
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTIVO SELECTIVO QUE NO
REQUIERE INCUBACIÓN MICROAEROFÍLICA PARA EL AISLAMIENTO E
IDENTIFICACIÓN DE *Campylobacter jejuni/coli* EN MUESTRAS DE
ALIMENTOS**

Por

Verónica Alejandra Morales Montiel

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRO EN CIENCIAS con
Especialidad en Microbiología**

Agosto 2006

**DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTIVO SELECTIVO QUE NO
REQUIERE INCUBACIÓN MICROAEROFÍLICA PARA EL AISLAMIENTO E
IDENTIFICACIÓN DE *Campylobacter jejuni/coli* EN MUESTRAS DE
ALIMENTOS**

Aprobación de la tesis:

Dr. J. Santos García Alvarado
Director

Dr. Carlos E. Hernández Luna
Secretario

Dra. Norma L. Heredia Rojas
Vocal

Dra. Marivel Gómez
Suplente

**DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTIVO SELECTIVO QUE NO
REQUIERE INCUBACIÓN MICROAEROFÍLICA PARA EL AISLAMIENTO E
IDENTIFICACIÓN DE *Campylobacter jejuni/coli* EN MUESTRAS DE
ALIMENTOS**

Cómite Académico de Maestría

Dra. Julia Verde Star
Jefe de la División de Estudios de Postgrado

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L., bajo la dirección del Dr. José Santos García Alvarado y la Co-dirección de la Dra. Norma L. Heredia Rojas. Esta investigación fue apoyada por el Fondo Sectorial SAGARPA, dentro del proyecto “Detección de *Campylobacter jejuni/coli* en carne de cerdo usando un método rápido de identificación y determinación de su perfil de susceptibilidad a antibióticos” y por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT).

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primera instancia a DIOS por todas las bendiciones recibidas a lo largo de este trabajo y por las que aún me sigue dando, de manera especial te doy las gracias por haber creado las campylobacterias, las cuales me dieron muchas alegrías.

También quiero agradecer a mi querida FAMILIA, a mis padres: Dolores y Jorge, Lety, Héctor, Lucy, Minerva, Leobardo, Erasto su apoyo incondicional tanto moral y de colaboración, ya que sin esta valiosa ayuda, alguna actividad no hubiera sido posible, este trabajo también es de Ustedes.

Así mismo, extendiendo mi gratitud al Dr. Santos García y a la Dra. Norma Heredia sus enseñanzas, aportaciones académicas y para la vida que me hicieron. Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio y por todos los recuerdos que llevo, así mismo agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) su apoyo económico en dos años.

De manera muy especial quiero agradecer con todo cariño y respeto a la Dra. Irene Wesley, por todas sus aportaciones al trabajo, por ayudarme a aterrizar ideas y adiestrarme en el trabajo de las campylobacterias, etc. No hay palabras suficientes que expresen mi gratitud hacia Usted. También quiero agradecer todo el apoyo a las maestras: Q.F.B. Virginia Hinojosa, Q.F.B. Célida Luz Hinojosa, Q.F.B. María Elena

Cruz, Q.F.B. Marcela Luna y M.C. Yolanda Gracia. Muchas gracias por su apoyo incondicional y su cariño.

A mis AMIGOS y COMPAÑEROS, a mi querida amigotota Andrea Alcázar (amiguigui), Amiguita muchas gracias por tu amistad, consejos, apoyo incondicional en las buenas y las malas; Luisa Solís y Guadalupe Rojas, por sus atinados consejos, sugerencias y mano amiga; a toda la raza del laboratorio, de forma muy especial a Israel, Angela, Brenda, Lalo por todos esos momentos de risas y trabajo que compartimos y que se han extendido más allá de las puertas del laboratorio. También quiero agradecer su apoyo a Araceli y Humberto en las cuestiones de biología molecular, Quique Sánchez, Gerardo Lucío, Frecia Martínez, Gladys Gutiérrez, Eda Lara, Gandhi Salazar.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. RESUMEN/ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. HIPÓTESIS	5
4. OBJETIVOS	8
4.1 Objetivo general	
4.2 Objetivo particulares	
5. ANTECEDENTES	10
5.1 Breve historia del Género <i>Campylobacter</i>	11
5.2 Características de <i>Campylobacter jejuni/coli</i>	12
5.3 Epidemiología del género <i>Campylobacter</i>	15
5.4 Enfermedad Alimentaria causada por <i>Campylobacter</i>	19
5.5 Presencia de <i>Campylobacter</i> en Alimentos	21
5.6 Aislamiento de <i>Campylobacter</i>	24
5.7 Medios de cultivo empleados para el aislamiento de campylobacterias	27
5.7.1 Componentes de los medios	27
5.7.2 Objetivos del pre-enriquecimiento	29
6. MATERIAL Y MÉTODOS	37
6.1 Aislamiento e identificación de las cepas nativas de <i>Campylobacter jejuni/coli</i>	38
6.2 Cepas de referencia	39

	página
6.3 Preparación de las diversas formulaciones	40
6.4 Preparación y dilución de la cepa de referencia	40
6.5 Cinéticas de crecimiento	41
6.6 Ensayos de contaminación artificial y recuperación de campylobacterias en alimentos	41
6.7 Determinación del grado de contaminación de las muestras de alimentos	42
6.8 Reacción en cadena de la polimerasa	43
6.8.1 Extracción del DNA genómico	43
6.8.2 Condiciones de Amplificación	43
6.9 Diseño experimental	44
7. RESULTADOS	45
7.1 Aislamiento e identificación de las cepas nativas de <i>Campylobacter jejuni/coli</i>	46
7.2 Diseño de las formulaciones	47
7.3 Reacción en cadena de la polimerasa 7.3.1 Extracción de DNA y condiciones de amplificación	78
8. DISCUSIÓN	82
9. CONCLUSIONES	89
REFERENCIAS	91

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Formulaciones propuestas para el medio de cultivo.	46
2. Cepas nativas de <i>Campylobacter</i> aisladas.	48
3. Cuentas viables de <i>C. jejuni</i> en las formulaciones F4 y F6.	55
4. Recuperación de <i>C. jejuni</i> 37 empleando F9.	59
5. Recuperación de <i>C. jejuni</i> 5653 en F10.	61
6. Recuperación de <i>C. jejuni</i> 5356 en F11.	62
7. Recuperación de <i>C. jejuni</i> 5356 y <i>C. jejuni</i> 37 en F12.	63
8. Recuperación de <i>C. jejuni</i> 5356 y <i>C. jejuni</i> 50 sp ee F13.	65
9. Recuperación de <i>C. jejuni</i> 50 sp en F14.	66
10. Recuperación de <i>C. jejuni</i> 50 sp en F15.	67
11. Recuperación de <i>C. jejuni</i> 50 sp en F16.	69
12. Recuperación de <i>C. jejuni</i> 50 sp y <i>C. jejuni</i> 57 sp en F17.	70
13. Recuperación de <i>C. jejuni</i> 57 sp en F18.	71
14. Recuperación de <i>C. jejuni</i> 57 sp en F19	72
15. Recuperación de varias cepas de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> empleando la F20.	73
16. Comparación de los niveles de recuperación de varias cepas de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> empleando la F20, Caldo Bolton y Caldo Tran.	76
17. Comparación de diversos parámetros con los métodos de extracción de DNA.	79

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Productos de amplificación obtenidos de aislados nativos.	47
2. Curvas de crecimiento de <i>C. coli</i> 19 y <i>C. jejuni</i> 37 utilizando las formulaciones F4, F5, F6 y F7.	54
3. Cinéticas de crecimiento de tres cepas de <i>Campylobacter</i> : <i>C. coli</i> 19, <i>C.coli</i> 49 y <i>C. jejuni</i> 37, creciendo en la formulación 4.	57
4. Cinéticas de crecimiento de cinco cepas de <i>Campylobacter</i> <i>C. coli</i> 75, <i>C. jejuni</i> 37, <i>C. coli</i> 19, <i>C. coli</i> 81, <i>C. coli</i> 49, creciendo en la formulación 8.	58
5. Productos de amplificación de aislados nativos de aves.	80
6. Productos de amplificación obtenidos de aislados nativos y empleando las formulaciones 7 y 8.	81

NOMENCLATURA

A	Absorbancia
°C	Grados Centígrados
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EL	Extracto de Levadura
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramos
g/ml	Gramos por mililitro
h	Hora
ICC	Infusión Cerebro Corazón
KCl	Cloruro de potasio
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
L	Litros
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
mM	Milimolar
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mV	Milivolts
nm	Nanometros
pb	Pares de Bases
%	Por ciento
v/v	Por ciento volumen/volumen
IU	Unidades Internacionales

RESUMEN

Las bacterias del Género *Campylobacter* principalmente *C. jejuni* y en menor proporción *C. coli*, han sido implicadas como la principal causa de enfermedades transmitidas por alimentos en muchos países. La alta incidencia de casos reportados, quizá se de en parte, a que los reservorios de estas bacterias (para *C. jejuni* son las aves, para *C. coli* son los cerdos) son productos que presentan un alto consumo entre la población. A pesar de la alta incidencia, aún en muchos laboratorios no se realiza la búsqueda de estas bacterias, debido tal vez a que los procedimientos de aislamiento, identificación y enumeración son difíciles, laboriosos, requieren mucho tiempo y experiencia, además de ser caros, ya que se requieren medios complejos y atmósferas especiales.

Debido a lo anterior, uno de los objetivos de este trabajo fue desarrollar un medio de aislamiento que no requiera de una incubación en atmósferas especiales, además de permitir su posible acoplamiento a técnicas de identificación por métodos moleculares.

Se desarrollaron cuatro grupos de formulaciones de medios de aislamiento, de los cuales, los que incluían metabisulfito y tioglicolato de sodio fueron los que mejores resultados presentaron. Dentro de este grupo, se evaluaron 20 formulaciones distintas, en donde la que incluía 1.5 g/L de metabisulfito de sodio y 0.75% de tioglicolato de sodio (F20) fue la que mejor resultados mostro, recuperando bajos números de campylobacterias en ensayos de contaminación artificial empleando muestras con un nivel intermedio a alto de contaminación. En cuanto a su desempeño acoplado en técnicas de biología molecular, la técnica elegida fue la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), sin embargo se estudió poco su desempeño, pero tentativamente puede funcionar ya que al menos la F8 no mostró problemas de interferencia.

ABSTRACT

Members of the genus *Campylobacter*, *C. jejuni* (mainly) and *C. coli*, are among the principal cause of food-borne infections worldwide. The high incidence of reported cases, probably is due to reservoirs of these bacterias (poultry for *C. jejuni*, swine for *C. coli*) are foods with high consume in the poblacion. However much the incidence, many laboratories do not isolate these bacterias currently, perhaps to the isolate, identification and enumeration procedures are difficult, fastidious, expensive and time comsuming, in addition employs complexes media and special atmospheres.

According to this, the mainly objetive of this work was develop an isolate media that works with no special atmospheres, also it should the adaption to molecular identification, such as polymerase chain reaction (PCR).

Four groups of formulations were developed, the best results were obtained when sodium metabisulfite and thioglycolate acid were included. In this group twenty formulations were evaluated and the best contains 1.5 g/L of sodium metabisulfite and 0.75% of sodium thioglycolate (F20). The F20 could isolate lower numbers of campylobacters in artificial assays of contamination with samples with medium to high level of contamination. Little it could be concluded about the performance of the F20 with PCR, but considering results with F8 where PCR can work without problems, maybe the same results will obtained for F20.

Introducción

Las enfermedades que se transmiten por alimentos se conocen desde épocas muy remotas. Las intoxicaciones y la alteración de los alimentos causados por microorganismos ya preocupaban a los hombres primitivos. Ya en el 2000 A.C, Moisés había dictado leyes sobre los alimentos que se podían comer y los que se debían rechazar, así como también estaban legislados los métodos de preparación y la importancia de la limpieza de las manos antes de ingerir los alimentos.

