microbiología 2014- 14 al 16 de agosto 2014. Córdoba

Importancia de la utilización del doble filtrado en la detección de *Campylobacter* spp. en aguas. Gariboglio Vázquez, ML; Lösch, LS; Merino, LA. XXI Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2015. Resistencia

El prefiltrado: una herramienta fundamental en la detección de *Campylobacter* spp. en aguas. Gariboglio Vázquez, ML; Lösch, LS; Tracogna, MF; Merino, LA. XVI Jornadas Argentinas de Microbiología 2015. Santa Fe

Supervivencia de *Campylobacter jejuni* a 4°C y bajo la influencia de la radiación UV. Merino, LA; Gariboglio Vázquez, ML; Lösch, LS; Tracogna, MF. Congreso Latinoamericano de Microbiología. Rosario 2016

TRABAJOS PUBLICADOS

***Campylobacter* spp., un patógeno humano de origen zoonótico y presencia ambiental.** Gariboglio Vázquez, María L.; Tracogna, María F., Lösch, Liliana S.; Merino, Luis A. Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste ISSN 0326-7083.Volumen 25 Nº1 2015

Prevalencia de bacterias enteropatógenas en niños que asisten a un hospital pediátrico en Resistencia, Chaco, Argentina. Viviana I. García Saito; María L. Gariboglio Vázquez; Ana M. Zaloff Dakoff; Mónica Álvarez Estigarribia; Mónica G. Sucin; Gloria Moreira; Liliana S. Lösch; Luis A. Merino. Rev. Fac. Med. UNNE XXXVII: 1, 15-20, 2017

TRABAJOS EN PRENSA

"Survival of *Campylobacter jejuni* under laboratory controlled conditions" Gariboglio Vázquez, María L., Tracogna, María F., Medina, Myriam, Lösch, Liliana S., and Merino, Luis A. Enviado para su publicación a la Revista Applied and Environmental Microbiology.

"**Selection and adaptation of a multiplex-PCR method for the simultaneous detection of three zoonotic foodborne pathogens"** Gomez MV, Lösch SL, Gariboglio Vázquez ML,

Medina MG, Tracogna MF, Luis Merino. Enviado para su publicación a Research in Microbiology

"**Campylobacter"** Luis Merino, Gariboglio Vázquez ML Enviado para su publicación en: Microbiología Biomedica- Basualdo y cols

TRABAJOS TERMINADOS, AUN NO SOMETIDOS A PUBLICACIÓN

Survival of *Campylobacter jejuni* in artificially contaminated water. Gariboglio Vázquez ML, Lösch LS, Tracogna MF, Merino LA

Supervivencia de *Campylobacter jejuni* a temperatura del refrigerador. Gariboglio Vázquez, ML; Tracogna,MF; Lösch, LS; Merino, LA.

APORTES DE ESTE TRABAJO

- ✓ Se generaron conocimientos acerca de este patógenos en ambientes acuáticos de nuestra región.
- ✓ Se aportaron datos de condiciones de supervivencia en estos cuerpos de agua.
- ✓ Se incorpó en el Instituto de Medicina Regional, la detección de *C. jejuni y C. coli* a partir de muestras de aguas mediante técnicas de cultivo y PCR.
- ✓ Se afianzaron las relaciones con el Servicio de Bacteriología Sanitaria del Instituto Malbrán y con el Dr. Heriberto Fernández del Instituto de Microbiología Clínica de la Universidad Austral de Chile.
- ✓ Se formaron recursos humanos en el campo de la Bacteriología y de la Biología Molecular.
- ✓ Se comunicaron los resultados obtenidos mediante publicaciones y presentaciones en eventos científicos
- ✓ Se divulgaron los hallazgos a través de medios periodísticos de la región