En los últimos años la incidencia de enfermedades de origen alimentario ha aumentado considerablemente. En parte, el incremento es debido a la mejora de los sistemas sanitarios dedicados al diagnóstico y a la notificación, pero también a otros factores indirectos como una mayor ingesta de comidas preparadas o de establecimientos, así como la facilidad de desplazamiento a otros países sin que se tomen las medidas preventivas oportunas.

Recientemente algunos patógenos que han retomado mucha importancia, pertenecen al género *Campylobacter*. Y a finales de los años setenta, el desarrollo de técnicas de aislamiento para estos microorganismos dio lugar a mejoras en la detección de infecciones por esta bacteria. Desde entonces, las especies termorresistentes *C. jejuni* y *C. coli* se han incluido entre los agentes causales más importantes de diarrea aguda en el mundo industrializado. La enfermedad que producen (llamada campylobacteriosis) representa un importante problema de salud pública con un impacto socio-económico considerable (Fernández, 2001). El reservorio primario de las campylobacterias, es el tracto digestivo de aves y mamíferos, y la dosis infectiva parece ser pequeña. Uno de los misterios que encierra esta bacteria es que puede vivir en el intestino de las aves sin producirles enfermedad alguna, mientras que en el ser humano se puede comportar como un patógeno invasor (Nachamkin and Blaser, 2000).

Los métodos para la búsqueda de esta bacteria requieren de una gran cantidad de tiempo, trabajo y experiencia en la identificación de las colonias típicas. Una marcha

normal para esta bacteria implica 72 horas para el aislamiento de las colonias sospechosas y hasta siete días más para confirmar por medio de pruebas bioquímicas convencionales la identidad de estas. Sin embargo, en muchas ocasiones se requiere tomar decisiones de forma rápida y aunque en la actualidad existen muchos métodos que prometen acortar el tiempo de obtención de resultados, la mayoría de estos métodos son caros y requieren de condiciones especiales, debido a la naturaleza microaerofílica de estas bacterias.

Por lo tanto, uno de los objetivos de este trabajo fue el desarrollo de una modificación a un medio que no requiere el empleo de una atmósfera microaerofílica de incubación, tal como lo es el Blood Free Enrichment Broth (Tran, 1998) la cual prescindiera del uso de carbón activado. El objetivo de esta modificación es debido a que este componente hace difícil el acoplamiento de este medio con otras técnicas, las cuales podrían ayudar a acortar el tiempo de identificación de las campylobacterias de una forma sensible. Además de la eliminación de este componente se requiere que la formulación final sea capaz de recuperar bajos números de campylobacterias, en presencia de altos niveles de flora acompañante de diversas matrices alimenticias.

De acuerdo con nuestros resultados obtenidos a partir de ensayos de inoculación artificial de un número conocido de unidades formadoras de colonias, una formulación que contenga un sistema de agentes reductores compuesto por tioglicolato de sodio en una concentración al 0.75% y metabisulfato de sodio al 1.5 g/L es suficiente para aislar tentativamente 100 UFC de campylobacteras por gramo de alimento, con un nivel de contaminación natural intermedio.

La importancia de los resultados aquí obtenidos podrán tomarse como el inicio de un estudio más profundo sobre una formulación que promete acortar tiempo y dinero, así como finalmente llevar a cabo más investigaciones sobre aspectos poco conocidos de estas bacterias.

Hipótesis

Es posible diseñar un medio de enriquecimiento que no requiera de incubación microaerofílica y que sea selectivo para *Campylobacter jejuni/coli*, el cual puede acoplarse a una técnica de identificación molecular (PCR).

Objetivos

GENERAL

Desarrollar un medio de enriquecimiento selectivo para el aislamiento e identificación de *Campylobacter coli/jejuni* a partir de muestras de alimentos.

ESPECÍFICOS

- 1) Desarrollar un medio de enriquecimiento selectivo que no requiera incubación microaerofílica y que permita el cumplimiento de técnicas moleculares (PCR) para el aislamiento e identificación de *Campylobacter jejuni/coli*.
- 2) Determinar el nivel de recuperación de campylobacterias para este medio, mediante ensayos de contaminación artificial de diversos tipos de alimentos.

Antecedentes

5.1 Breve historia del Género *Campylobacter*

Los patógenos, infecciosos y toxigénicos, transmitidos a través de los alimentos han sido conocidos desde hace más de 100 años. En los años cincuentas en Estados Unidos e Inglaterra, los patógenos de mayor preocupación por el número de casos y brotes que se presentaron fueron *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*. Sin embargo, para los años ochentas agentes tales como *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157: H7 fueron los patógenos que recibieron más atención (Todd, 2001).

El nombre de “*Campylobacter*” proviene de la palabra griega “kampylos” que significa curva (Keener *et al.*, 2004). Las bacterias de este género se cree que fueron descritas por primera vez en el siglo antepasado por Theodor Escherich en 1886. Los intentos de Escherich por obtener un cultivo puro de estas bacterias no fueron exitosos. Quizás estas bacterias fueron por primera vez obtenidas en cultivo a principios del siglo pasado, sin embargo el primer aislamiento exitoso de campylobacterias documentado a partir de heces fue llevado a cabo hasta en 1972 por Dekeyser y Butzler en Bélgica, en una mujer joven con un cuadro de diarrea aguda y enteritis hemorrágica (EUFIC, 2004).

Los primeros intentos por estudiar su fisiología, patología y epidemiología fueron realizados en el área veterinaria, donde eran relacionados como causa de infecciones fetales, del tracto reproductivo y aborto en animales, los cuales a nivel mundial eran la principal causa de pérdida de reproducción en ganado vacuno y ovejas. En 1919, Smith y Taylor en Estados Unidos, describieron los abortos provocados por “vibrios” en ganado vacuno y le dieron el nombre de “*Vibrio fetus*” a los microorganismos en forma de vibrios, difíciles de aislar y mantener en cultivo puro que habían sido descritos por otros autores (Nachamkin and Blaser, 2000).

Ya en 1957, Elizabeth King sería la primera en sugerir que este microorganismo podría ser una importante causa de zoonosis (Stern, 2001). Aunque los nombres de las

especies de *C. jejuni* y *C. coli* se derivaron de una asociación inicial con enfermedades entéricas en animales, actualmente estos dos microorganismos, son los patógenos de humanos más importantes de este género. En últimos reportes se han añadido a este grupo a *C. lari* y a *C. upsaliensis* (On, 2001), sin embargo a *C. jejuni* se le considera responsable de la mayoría de las infecciones por *Campylobacter* en humanos (80 – 90%) (Ketley, 1997).

Inicialmente incluidos dentro del género *Vibrio*, en 1963 se encontró que presentaban notorias diferencias bioquímicas con el agente del cólera y otros vibrios halofílicos, constituyéndose entonces el género *Campylobacter* por Selbad y Véron. Aunque la clasificación de estas bacterias está en continua revisión y modificación, actualmente se consideran dos géneros dentro de la familia *Campylobacteriaceae*: *Campylobacter* y *Arcobacter*. De acuerdo con criterios taxonómicos más actuales están integradas el Grupo I de la superfamilia VI del ARN ribosomal (Meinersmann *et al.*, 2002).

Estos patógenos son reconocidos como “emergentes”, pero esto es ciertamente inexacto (Stern, 2001), debido que para estos microorganismos conocidos como “fastidiosos” no se habían empleado condiciones especiales para su aislamiento y por lo tanto no se había estudiado su distribución y las enfermedades que provocaban.

5.2 Características de *Campylobacter jejuni/coli*

C. jejuni/ coli son bacilos cortos delgados, gram negativos (1.5 – 6.0 μm de largo y 0.2 – 0.5 μm de ancho), curvados en forma de “S”, microaerofílicos obligados, ya que no se desarrollan a concentraciones de O_2 mayores a 21% (aire), requiriendo de 10% de CO_2 , y 5 % de O_2 . Debido a su alto requerimiento de CO_2 algunos autores los consideran microorganismos capnófilos (Price, 2003). *C. jejuni* es inusualmente sensible al oxígeno y a la deshidratación. Se piensa que algunas enzimas presentes en *C. jejuni* tal como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, peroxidasa, glutatión sintetasa y glutatión reductasa, juegan un papel muy importante en la protección contra los daños provocados por el oxígeno (Keener *et al.*, 2004).

Estos microorganismos no son esporulados y son móviles por un flagelo no envainado en uno o en ambos extremos. Muestran una típica y activa movilidad giratoria hacia adelante (movimiento semejante al de un sacacorchos) fácilmente observable bajo el microscopio de contraste de fases. En cultivos viejos, así como por influencia de algunos compuestos antimicrobianos toman una forma cocoide (Jacobs-Reitsma, 2000) la cual es conocida comúnmente como “forma viable no cultivable”; sin embargo recientes investigaciones de estas formas determinaron que solo un número limitado de los aislados adoptan este tipo de morfología. Al parecer el desarrollo de la forma cocoide no es una característica esencial del “estado viable no cultivable” para *Campylobacter* (Tauxe, 2000).

La diferenciación entre las especies de *Campylobacter* relacionadas con cuadros clínicos diarréicos se consigue con pruebas bioquímicas: *C. jejuni* es catalasa y oxidasa positiva, con movilidad típica, gram negativa. Otras pruebas alternativas son: no crece a 25°C, pero si a 35°C, y 42°C, crece en medio con glicina al 1%, es sensible al ácido nalidíxico, y resistente a la cefalotina, no produce H₂S en agar TSI, pero si lo hace en tira de acetato de plomo, puede llevar a cabo la reducción de NO₃ y la prueba de hidrólisis del hipurato se utiliza para distinguir entre *C. jejuni* (+) y *C. coli* (-) (Torres, 1999). Sin embargo, en fechas recientes el empleo de pruebas bioquímicas ha sido reemplazado paulatinamente por el uso de técnicas de biología molecular, debido a que la prueba que diferencia *C. jejuni* de *C. coli*, la prueba de hipurato, a veces no es muy precisa, y existen cepas de *C. jejuni* que no hidrolizan hipurato, así como hay cepas de *C. coli* que pueden hacerlo.

Campylobacter spp. tiene un genoma pequeño de aproximadamente 1.6 a 1.7 Mb. La proporción de GC es aproximadamente del 30%. Este tamaño pequeño quizás explica la necesidad de un medio complejo para crecer y su inhabilidad para fermentar algunos carbohidratos y degradar sustancias complejas. Elementos extracromosomales tales como los plásmidos han sido reportados en *Campylobacter spp.* (Ketley, 1997).

Las campylobacterias son resistentes a un amplio rango de antibióticos, una característica que es explotada en el diseño de medios de aislamiento. Estas bacterias no crecen a temperaturas menores de 30°C y su temperatura óptima de crecimiento es 42°C (Malavez, 2005).

A diferencia de muchos patógenos entéricos, hay una propagación limitada de *Campylobacter* dentro de las familias y su principal reservorio de infección son los animales. La ecología de las campylobacterias comprende fuentes variadas de vida libre principalmente aves: patos, gansos y gaviotas, migratorias, etc. Estos microorganismos también son encontrados en otras especies de vida libre y domésticas, tal como los roedores. Se sabe que los insectos pueden llevar a este microorganismo en su exoesqueleto (Fernández and Farace, 2003).

C. jejuni se encuentra como comensal en el tracto gastrointestinal de una amplia variedad de animales tal como las aves de corral, bovinos, ovinos, cabras, perros, gatos, etc. *C. coli* por su parte es un comensal común en cerdos, mientras que *C. lari* ha sido aislada del intestino de gaviotas y mejillones (CFIA, 2001). La distribución de estas bacterias es muy variada, por ejemplo, en un estudio realizado en una área rural se encontró que *C. jejuni* estaba presente en todos los animales muestreados, su prevalencia variaba desde el 11% en la fauna no avícola a 36% en heces de ganado vacuno y también fue aislada en el 15% de las muestras de agua. En este mismo estudio se determinó que *C. coli* fue comúnmente aislada de muestras de agua (17%) y ovejas (21%). *C. lari* pudo ser aislada de todo tipo de muestras a excepción de las heces de ovejas y se encontró en números moderados en aves (7%) y agua (5%), mientras que *C. hyointestinalis* solo pudo ser aislada de ganado vacuno (7%) y aves (1%) (Brown *et al.*, 2004).

Hay casos bien documentados de brotes asociados con alimentos: paté, crema de ajo, ensaladas, pepinos, pollo frito, leche no pasteurizada y agua. *C. jejuni* no sobrevive particularmente bien en alimentos ya que es sensible al secado, a la temperatura, un pH bajo (mueren fácilmente a pH 2.3), a la concentración del oxígeno del ambiente y el

calor; también es sensible a la radiación gama, se estima que una reducción de 6 logaritmos puede ser el resultado a una exposición a 2 kGy, y 10 logaritmos a una de 2.5 kGy. Es más sensible a la radiación UV que *Escherichia coli*. Algunas condiciones de congelación promueven su sobrevivencia (ESR, 2001).

Estos microorganismos también son sensibles a una gran cantidad de agentes químicos como el hipoclorito de sodio, o-fenilfenol, yoduro de polivinilpirrolidona, cloruro de alquilbencil dimetilamonio, glutaraldehído, formaldehído y etanol (Logue *et al.*, 2003).

5.3 Epidemiología del género *Campylobacter*

La infección por *Campylobacter* constituye una zoonosis de distribución mundial. A pesar de que algunos aspectos de la transmisión del microorganismo aún se desconocen, se ha logrado progresar considerablemente en la comprensión de sus reservorios. Aparentemente los modos de transmisión predominante son diferentes en países industrializados y países en vías de desarrollo (Adhikari *et al.*, 2002).

Varias especies del género *Campylobacter* se encuentran como comensales en el tracto gastrointestinal de animales salvajes y domésticos. Los principales reservorios los constituyen el ganado bovino, ovino, suino, roedores, todas las aves de corral, perros y gatos. El espectro de reservorios varía con la especie: *C. jejuni* tiene un reservorio amplio, mientras que *C. coli* es más frecuentemente aislada de cerdos (Duim *et al.*, 2001).

La adquisición primaria del germen por los animales ocurre generalmente en edad temprana y puede ser causa de morbi-mortalidad en estos animales, pero la mayoría de las veces la colonización conduce a un estado de portador de por vida (NCPH, 2004).

Han sido propuestos cuatro modos de transmisión para explicar la presencia de *Campylobacter* como fuente de infección para humanos:

-
-
1. **Contacto Animal – Animal:** este modo de transmisión es ampliamente aceptado para explicar la alta incidencia de este microorganismo entre las aves y los cerdos; los cuales están confinados en granjas con altas densidades poblacionales y poco espacio, gracias a estos dos factores existe una rápida dispersión de la infección a través de la contaminación fecal del alimento y del agua para beber (Dyer and Stoltenow, 2001).
 2. **Contacto directo Animal – Hombre:** se ha estimado que el 5% de las infecciones por campylobacterias pueden ser resultado de este modo de transmisión, en donde los principales vectores asociados son las mascotas, tal como los perros y los gatos. Dentro de esta categoría también se puede incluir a las personas que trabajan en rastros, granjas, etc (Moore, 1999).
 3. **Contacto Persona – Persona:** aunque se han reportado casos de transmisión vertical, la ruta de transmisión fecal – oral no parece ser una ruta importante para *Campylobacter*, a diferencia de otros patógenos tal como *Shigella spp.* (Fernández *et al.*, 2004).
 4. **Contaminación Cruzada:** es una de las más importantes, ya que ocurre en rastros, donde es casi imposible evitar el contacto de las heces con la carne. Aunque a las canales se les da un lavado con agua clorada, las campylobacterias escapan a la acción oxidante de este agente depositándose en los folículos de la piel, los cuales quedan abiertos después del proceso de escaldado. Recientes investigaciones han determinado que la mayoría de las campylobacterias quedan localizadas entre 0 a 10 μm de profundidad, donde el sanitizante no puede entrar (Chantarapanont *et al.*, 2004).

En el caso de humanos, se ha reportado que *C. jejuni* no está presente en individuos sanos (FDA/CFSAN, 2001), sin embargo en países subdesarrollados, los portadores asintomáticos pueden existir. Reportes de países en vías de desarrollo tales como México, Brasil, Bangladesh, Vietnam y Tailandia así como de países desarrollados tal como Escocia, Italia, Noruega y Estados Unidos, han mostrado que el número de aislamientos de *Campylobacter* puede ser igual o superior a otros patógenos entéricos tal como *Salmonella* y *Shigella* (Trachoo, 2003).

La incidencia de casos de campylobacteriosis que ocurrieron en Estados Unidos en el año 2001 fueron de 2.1 a 2.4 millones y estuvo asociado con 124 muertes (Friedman *et al.*, 2004). En Inglaterra y Gales desde antes del año 2000, *Campylobacter* ha sido la bacteria más comúnmente aislada de cuadros gastrointestinales (CDSC North West, 2002). Sin embargo, en Europa, el número de casos reportados de campylobacteriosis está incrementándose en muchos países, revelando que estas infecciones son un problema emergente e importante de salud pública. Las enfermedades provocadas por *Campylobacter* están incluidas dentro de un sistema de vigilancia que funciona en toda Europa (Commission Decision 2000/96/EC) (Takkinen *et al.*, 2003).

Sin embargo, la incidencia de casos en países en desarrollo es incierta debido a que en estos países no se cuenta con un sistema de vigilancia permanente (Bork *et al.*, 2002). Se estima que en estos países la incidencia de casos es entre 30 y 50 veces mayor (Fernández, 2001). Los índices de aislamiento de *Campylobacter* en heces de personas de países en vías de desarrollo pueden variar de un 5 a un 20%. A pesar de que no se cuentan con datos de un sistema de vigilancia, estudios de casos han proporcionado estimados que van de 40 000 a 60 000/ 100 000 en niños menores de 5 años (Humphrey, 1999).

México no cuenta con un sistema de vigilancia permanente de *Campylobacter* y los doctores no reportan e incluso no hacen cultivos de los pacientes diarreicos en busca de este microorganismo, más aún, no es una enfermedad reportable, ya que las estadísticas de mortalidad/morbilidad del sistema de salud no la contempla. Los datos que se tienen sobre la incidencia de esta enfermedad provienen de artículos de investigación donde solo es incluida una población limitada. Algunos datos indicativos de la presencia de *Campylobacter* en niños del Distrito Federal, son proporcionados por Muñoz and Torres (1992), en donde se encontró que este agente etiológico era la principal causa de diarrea con sangre en niños de menos de 1 año (29%), tercera en niños de 1 - 5 años (12%), y no tiene presencia en niños de 6 a 15 años. Lo cual no

coincide con reportes realizados en países desarrollados donde la campylobacteriosis afecta a adultos y niños (Christensen *et al.*, 2001).

En un estudio posterior realizado entre 1999 y el 2000, en niños lactantes y preescolares con diarrea aguda atendidos en un consultorio pediátrico no institucional en Guadalajara Jalisco, se encontró que dentro de los agentes bacterianos identificados se encontraba a *C. jejuni* en un 27.4%. En todos estos casos, se encontraron leucocitos en las heces de los niños, por lo que una de sus sugerencias fue realizar un coprocultivo cuando se encuentre tal condición (Larrosa *et al.*, 2002).

Aunque en México no hay reportes de brotes provocados por *Campylobacter* (al menos en individuos mexicanos) si hay noticias de un brote de gastroenteritis en turistas canadienses, los cuales estaban de vacaciones en Mérida. Al menos 30 personas enfermaron, pero sólo en 7 se confirmó la presencia de *Campylobacter* en heces. Las autoridades mexicanas hicieron una investigación al respecto y encontraron que dos terceras partes de los alimentos sometidos a análisis microbiológicos presentaban una muy alta contaminación con coliformes, además fueron aislados patógenos tales como *Salmonella, spp.*, *Yersinia enterocolítica* y *Staphylococcus aureus* (CCDR, 1996).

En los países desarrollados, las estaciones climáticas con los más altos índices de aislamiento son la última parte del verano y la primera parte del otoño. La enteritis asociada a *Campylobacter* muestra un patrón epidemiológico diferente en países en vías de desarrollo. En éstos, no hay una estación en la cual se presente un alto número de casos (Hiett *et al.*, 2002). Se especula que la alta incidencia en estos países puede ser debido a la presencia de portadores asintomáticos. Esta diferencia epidemiológica parece estar relacionada con un alto nivel de exposición a *Campylobacter* en tales países, especialmente en los primeros años de vida, lo cual podría generar diferentes perfiles inmunológicos (Yildirim *et al.*, 2005).

En un estudio realizado en un rastro de aves, se encontró que a similitud del patrón epidemiológico en humanos, la temporada de mayor aislamiento de

Campylobacter se presentaba en los meses con temperatura más cálida, mientras que los meses de baja recuperación fueron en los meses de invierno (Septiembre – Febrero). En este mismo estudio se encontró que diferentes cepas pueden estar presentes a lo largo de todas las operaciones de escaldado, eviscerado, etc.; así como que algunas cepas pueden “reaparecer” varias veces en el año. Los autores concluyeron que las bajas temperaturas ambientales que experimentan las aves durante largos períodos pueden jugar un papel importante al disminuir el número de poblaciones de campylobacterias en los meses de invierno (Hinton Jr. *et al.*, 2004).

5.4 Enfermedad Alimentaria causada por *Campylobacter*.

El término campylobacteriosis se utiliza comúnmente para la descripción colectiva de enfermedades provocadas por los miembros del género *Campylobacter* (Coker *et al.*, 2002). A veces también es conocida como enteritis por *Campylobacter* o gastroenteritis (FDA/ CFSAN, 2001).

La enfermedad es una enteritis a nivel de intestino delgado y grueso (el íleon y el colon son los sitios principalmente afectados), con un período de incubación corto que suele ser de 1.5 a 7 días (Fernández, 2001).

La ingesta de dosis bajas (de 500 a 800 células) puede provocar diarrea con sangre y leucocitos en las heces. De ahí que se acepte que la dosis infectiva mínima sea cercana a 500 células del germen, tal como lo han mostrado estudios con voluntarios humanos. El cuadro clínico no es fácil de distinguir de una salmonelosis o una shigelosis (enfermedades causadas por *Salmonella* y *Shigella* respectivamente). Puede haber cefalea, mialgias, vértigo y delirio (Park, 2002). Los síntomas de la infección son variables, en países desarrollados la enfermedad esta caracterizada por la presencia de heces sanguinolentas, fiebre y dolor abdominal más severo que el que se presenta en cuadros provocados por *Salmonella* y *Shigella*, mientras que en países en desarrollo las características reportadas son diarrea acuosa, fiebre, dolor abdominal, vomito, deshidratación y presencia de leucocitos fecales (Coker *et al.*, 2002). En todos los casos hay excreción del microorganismo por las heces.

La infección severa por *Campylobacter* puede simular un cuadro de apendicitis aguda y por lo tanto provocar una cirugía innecesaria. Las infecciones extraintestinales y secuelas no son comunes, sin embargo, pueden ocurrir y estas incluyen: bacteremia, bursitis, infección del tracto urinario, meningitis, endocarditis, pancreatitis, aborto, artritis reactiva, un tipo de polineuritis llamado Síndrome de Miller – Fischer (Barros – Velásquez *et al.*, 1999), Síndrome de Reiter (en aproximadamente el 1% de los pacientes con campylobacteriosis en donde el síndrome se presenta 7 a 10 días después del establecimiento de la diarrea) y el Síndrome de Guillain – Barré (GBS) (Doyle *et al.*, 1997).

El síndrome de Guillain – Barré es un desorden desmielinizante inmunológico agudo, el cual se manifiesta como una parálisis ascendente. *C. jejuni* ha sido implicada como la principal causa dentro de los agentes infecciosos asociados con este síndrome (Leonard II *et al.*, 2004). Mundialmente *C. jejuni* serotipo O:19 ha sido las más relacionada, aunque otros serotipos tales como el O:1, O:2, O:57, O:16, O:23, O:37, O:41 también han sido implicados (Coker *et al.*, 2002). Aunque no está completamente entendido como se lleva a cabo el desarrollo de esta polineuropatía, se piensa que anticuerpos anti-*Campylobacter* dirigidos a porciones lipo-oligosacáridas de la bacteria tienen reacción cruzada con algunos epítopes gangliósidos en el tejido neural en los cuales existe una similitud molecular con las porciones del lipooligosacárido (Leonard II *et al.*, 2004), produciendo finalmente una parálisis neuromuscular aguda. Se estima que se produce un caso de GBS por cada 1,000 casos de campylobacteriosis. Más del 40% de los pacientes con este síndrome han evidenciado una infección reciente por *Campylobacter*. Aproximadamente el 20% de los pacientes con GBS tienen alguna discapacidad y alrededor del 5% muere (Alterkruse *et al.*, 1999).

Campylobacter no había sido relacionado con cáncer. Sin embargo, en un estudio realizado en pacientes con esta condición, se encontró que *C. jejuni* era el microorganismo responsable de un cuadro diarreico en pacientes con la Enfermedad Inmunoproliferativa del Intestino Delgado. Entre sus conclusiones mencionaron que la

inmunosupresión debido al proceso canceroso, el cuadro de desnutrición presente, así como la quimioterapia eran los responsables del inusual cuadro diarreico severo (Puri *et al.*, 1992). Más recientemente, se encontraron algunas especies de *Campylobacter* en cuatro de seis muestras de biopsias de pacientes con Enfermedad Inmunoproliferativa del Intestino Delgado, los cuales al ser tratados con antibióticos, presentaron una respuesta favorable. En estos pacientes la presencia de *C. jejuni* fue confirmada. De acuerdo con sus conclusiones *Campylobacter* y la Enfermedad Inmunoproliferativa del Intestino Delgado están asociadas y este patógeno debe ser añadido a la lista de microorganismos detonadores de patologías inmunoproliferativas (Lecuit *et al.*, 2004).

Esta posible relación de *Campylobacter* con Enfermedad Inmunoproliferativa es uno de los nuevos aspectos poco estudiados de esta bacteria, debido quizás a que hasta hace poco, se pudieron obtener a estas bacterias en cultivo (en los años setentas) lo cual ha facilitado en mucho su investigación. Otro aspecto poco conocido de esta bacteria es el grado de mortalidad asociado con una infección por este microorganismo. Un estudio realizado en Dinamarca de 1991 a 1999 demostró que las infecciones por *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolítica* y *Shigella*, están asociadas con un aumento de riesgo de muerte, en comparación de un grupo control, aunque enfermedades pre-existentes hayan sido tomadas en cuenta. En sus resultados mostraron que en general el 2.2% de las personas que habían adquirido infecciones por estos agentes habían muerto un año después de la infección, en comparación con el grupo control (0.7%), específicamente para *Campylobacter* se determinó que existe un número elevado de mortalidad de 6 meses a 1 año después de la infección (Helms *et al.*, 2003).

5.5 Presencia de *Campylobacter* en Alimentos.

Se ha sugerido que el consumo de pollo es el principal responsable de la infección por *C. jejuni*, pero pocos estudios han identificado este factor de riesgo como importante a excepción de que el consumo de pollo haya sido en un sitio fuera de casa, tal como un restaurante, mientras que para el caso de una infección por *C. coli* al parecer el consumo de agua embotellada ha sido el principal factor de riesgo asociado (Gillespie *et al.*, 2002).

La contaminación de las piezas de pollo se realiza en el momento de la evisceración cuando parte del contenido intestinal tiene contacto con la piel. Se estima que la presencia de las campylobacterias en el intestino de aves sanas varía de 10^6 a 10^8 UFC/ g de contenido (Rudi *et al.*, 2004), mientras que en animales enfermos, se han encontrado cuentas mayores a 10^8 UFC/ g (Modolo *et al.*, 1999). Así mismo se ha determinado además, que solo son necesarias cantidades pequeñas, tal como 5 miligramos de contenido intestinal para aumentar a cuentas peligrosas el número de campylobacterias en las piezas de pollo. De aquí que una de sus sugerencias sea evitar al máximo el proceso de contaminación cruzada en el proceso de eviscerado (Berrang *et al.*, 2004).

C. jejuni es aislada de productos crudos de origen animal con cierta regularidad. Existen numerosos registros al respecto, y también se cuenta con información sobre su aislamiento a partir de animales vivos. Se ha establecido que la incidencia de este microorganismo en alimentos de origen animal en punto de venta, va del 29.7% en pollos, 4.2% en salchichas crudas de cerdo, 3.6% en carne molida de res y 5.1% de carnes rojas, lo cual es menor que la encontrada en los rastros. Además, las bajas temperaturas (cercas a 0°C) disminuyen grandemente la incidencia de la bacteria; por ejemplo, se ha encontrado que el 30% de hígados de pollo fresco, contienen la bacteria en comparación con muestras congeladas, donde solo está presente en el 15 %. En carne de res los niveles se reducen del 12 al 2.3 % (Steinhauseroval *et al.*, 2005).

En Polonia se llevó a cabo un estudio para determinar el nivel de contaminación de campylobacterias en carnes expandidas en un mercado. Las muestras incluidas en este estudio fueron carne de pollo, cerdo y res. El nivel de contaminación encontrado fue del 73.8, 66.7 y 66.0% respectivamente. Además de determinar el nivel de contaminación, identificaron los aislados, encontrando que *C. coli*, *C. lari*, *C. cryoaerophila* y *C. jejuni*, fueron las especies más comúnmente presente en pollo, mientras que las muestras de cerdo y res estaban contaminadas por *C. upsaliensis*, y *C. coli*, respectivamente (Daczowska-Kozon *et al.*, 1999).

En un trabajo realizado en 4 centros comerciales de la Ciudad de la Plata Argentina, por Giacoboni y colaboradores, en donde se analizaron muestras de piel y piezas de pollo provenientes de diferentes granjas, se encontró que el 35% de estas estaba contaminada con *C. jejuni* biotipo II de Lior y solo el 0.8% con *C. coli* biotipo II. La frecuencia determinada fue baja en comparación con la hallada en Chile (92.9%) a partir de hígados congelados, sin embargo esta variación de resultados lo atribuyeron a las distintas técnicas empleadas para procesar las muestras (Giacoboni *et al.*, 1999).

En un estudio llevado a cabo en la Ciudad de México, en donde se investigaba la frecuencia de *Campylobacter* en pollo rostizado, se encontró que de 600 colonias que mostraban características morfológicas de *Campylobacter*, solo 123 aislados fueron positivos, de estos, 51 (41%) fueron identificados como *C. jejuni* y 23 (19%) como *C. coli*. Así mismo, se determinó que las prácticas de manipulación promovían la contaminación cruzada del producto final (Quiñónez-Ramírez *et al.*, 2000).

Zhao *et al.*, (2001), emplearon la técnica de PCR para determinar la presencia de *C. jejuni*, *C. coli*, *E. coli* y *Salmonella* en muestras de pollo, pavo, cerdo y res, encontrando que el 70.7% de las muestras de pollo, el 14.5%, el 7.7% y 0.5% respectivamente, estaban contaminadas con *Campylobacter*. Puntualizaron, además, que este género estaba presente en un mayor número, al compararlo con los otros microorganismos.

En un estudio realizado en tres ciudades de Irlanda en un período de 20 meses (Marzo 2001–Octubre 2002) se determinó la prevalencia de campylobacterias en alimentos expendidos en tiendas. Los resultados mostraron que *Campylobacter* pudo ser aislada en el 49.9% de muestras pollo crudo, 37.5% de pavo, 45.8% de pato. Se encontraron bajos niveles (3.2%, 5.1% y 11.8%) en carne de res cruda, cerdo y cordero, respectivamente. Otros resultados obtenidos fueron que el 0.8% de muestras de paté de cerdo fueron positivas para la presencia de *Campylobacter*, así como el 2.3% de las muestras de mariscos (ostiones) y el 0.9% de hongos frescos. Bajos niveles de

aislamiento de estos microorganismos (1.6%) fueron encontrados en muestras tomadas en tanques de leche sin pasteurizar. A diferencia de estos resultados, la recuperación de campylobacterias fue negativa en “budines” de cerdo, ensaladas y vegetales preparados, sandwiches o quesos hechos de leche sin pasteurizar. En total se obtuvieron 543 aislados de todas las muestras de alimentos analizadas, de las cuales el 83.4% fue identificada como *C. jejuni* y el 16.6% como *C. coli* (Whyte *et al.*, 2004).

5.6 Aislamiento de *Campylobacter*

Aunque no hay un método “estándar” aceptado para el aislamiento de campylobacterias de alimentos, heces o muestras del medio ambiente, algunos protocolos han sido publicados por organizaciones con un alto renombre tal como la International Standards Organization (ISO), el Laboratorio de Servicios de Salud Pública (PHLS) de Reino Unido, y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos (Donnison, 2003).

Un resumen de los métodos ha sido publicado por Corry *et al.*, (1995) en donde concluyeron que aunque no hay un método aceptado, hay algunos procedimientos generalmente aprobados:

- 1) El empleo de un período preeliminar de incubación (resucitación) a una temperatura reducida (37°C) por aproximadamente 4 horas antes de aumentar la temperatura a 42°C hasta completar las 48 horas de tiempo de incubación.
- 2) La inclusión de suplementos secuestrantes de oxígeno en el medio de pre-enriquecimiento, probablemente porque permite a los medios ser incubados en atmósfera normal.
- 3) Para el análisis de heces fecales de pacientes, la siembra directa en una placa de agar sangre o un agar selectivo para *Campylobacter* es a veces preferido a un pre-enriquecimiento.

Aunque la mayoría de los laboratorios que realizan análisis de rutina para esta bacteria siguen estos pasos, han aparecido metodologías que ofrecen acortar el tiempo de

análisis con una precisión y exactitud comparable con los métodos “estándar”. Las principales ventajas que estos métodos ofrecen son: disminución del tiempo de emisión de resultados, costos, espacio, horas técnico (trabajador) etc. Un ejemplo de lo anterior es la propuesta en donde se empleaban solo dos pasos; uno de enriquecimiento en caldo Bolton y uno más el cual consistía en una ELISA. Este nuevo método estaba enfocado con aplicación directa para la búsqueda de campylobacterias en muestras de alimentos, y de acuerdo con sus resultados la sensibilidad del método era de 10 UFC/25 g de alimento (Wicker *et al.*, 2001). Otro ejemplo es el desarrollo de biosensores. Este tipo de tecnologías permite la identificación de especies de campylobacterias en muestras de alimentos y bebidas. Algunos pueden detectar otras bacterias, tal como el desarrollado en el National Reference Laboratory (NRL), el cual también puede identificar especies del género *Shigella* al mismo tiempo. Algunas ventajas de estas tecnologías es que la corrida de la muestra no requiere un pre-enriquecimiento o pre-tratamiento de la muestra, sin embargo a pesar de estas ventajas, su principal desventaja es el costo de adquisición del equipo (Sapsford *et al.*, 2004).

Reportes en literatura sugieren que más laboratorios también están empleando métodos moleculares para identificar directamente especies de *Campylobacter* en las muestras o para confirmar la identidad de las especies aisladas (Moore, 2001), debido a que algunas pruebas bioquímicas no han sido bien estandarizadas, algunos resultados variables se han reportado en varios estudios. Como alternativas a esos métodos, los esquemas computarizados basados en probabilidad de matrices, los cuales incluyen pruebas fenotípicas para un mayor número de cepas, y métodos moleculares tal como: enzimología, serología, composición de ácidos grasos celulares, patrones proteínicos electroforéticos, ribotyping, hibridización DNA-DNA, fingerprinting DNA-PCR y análisis de la longitud del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) han ido ganando aceptación, ya que ellos han ofrecido mejores resultados en el caso de identificación de microorganismos a nivel de especies (Shahnaz *et al.*, 2000). Los métodos moleculares pueden incluir un paso de enriquecimiento convencional para recuperar las células dañadas y permitir a posibles aislados obtenerse en cultivo puro para su subsecuente tipificación (Murinda *et al.*, 2004).

En otro estudio desarrollado se describió un método combinado de PCR–ELISA el cual era altamente sensible y específico para la identificación de *C. jejuni* y *C. coli* (Sails *et al.*, 2002). También Cloak *et al.*, (2001), propusieron un nuevo método rápido para productos cárnicos, en donde se utilizaba un período de enriquecimiento selectivo de 24 horas en el medio *Campylobacter* Enrichment Broth (CEB) para posteriormente hacer la confirmación de la presencia de campylobacterias por PCR. Este método involucraba el empleo de una membrana de policarbonato, en la cual se pegaban las bacterias, para posteriormente hacer una extracción del DNA de estas. El método así desarrollado tomó el nombre de PCR-SA (donde las ultimas iniciales proviene de “Surface Adhesion”) y se mencionó que podía detectar 0.6 UFC y los resultados se obtendrían en 29 horas.

Wong *et al.*, (2004), desarrollaron un método rápido que combinaba el empleo de un medio de enriquecimiento con una sistema de detección por PCR, para la identificación de *C. jejuni*, *C. coli* y otras campylobacterias termofílicas, para muestras de lavados de paquetes de pollo. La sensibilidad del método fue similar a la obtenida por procedimientos convencionales de plaqueo, pero cuando fue empleado en combinación con un método de Numero Mas Probable (NMP) pudo detectar 6 NMP/100 ml de lavado. La validación del método con 50 muestras de pollo demostró que la versatilidad de este método en los estudios microbiológicos podría proporcionar datos para tomar decisiones y evaluar riesgos.

Recientemente, se realizó un estudio comparativo de tres medios de enriquecimiento selectivo (Caldo Preston, Mueller–Hinton y Bolton), así como dos métodos de extracción de DNA (empleando resinas e hirviendo el medio con las células). Los resultados mostraron mejores niveles de recuperación con 20 horas de enriquecimiento en caldo Bolton, seguido de una extracción de DNA por medio de resinas. Este método probado con 68 muestras de lavados de pollo naturalmente contaminado, mostró una sensibilidad del 97.5% y una especificidad del 100% cuando

fue comparado con el método bacteriológico estándar (ISO 10272) (Josefsen *et al.*, 2004).

5.7 Medios de Cultivo empleados para el Aislamiento de Campylobacterias.

El desarrollo del medio de Skirrow fue la pieza clave para el estudio exitoso de las campylobacterias termotolerantes. Este medio permitió proporcionar evidencias para relacionar entre la enfermedad y la contaminación de alimentos, especialmente el pollo. Las placas de agar Skirrow contienen peptonas como fuente de nutrientes, sangre de caballo lisada y antibióticos para evitar el crecimiento de otros microorganismos. Estos componentes son la base de la mayoría de los medios para *Campylobacter* que actualmente se emplean. Las placas son incubadas en atmósfera microaerofílica (75% nitrógeno, 10% de dióxido de carbono y 5% de oxígeno) y a una temperatura elevada de 42 – 43°C (Baylis, 2000).

5.7.1 Componentes de los medios

Todo los medios diseñados para *Campylobacter* contienen peptonas y antibióticos, la mayoría contienen sangre lisada así como agentes secuestrantes de oxígeno para evitar los efectos tóxicos de las especies reactivas del oxígeno como, el peróxido de hidrógeno y el superóxido.

Fuente de Nutrientes

Como las campylobacterias no fermentan carbohidratos, estos han sido retirados de algunas formulaciones como la propuesta por Tran (Tran, 1998), en su lugar las peptonas han sido incluidas en los medios como fuentes de nutrientes o bien algún componente con un alto contenido proteínico tal como el extracto de carne, de levadura, hidrolizado de caseína, etc. Las concentraciones empleadas de estos componentes no exceden los 10 g/L. Ejemplos de medios que los incluyen son el caldo Preston, Exeter, etc. Algunos como el Caldo Bolton y el Caldo Tran emplean además, intermediarios del ciclo de ácido de Krebs, tal como el ácido pirúvico y el ácido alfa cetoglutarico, los cuales ayudan a activar el metabolismo de las células estresadas, ayudando así a su recuperación.

Sangre

Muchos medios para *Campylobacter* emplean sangre en una concentración que va desde el 5 al 7% (v/v) con el fin de neutralizar los compuestos tóxicos de oxígeno, tal como el peróxido de oxígeno, que se pueden formar cuando los medios se exponen a la luz. Además la sangre neutraliza los antagonistas del trimetoprim (Walmsley and Karmali, 1989) algunas formulaciones han excluido a la sangre de su formulación, debido a que este componente eleva el costo del medio, además que su composición varía de lote a lote. Ejemplo de esto es el Medio Tran (Tran, 1995) el cual empleaba Oxyrase®, una enzima que rompía las especies reactivas de oxígeno. Posteriormente Tran propuso una formulación alternativa sin el empleo de Oxyrase®, añadiendo en su lugar carbón activado lo que permitió incubar el medio en condiciones aeróbicas normales, solo cuidando que se utilizara no más de un 16% de espacio de cabeza (espacio de aire entre el medio y el tapón). Esta nueva formulación fue comparada con el Caldo Bolton y se obtuvieron resultados similares, sin embargo la eficiencia varió de acuerdo con el alimento probado (Tran, 1998).

Antibióticos

La adición de antibióticos en los medios de aislamiento es importante para la recuperación de *Campylobacter* ya que permite la inhibición del crecimiento de la flora acompañante. Estas bacterias son resistentes a varios antibióticos: Vancomicina (inhibe cocos Gram positivos), polimixina B (inhibe enterobacterias y *Pseudomonas spp.*), Trimetoprim (inhibe a *Proteus spp.* y cocos Gram positivos) y cefalosporinas (inhiben a *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Pseudomonas aureginosa*, algunas bacterias dentro del género *Proteus spp.*, *Yersinia enterocolitica*). La rifampicina fue sustituida por la vancomicina en el Caldo Preston, ya que estudios posteriores encontraron que la rifampicina tenía un efecto inhibitorio para las células estresadas de *C. jejuni* (Nachamkin *et al.*, 2000). Sustancias que inhiben el crecimiento de hongos y levaduras generalmente son incluidas en las formulaciones. Recientemente ha sido demostrado que el empleo de la cycloheximida como antifúngico es demasiado tóxico como para incluirse en los medios. Martin *et al.*, (2002) propusieron el empleo de la anfotericina B

como sustituto de la cicloheximida. De acuerdo con sus experimentos se obtuvo el mismo nivel de inhibición, pero sin efectos tóxicos.

Sin embargo, algunos antibióticos que son comúnmente empleados en los medios pueden afectar la recuperación de algunas especies o cepas. La idea general que se tiene es que dependiendo de la combinación de antibióticos que se empleen, se puede tener una o varias especies o bien otras. Por ejemplo Nachamkin *et al.*, (2000) reportaron que la cefalotina, colistina y la polimixina B inhibían algunas especies de *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus subsp fetus*, *C. jejuni subsp doylei* y *C. upsaliensis*.

La adición demorada de antibióticos puede aumentar la recuperación de campylobacterias. Por ejemplo, en algunos protocolos los caldos son incubados por 4 h a 37°C seguido de la adición de antibióticos y entonces son transferidos a una atmósfera microaerofílica por 44 h a 42°C (Goosens and Bultzer, 1992).

5.7.2 Objetivos del pre-enriquecimiento

Las muestras de alimentos y las provenientes del medio ambiente, tal como las muestras de agua, están contaminadas usualmente con bajos números de campylobacterias. La incorporación de procedimientos de pre-enriquecimiento en los protocolos se ha encontrado que aumentan la recuperación de *Campylobacter* de la mayoría de los tipos de muestras y generalmente este tipo de procedimientos es recomendado para el análisis de alimentos, agua y otras muestras provenientes del medio ambiente (Bolton *et al.*, 1984); así como para muestras fecales de pacientes que están actualmente recibiendo o recibieron recientemente un tratamiento con antibióticos.

El pre-enriquecimiento usualmente empieza con un procedimiento de resucitación el cual es incluido para reparar el daño ocasionado a las células por el secado, calentamiento, presencia de pocos nutrientes, congelación y/ o radicales libres de oxígeno. Probablemente el procedimiento de resucitación más ampliamente usado consiste de 4 h de incubación a 37°C, para después los cultivos ser transferidos a 42°C.

Es recomendado que la resucitación este limitada a 4 h para prevenir el crecimiento en exceso de los microorganismos contaminantes (Donnison, 2003).

Las formulaciones de caldos de pre-enriquecimiento que se emplean comúnmente para aislar a *Campylobacter* de diversas fuentes son: Caldo Preston, Caldo Exeter, Caldo Bolton, Caldo CEB (*Campylobacter* Enrichment Broth), Caldo Park & Sanders y Caldo Tran.

Caldo Preston

Bolton y Robertson en 1982 encontraron que el agar de Skirrow era insuficiente para recuperar campylobacterias de muestras de animales y del medio ambiente y formularon al medio Preston como una alternativa efectiva. Este medio puede ser empleado como caldo para pre-enriquecimiento o bien como agar para el aislamiento selectivo de colonias. Este medio esta constituido de un caldo nutritivo que no incluye extracto de levadura, un antagonista conocido del trimetoprim y también sangre lisada de caballo al 5% (v/v). Los antibióticos empleados son: Polimixina B (5 IU/ ml), Rifampicina (10 µg/ ml), Trimetoprim (10 µg/ ml) y Cycloheximida (100 µg/ ml). La incubación se lleva a cabo en atmósfera microaerofílica a 42°C. La utilización del caldo Preston está especificada en los métodos de la International Standards Organisation (ISO, 1995).

Una modificación a la formulación original de Preston fue la inclusión de piruvato de sodio, metabisulfito de sodio y sulfato ferroso (FBP) para mejorar el secuestro de especies reactivas del oxígeno. La inclusión de FBP permitió la incubación aerobia y también el almacenamiento del caldo por más de 7 días a 4°C. Para llevar una incubación aeróbica empleando este caldo, los contenedores se deben cerrar muy bien y tener un espacio de cabeza de menos de 1 centímetro. Actualmente, la formulación del caldo Preston más el suplemento de FBP es la mayormente utilizada. Los componentes del caldo Preston están disponibles comercialmente y constan de: caldo deshidratado, el suplemento FBP y de antibióticos (en donde la cycloheximida ha sido reemplazada por la anfotericina B a una concentración de 10 mg/ L) (Donnison, 2003).

El protocolo que utiliza este medio incluye un pre-enriquecimiento con incubación en atmósfera normal a 37°C por 4 h para permitir la resucitación de las células dañadas, seguido de la incubación a 42°C por 48 h. Bolton desarrolló un método de “número más probable” basado en el Caldo Preston de enriquecimiento y este método fue capaz de detectar campylobacterias en concentraciones tan bajas como 10 CFU/ 100 ml (Barrios-Velázquez, 1999).

Recientemente Scates *et al.*, (2003) encontraron que las temperaturas de incubación empleadas para el medio Preston “seleccionan” ciertos genotipos de *C. jejuni*. Ellos recomendaron que para detectar un amplio rango de genotipos, las muestras deben ser incubadas tanto a 37°C como a 42°C.

Caldo Bolton

El Caldo Bolton o Fórmula Bolton es recomendada en los protocolos elaborados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos, para la recuperación de campylobacterias de un amplio rango de tipos de muestras. El medio base y los suplementos están comercialmente disponibles (FDA, 2001).

Este medio contiene peptona y extracto de levadura, ácido alfa cetoglutámico, piruvato de sodio, metabisulfito de sodio y hemina. La hemina es incluida para superar el antagonismo producido por la inclusión de extracto de levadura. El piruvato de sodio y el metabisulfito de sodio son incluidos en la fórmula para permitir una incubación aeróbica, la función del carbonato de sodio es proporcionar dióxido de carbono durante el crecimiento (Donnison, 2003). El medio completo también incluye sangre lisada de caballo al 5% (v/v) y los siguientes antibióticos: cefoperazona (20 µg/ ml), vancomicina (10 µg/ ml), trimetoprim (10 µg/ ml) y cycloheximida (50 µg/ ml).

De acuerdo con un estudio realizado por Baylis *et al.*, (2000), el Caldo Bolton fue mejor para aislar a *Campylobacter* en comparación con el Caldo Preston y el Caldo de Enriquecimiento *Campylobacter*; así mismo este medio mostró una buena tasa de

crecimiento de diversas cepas de *Campylobacter* y una buena inhibición de bacterias competidoras. El principal microorganismo competidor aislado fue *Pseudomonas spp.*

En los protocolos propuestos por la FDA, se requiere una atmósfera microaerofílica para la incubación, lo cual es resuelto empleando sistemas comerciales de Campy Gas Pack o empleando una mezcla de gases (oxígeno al 5%, dióxido de carbono al 10% y nitrógeno al 75%).

Para la mayoría de las muestras, el período de resucitación consiste de una incubación por 4 h a 37°C, después de este período los tubos son transferidos a 42°C. El proceso de resucitación es modificado para el análisis de mariscos, en donde este se realiza por 3 horas a 30°C, para posteriormente incubarse por 2 h a 37°C. Después de la resucitación, los caldos de enriquecimiento son transferidos a 42°C por 28 – 29 h, para la mayor parte de las muestras, pero este se extiende por 44 h para productos lácteos y 48 h para mariscos. (FDA BAM, 1998).

De acuerdo con Tran (1998) el método de enriquecimiento propuesto en el BAM es superior al propuesto por Park & Sanders, el Doyle–Roman y los de Bolton. Sin embargo, igual que los otros requiere de sangre, tiempo, es laborioso y requiere de equipo de especial para llevar a cabo la incubación de las muestras (Tran, 1998).

Caldo de Enriquecimiento *Campylobacter* (CEB)

Este medio fue propuesto por Martín en 1983. La efectividad de este medio se probó con muestras fecales humanas, aves y de bovinos. Ellos compararon el índice de aislamiento empleando su medio de enriquecimiento con un plaqueo directo por duplicado, el cual era realizado simultáneamente. De 380 muestras analizadas se encontró que había un 46.3% de aumento en el aislamiento de *C. jejuni* empleando este medio (Martín *et al.*, 1983). Este caldo de enriquecimiento se encuentra comercialmente disponible, tiene la misma formulación que la del Caldo Bolton y el medio completo solo varía en la sustitución de natamycina por cycloheximida en el suplemento de antibióticos.

Caldo Exeter

La fórmula del medio Exeter original fue basada en un caldo nutritivo que incluía sangre lisada de caballo al 5% (v/v). Después esta fórmula fue mejorada añadiendo agentes neutralizantes de especies reactivas del oxígeno, lo que permitió incubar este caldo aeróbicamente. Posteriormente, a la formulación anterior, se le retiró el extracto de levadura, ya que este es un antagonista del trimetoprim.

Humphrey and Cruickshank (1985) probaron la susceptibilidad de células dañadas y no dañadas de *C. jejuni* con varios antibióticos y encontraron que las células estresadas de *C. jejuni* se ven dañadas por la rifampicina y que la cefoperazona optimizaba la recuperación de *C. coli*. Estas observaciones fueron la base para los antibióticos utilizados en el medio Exeter: cefoperazona (15 µg/ ml), polimixina B (5 IU/ ml), trimetoprim (10 µg/ ml), rifampicina (10 µg/ ml) y anfotericina (2 µg/ ml).

La fórmula del Caldo Exeter es esencialmente igual a la del Caldo Preston incluyendo los suplementos de crecimiento y selectivos, más cefoperazona. El Caldo Exeter puede ser preparado a partir de los ingredientes de Preston, el suplemento FBP, de antibióticos y sangre lisada de caballo (5% v/v) añadiendo una solución esterilizada por filtración de cefoperazona (a una concentración final de 15µg/ ml). Este caldo puede obtenerse solidificado si se le agrega agar a una concentración del 1.5%.

El protocolo para un pre-enriquecimiento con Caldo Exeter consiste en una incubación aeróbica (en contenedores bien cerrados, con un espacio de cabeza de menos de 1 centímetro) por 4 h a 37°C, seguido de una incubación por 24 a 48 h a 42°C. El Caldo Exeter es utilizado por dos Procedimientos de Operación Estándar para *Campylobacter* (F21 y W8) publicados por la Agencia de Protección de Salud del Laboratorio de Servicios de Salud Pública (PHLS) de Reino Unido (Swaminathan *et al.*, 2000).

En un trabajo realizado por Newell *et al.*, (2001) en donde se estudiaban las cepas de campylobacterias en las piezas de pollo durante el proceso, se empleo este medio. Dentro de sus resultados encontraron que en algunos casos, los mismos tipos de bacterias aislados de hisopados rectales, contaminaron el producto al final del proceso. Sin embargo, la metodología del de aislamiento, por ejemplo el uso de un plaqueo directo o el uso de un pre-enriquecimiento, afectó la distribución de las bacterias. También concluyeron que algunos tipos sobreviven mejor que otros, y que por lo tanto la resistencia al estrés durante el proceso varía de una cepa a otra.

Caldo Park & Sanders

La fórmula base del Caldo de Park & Sanders es el caldo Brucella, el cual contiene peptonas, glucosa, extracto de levadura, piruvato de sodio y metabisulfito de sodio. Antes de la inoculación de la muestra, es añadida sangre lisada de caballo a una concentración final del 5% v/v y dos antibióticos: vancomicina y trimetoprim (ambos añadidos a una concentración de 10 mg/ml). El periodo inicial de incubación es de 4 horas a 32°C, después del cual se añaden cefoperazona (32 mg/L) y cycloheximida (100 mg/L), para posteriormente transferirse a 37°C por 4 h, después son incubados a 42°C por 40 – 42 h. Los tres pasos son llevados en una atmósfera microaerofílica. El empleo de este caldo es recomendado por el ISO para muestras que han recibido un tratamiento muy estresante, como por ejemplo la congelación (ISO, 1995).

En un estudio inter-laboratorio llevado a cabo por Scotter *et al.*, (1993) el protocolo de Park & Sanders fue modificado de tal forma que la primera incubación (32°C por 4 h) fue llevada de forma aeróbica. Después de 4 h la cefoperazona y la cycloheximida fueron añadidas, y las muestras se incubaron en atmósfera microaerofílica por 2 h a 37°C. Las muestras fueron entonces transferidas a 42°C por más de 48 h. Estas variaciones del procedimiento de ISO fueron presumiblemente para reducir el costo de la atmósfera microaerofílica y permitir que los dos pasos de resucitación se llevaran a cabo en un día normal de trabajo (Ramson *et al.*, 2000).

Recientemente Josefsen *et al.*, (2004) compararon dos protocolos, el propuesto por el Comité Nórdico en Análisis de Alimentos, el cual emplea el Caldo Preston y así como el propuesto por la International Standard Organization (ISO), en el cual se emplea el caldo Park- Sanders, en la detección de campylobacterias en agua de enjuague de pollo. Para ambos protocolos, las muestras de lavados de pollo, fueron preparadas en 500 ml de agua peptonada, tal como lo recomienda el protocolo No. 6887 – 1 de ISO. Los resultados indicaron que el protocolo que emplea el caldo Preston fue superior al que usa el caldo Park – Sanders en cuanto a permitir el crecimiento de las campylobacterias.

Caldo Tran

En 1995 Tran propuso el primero de dos medios de enriquecimiento libre de sangre, los cuales se podían utilizar en condiciones aeróbicas. En esta primera formulación empleó una enzima comercialmente disponible: Oxyrase®, la cual es un agente biocatalizador reductor de oxígeno, que está compuesto de fragmentos de la membrana y sus enzimas asociadas de *Escherichia coli*. Su estudio consistió en investigar la habilidad del Caldo de Enriquecimiento *Campylobacter* (CEB) adicionado con Oxyrase® para recuperar campylobacterias de alimentos artificialmente contaminados, esto en condiciones normales de incubación. De acuerdo con sus resultados no se encontraron diferencias entre el CEB adicionado con Oxyrase® y el CEB sin esta, incubado en atmósfera microaerófila. El aumento del tiempo de enriquecimiento de 24 a 48 h no mejoró los índices de recuperación, así mismo el enriquecimiento con Oxyrase® fue costo efectivo y consumió menos tiempo (Tran, 1995).

En 1998 Tran propuso otra fórmula, en la cual la enzima Oxyrase® era sustituida con carbón activado. Los nutrientes consistían de peptonas, y derivados de estas, extracto de levadura, sulfato de hierro, piruvato de sodio, carbonato de sodio, ácido alfa cetoglutarico y carbón activado. Los antibióticos empleados fueron: cefoperazona (32 mg/L), vancomicina (10 mg/L), trimetoprim (11.4 mg/L) y cycloheximida (100 mg/L).

De nuevo esta nueva formulación incubada en atmósfera normal, con 16 – 17% de espacio de cabeza, y fue comparada con el método propuesto en el BAM/ FDA en atmósfera microaerófila, obteniéndose resultados similares. La eficiencia de esta formulación fue severamente afectada por el tipo de alimento y la cepa (Tran, 1998).

Thunberg *et al.*, (2000) describieron el acoplamiento del PCR directo después de una incubación por 48 h empleando este medio con diferentes alimentos: brócoli, hongos, cangrejo, leche y ostiones sin pasteurizar. Se determinó que la presencia de carbón activado y hierro a las concentraciones utilizadas en el caldo, inhibían la reacción de PCR. Debido a esto, fueron desarrolladas tres técnicas de extracción de DNA, de las cuales, la que empleaba una extracción con resina y columna, fue la que arrojó mejores resultados. No hubo diferencia entre los resultados de las muestras analizadas por PCR y el método tradicional. Ellos concluyen que los cultivos con un enriquecimiento de 48 horas para un posterior análisis por PCR podría ahorrar un día del tiempo requerido para la identificación presuntiva de *C. jejuni* en alimentos sospechosos.

Por lo tanto, a pesar que se cuentan con varias opciones de medios selectivos para el aislamiento de las campylobacterias, la mayoría requiere del uso de una atmósfera microaerófila de incubación, lo cual hace costoso la operación. Es una necesidad real nuevas propuestas de medios que prescindan de este tipo de incubación. Debido a lo anterior, la justificación de llevar a cabo este estudio sobre la modificación de uno de los medios que no requieren microaerofilia más ampliamente utilizados (Caldo Tran), es que podría traer como consecuencia nuevas opciones de formulaciones que harán finalmente que se lleven más investigaciones sobre las campylobacterias.

Materiales y Métodos

6.1 Aislamiento e Identificación de las cepas nativas de *Campylobacter jejuni/coli*.

Las cepas nativas de *C. jejuni/coli* fueron obtenidas a partir de animales vivos aparentemente sanos: cerdos y aves (pollos, gallinas, gallos, guajolotes) y piezas de pollo expandidas en punto de venta en diversos establecimientos en el área metropolitana.

Los muestreos para la obtención de estos especímenes se seleccionaron de acuerdo con el siguiente criterio: los sitios muestreados deberían estar separados geográficamente más de 500 metros y se aseguró que entre estos lugares no existiera intercambio de cualquier material que pudiera actuar como medio de transporte para las campylobacterias: huevos, animales, material de cualquier tipo, etc y en la mayoría de los casos los dueños de los animales manifestaron no conocerse. Los lugares incluidos fueron las colonias, Ciudad Satélite del Norte y Emiliano Zapata, y los poblados Los Villarreales y Los Morales del municipio de Salinas Victoria N. L. y la colonia Raúl Caballero del municipio de Gral. Mariano Escobedo N. L. En el caso de los muestreos en establecimientos comerciales se obtuvieron en los municipios de San Nicolás de los Garza y una tienda especializada de piezas de pollo en Salinas Victoria N. L. En estos lugares se adquirió una pieza de pollo (pechuga) y esta se transportó sobre hielo, procesándose lo más rápidamente posible.

Para el aislamiento de las cepas nativas; en el caso de los animales se tomaron muestras rectales. Para las muestras de alimentos, se cortaba una porción de 1.4 gramos únicamente de la piel, con ayuda de tijeras previamente desinfectadas. Los hisopos o la piel se colocaba en tubos de 16 x 150 mm que contenían 13.1 ml de medio de enriquecimiento aeróbico sin sangre (BFEB o Caldo Tran). Los tubos fueron incubados por 24 h a 42°C en atmósfera normal. En tanto que los de muestras de piel fueron sometidos a un proceso de “resucitación”, el cual consistía en una incubación de 4 h como máximo a 37°C, para finalmente pasar los tubos a una incubadora a 42°C por 24 h más. Posteriormente, los tubos fueron homogenizados suavemente para tomar una

alícuota (100 µL) y sembrarla en cuatro cuadrantes sobre una placa de agar CEFEX en el caso de las muestras obtenidas de hisopados o Agar Skirrow para las de piel de pollo. Las placas, fueron incubadas de forma invertida a 42°C, en una atmósfera con 10% de CO₂ por espacio de 48 h.

Concluido este período, a las posibles colonias sospechosas de campylobacterias (rosas, convexas, brillosas, y sobre placas recién preparadas, presentaban un efecto llamado colonia nadadora o “swamer”, debido a la alta cantidad de agua así como a la movilidad de las campylobacterias) se les tomaba una porción de la colonia para observarla en fresco con microscopio de contraste de fases. Las colonias que mostraron la morfología y movimientos típicos (sacacorcho) fueron resembradas para comprobar que el cultivo estuviera puro.

La identificación final de las bacterias se realizaba por medio de PCR múltiple (Reacción en Cadena de la Polimerasa) empleando el set de tres pares de primers o iniciadores propuestos por Cloak y Fratamico (2002). Los detalles de este procedimiento, se explican en un apartado más adelante.

6.2 Cepas de referencia

Las cepas utilizadas como referencia fueron las siguientes: *Campylobacter jejuni* 5653 (aislada de cerdo), donada por la Dra. Irene V. Wesley del Animal Disease Center of USDA en Ames Iowa, E.U.A, y las donadas por el Dr. Guillermo Ruiz Palacios del Instituto Nacional de Salud Publica y Nutrición, Salvador Zubirán en México D. F.: *C. jejuni* 15 sp, *C. jejuni* 50 sp, *C. jejuni* 57sp (aislados humanos sin presentar cuadro clínico), *C. jejuni* 193 ip (aislado humano de cuadro clínico diarreico, no productor de toxina), *C. jejuni* 180 ip, *C. jejuni* 238 ip, *C. jejuni* 173 ip (aislados humanos que presentaban un cuadro diarreico y que son productoras de toxina).

Se corroboró la identidad de estas cepas mediante PCR (descrito posteriormente). Finalmente las cepas, tanto las de referencia como las nativas, fueron almacenadas en

Caldo Infusión Cerebro Corazón (ICC) adicionado con 0.6% de Extracto de Levadura y glicerol al 20%, en nitrógeno líquido.

6.3 Preparación de las diversas Formulaciones.

Diversos componentes fueron empleados a lo largo de este trabajo, algunos no fueron incluidos en todas, para otros la concentración se modificaba constantemente, así que se describirá en general el orden de adición y para aquellos en los que no se mencione la concentración es porque se describirá con mas detalle en el apartado correspondiente de resultados.

Los componentes utilizados fueron los siguientes: Extracto de Carne (DIFCO) 10 g/L, Peptona de Caseína (DIFCO) 10 g/L, Cloruro de Sodio (Baker) 5 g/L, Hidrolizado de Caseína (Sigma) 6 g/L, Extracto de Levadura (EL)(DIFCO), 6 g/L, Sulfato Férrico (Baker) 0.5 g/L, Metabisulfito de sodio (Sigma), Piruvato de sodio (Sigma) 0.75 g/L, Carbonato de Sodio (Baker) 1 g/L, Ácido Alfa Cetoglutárico (Sigma) 1 g/L, Tioglicolato de sodio (Sigma), Fosfato Diácido de Potasio (Baker) 0.5 g/L. Todos estos componentes a excepción de los últimos dos, son los propuestos por Tran para el Blood Free Enrichment Broth o Caldo Tran para el aislamiento de las campylobacterias, así mismo todos estos componentes se podían esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Los componentes que requerían de esterilización por filtración eran los antibióticos [Vancomicina (Sigma) 10 mg/L, Trimetoprim (Sigma) 10 mg/L, Cefoperozona (Sigma) 40 mg/L, Cicloheximida (Sigma) 100 mg/L,] Hemina 10 mg/L y el ácido ascórbico (Baker) 0.1%. Cabe señalar que las sustancias antimicrobianas y su concentración también fueron las que originalmente propuso Tran para el medio.

6.4 Preparación y Dilución de la Cepa de Referencia.

A partir de un cultivo de reserva, el cual se sembraba semanalmente, se tomaron 100µL del medio homogenizado y se sembraron en 5 ml de Infusión Cerebro Corazón (ICC) adicionado con EL al 0.6%. Los tubos se incubaron en atmósfera microaerofílica por 24 h. Posteriormente se tomaron 200µL del medio homogenizado y

se sembraron por extensión con ayuda de una varilla de Driglasky en placas de Agar Brucella adicionado con sangre desfibrinizada al 5 – 10%. Estas se incubaron de forma invertida por 24 h, en atmósfera microaerofílica. Finalizado este tiempo, se hicieron lavados a la superficie de la placa, con ayuda de una varilla y una solución de agua peptonada (preparada con Cloruro de Sodio (Beaker) 5 g /L, Peptona de Caseína (DIFCO) 10 g /L y agua destilada 1000 ml). Las células se cosecharon en un tubo Eppendorf estéril. Posteriormente, se obtuvo el paquete celular por centrifugación (15 min a 6000 r.p.m) el cual fue resuspendido con agua peptonada (1000µL totales). Se hicieron diluciones seriadas empleando medio de transporte de Cary – Blair (DIFCO) adicionado con Peptona de Caseína al 1%. Las series así preparadas se utilizaban no después de 1 h de realizadas para los ensayos de contaminación artificial de alimentos.

6.5 Cinéticas de Crecimiento

A partir de un tubo de reserva, se tomaron 100µL y se depositaron en 5 ml de caldo ICC adicionado con EL al 0.6%. Los tubos se incubaron en atmósfera de CO₂ al 10% por 24 h. Posteriormente, se tomaron 70µL del medio homogenizado y se colocaron en tubos que contenían 7 ml de ICC + EL al 0.6% y 7 ml de las formulaciones 7, 8, 9, 10 y 11. Los tubos se homogenizaban por medio de siete o nueve agitaciones en vórtex (Thermoline). Se tomaron alícuotas de 100µL de los tubos inoculados y se realizaron diluciones seriadas y se sembraron por extensión sobre Agar Brucella adicionado con sangre desfibrinada al 5 – 10%, con ayuda de una varilla de Driglasky. Este procedimiento se repitió a las 12, 24 y 36 horas. Para las primeras cinéticas realizadas, solo se tomaron lecturas espectrofotométricas A_{600nm} (Sequioya Turner), por lo tanto los resultados se expresaron como el cambio de absorbancia en función del tiempo, para el segundo caso (dilución y cuenta en placa), los resultados así obtenidos se expresaron como número de UFC/ml en función del tiempo.

6.6 Ensayos de Contaminación Artificial y Recuperación de Campylobacterias en Alimentos.

La realización de estos ensayos, se llevó a cabo en tres diferentes matrices alimenticias: leche sin pasteurizar, ensalada de lechuga y tomate, lista para consumir y

almejas congeladas (sin pasteurizar). Los alimentos se obtuvieron y analizaron antes de 5 h. Para contaminar los alimentos se tomaban 1.4 gramos o 1.4 mililitros de muestra y se colocaban en tubos de ensayo con tapón de rosca que contenían 13.1 ml de medio o formulación estéril a probar, Caldo Tran y Caldo Bolton y se agregaban 100µL de las diferentes diluciones de campylobacterias. Los tubos se cerraban y se incubaban, en el caso de los que contenían Caldo Bolton, en una atmósfera microaerofílica (CO₂ al 10%), en tanto que para todos los demás, se incubaban en condiciones normales. Todos los cultivos se mantuvieron a 42°C por 24 h. Pasado el tiempo, los tubos se homogenizaban suavemente, y se tomaba una alícuota de 100µL, la cual se estriaba sobre placas de Agar CEFEX (almejas) o en Agar Skirrow (para los demás). Las placas se incubaban invertidas en atmósfera de CO₂ por 48 h. Pasado el tiempo, se buscaba la presencia de colonias sospechosas en las placas sembradas a partir de tubos con diversos niveles de contaminación de campylobacterias, para determinar en que dilución ya no existía recuperación. La identificación de las colonias sospechosas se basó en las características morfológicas (rosas, convexas, de aspecto brillante, con forma de “S” al microscopio de contraste de fases, con movilidad típica de sacacorchos). En todas las ocasiones se utilizó un tubo al cual no se le inocularon campylobacterias, con el fin de comprobar que el material inicialmente no estuviera contaminado. Paralelamente se realizaban cuentas de las diferentes diluciones con las que eran inoculados los alimentos de igual forma que en las cinéticas de crecimiento, los resultados obtenidos se expresaron como UFC/ml.

6.7 Determinación del grado de contaminación de las muestras de alimentos.

Este análisis se realizó tal y como lo especifica la Normativa Oficial vigente. En este parámetro se incluyeron el recuento de organismos mesofílicos aerobios, organismos coliformes totales y fecales y el de mohos y levaduras; los cuales se llevaron a cabo de acuerdo al procedimiento de la Norma Oficial Mexicana (NOM-092-SSA1-1994, NOM-113-SSA1-1994 y NOM-111-SSA1-1994, respectivamente). La preparación y dilución de las muestras se realizó de acuerdo con la metodología de la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, los resultados obtenidos se expresaron como UFC/ ml o gramo, dependiendo del tipo de alimento empleado.

6.8 Reacción en Cadena de la Polimerasa.

6.8.1 Extracción del DNA genómico

La técnica empleada para el aislamiento de DNA fue el simple boiling method propuesto por Mohran y colaboradores (1998), el cuál consistió en someter las células a calentamiento en agua hirviendo. Inicialmente se probaron dos variantes de esta técnica, para determinar cuál era mejor en cuanto a cantidad y calidad de DNA genómico obtenido.

La técnica original consistía en los siguientes pasos: se raspaba la superficie de un cultivo celular con ayuda de un aplicador de madera estéril. El material sólido se resuspendía en 50µL de agua destilada estéril, para posteriormente llevarla a ebullición por 10 minutos. Una vez finalizado este período, el tubo se centrifugaba a 11 250 rpm por 2.5 min. Se probó una variante que consistía en extender el tiempo de ebullición por 15 min y el de centrifugación (5 min).

A partir de un cultivo de 24 – 48 h, se tomó un mililitro y se centrifugó a 6000 r.p.m. por 15 min, el paquete celular resultante se resuspendió con 50 µL de solución salina 0.85% estéril y posteriormente se llevó a ebullición y centrifugación en las condiciones ya descritas anteriormente.

La calidad y cantidad del DNA genómico obtenido fue determinado espectrofotométricamente a 280 y 260 nm respectivamente, tomando 1 µL del sobrenadante obtenido y diluyéndolo con 999 µL de agua destilada estéril. Para verificar si existía degradación del DNA obtenido se realizó una separación del producto obtenido por electroforesis utilizando una alícuota (3 µL) del material obtenido utilizando un gel de agarosa al 1.5%, aplicando 120 mV por 45 minutos. El gel se tiñó con bromuro de etidio al 0.1% para poder visualizarlo sobre un transiluminador a 245nm.

6.8.2 Condiciones de Amplificación

Para realizar el PCR se siguió el método descrito por Cloak y Fratamico (2002). Para este, la reacción fue como sigue: 5µL de templado y un volumen final de reacción

de 50µL. La concentración final para el Tris – HCl (pH 8.4) fue de 10 mM, 5.0 mM para el KCl, 1.5 mM para el MgCl₂. Se utilizaron 200 µM de cada desoxirribonucleotido y 0.40 µM de cada primer o iniciador empleado. La secuencia de los primers empleados fueron: *cadF 2B* 5'- TTG AAG GTA ATT ATA TG – 3', *cadR1B* 5'- CTA ATA CCT GTT GAA AC – 3', *col1* 5'- ATG AAA AAA TAT TTA GTT TTT GCA – 3', *col2* 5'- ATT TTA TTA TTT GTA GCA GCG – 3', *c1* 5'- CAA ATA AAG TTA GAG GTA GAA TGT – 3', *c4* 5'- GGA TAA GCA CTA GCT AGC TGA T – 3'. Las condiciones empleadas en el termociclador fueron las siguientes 4 minutos a 94°C, 30 ciclos con las siguientes condiciones 94°C 1 minuto, 52°C 1 minuto y 72°C 1 minuto, y un período final de extensión de 72°C por 5 minutos.

Los productos obtenidos de la amplificación fueron visualizados sobre un gel de agarosa al 1.5% agregando 3 µL por carril. La separación de los productos se llevó a 120mV, por 45 min. Al final el gel se tiñó en bromuro de etidio al 0.1% y se visualizó sobre un transiluminador a 245nm.

6.9. Diseño Experimental

Para evaluar si existía una diferencia significativa entre las diferentes formulaciones y los controles en el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en función del tiempo, se realizó un análisis de varianza con confiabilidad del 95%. Las cuentas obtenidas se tomaron de ensayos independientes en donde las diferencias entre una cuenta y su duplicado no eran más de 5 UFC. Así mismo también se realizó un análisis de varianza para determinar si existía alguna diferencia significativa entre la formulación que ofreciera mejores resultados con el grupo de bacterias probadas en comparación con dos medios estándares establecidos (Caldo Bolton y Caldo Tran). De esta forma se conocerá si el comportamiento de las diferentes cepas de *C. jejuni* y *C. coli* es igual o diferente en los tres medios.

Resultados

7.1 Aislamiento e Identificación de las cepas nativas de *Campylobacter jejuni/coli*.

De los sitios muestreados se obtuvieron 102 cepas, los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1
Cepas de *Campylobacter* aisladas^a

No. de aislado	Especie identificada	Origen	Lugar de aislamiento
1 – 36	<i>Campylobacter coli</i>	Aves (3)	Satélite, Salinas Victoria.
37 – 47	<i>Campylobacter jejuni</i>	Ave (1)	Satélite, Salinas Victoria.
48 – 59	<i>C. coli</i>	Pieza de Pollo	Salinas Victoria
60 – 69	<i>C. coli</i>	Cerda	Emiliano Zapata, Salinas Victoria
70 – 78	<i>C. coli</i>	Cerdo	Emiliano Zapata, Salinas Victoria
81 – 89	<i>C. coli</i>	Guajolote (Hembra)	General Escobedo
90 – 91	<i>C. coli</i>	Pieza de pollo	Centro Comercial, San Nicolás de los Garza
92	<i>C. coli/ C. jejuni*</i>	Ave de Engorda	Los Morales, Salinas Victoria.
93 – 98	<i>C. jejuni</i>	Gallina	Villarreales, Salinas Victoria.
99	<i>C. coli/ C. jejuni*</i>	Ave de Engorda	Los Morales, Salinas Victoria.
100	<i>C. coli</i>	Ave de Engorda	Los Morales, Salinas Victoria.
101	<i>C. jejuni</i>	Ave de Engorda	Los Morales, Salinas Victoria.
102	<i>C. jejuni</i>	Gallina	Villarreales, Salinas Victoria.

^a El aislamiento e identificación se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito en la página no. 34.

* Mezcla de dos especies en un mismo aislado

La confirmación de las cepas se realizó por PCR, tal como lo muestra la Figura 1.

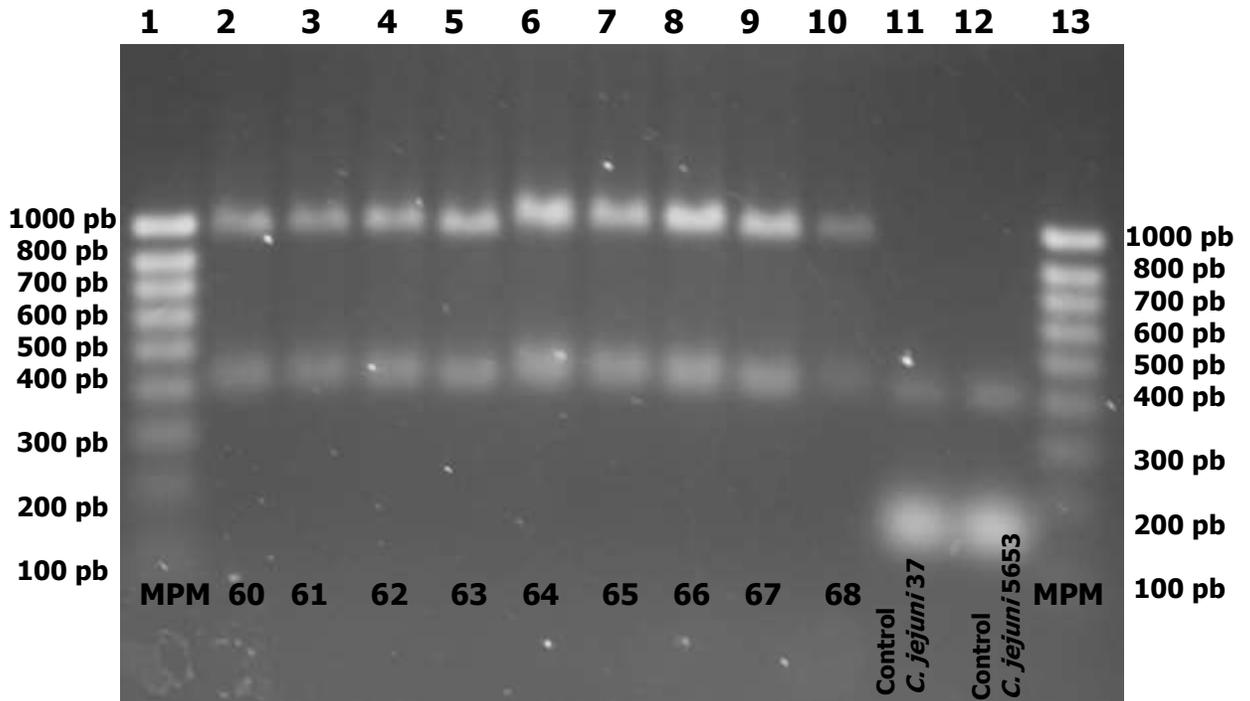


Figura 1. Productos de amplificación obtenidos de aislados nativos. Carriles 1 y 13, marcadores de talla molecular. Carriles 2 – 10, aislados de cerdo. Carril 11, *C. jejuni* 37 y carril 12 *C. jejuni* 5653.

7.2 Diseño de las Formulaciones

Las diversas formulaciones propuestas se basaron en modificar la fórmula propuesta del Blood Free Enrichment Broth o Caldo Tran, propuesto por Tran en 1998. De los componentes originales dos de ellos son lo que asegurar un ambiente microaerofílico: el carbón activado y el metabisulfito de sodio, adicionalmente se emplea un espacio de cabeza pequeño (16 – 17%).

Partiendo de esto, se realizaron modificaciones cuyo objetivo fue eliminar el carbón activado debido a que este componente impide el empleo de este medio con otras técnicas tal como algunas de biología molecular.

Como son muchos componentes y lo más importante es resaltar los cambios que se hicieron, aquellos que no fueron modificados y se mantuvieron constantes se les llamó como componentes de la “Estructura Básica”. Esta estructura esta compuesta de la siguiente manera:

- Extracto de Carne 10 g/L
- Peptona de Caseína 10 g/L
- Cloruro de Sodio 5 g/L
- Hidrolizado de Caseína 6 g/L
- Extracto de Levadura (EL) 6 g/L
- Piruvato de sodio 0.75 g/L
- Carbonato de Sodio 1 g/L
- Ácido Alfa Cetoglutárico 1 g/L
- Vancomicina 10 mg/L
- Trimetoprim 10 mg/L
- Cefoperozona 40 mg/L
- Cicloheximida 100 mg/L

Se prepararon en total 20 formulaciones tal como se especifican en la tabla 2.

TABLA 2

Formulaciones propuestas para el medio de cultivo

FORMULACIÓN	COMPONENTES
1	Estructura básica Sulfato Férrico 0.5 g/L Metabisulfito de sodio 0.75 g/L

FORMULACIÓN	COMPONENTES
2	Estructura básica Sulfato Férrico 0.5 g/L Metabisulfito de sodio 1 g/L
3	Estructura básica Sulfato Férrico 0.5 g/L Metabisulfito de sodio 1 g/L Tioglicolato de sodio 0.5 % Aceite mineral
4	Estructura básica Sulfato Férrico 0.5 g/L Metabisulfito de sodio 1 g/L Tioglicolato de sodio 0.05 % Ácido ascórbico 0.1%
5	Estructura básica Sulfato Férrico 0.5 g/L Metabisulfito de sodio 1 g/L Tioglicolato de sodio 0.05%
6	Estructura básica Hemina 10 mg/L Metabisulfito de sodio 1 g/L Ácido ascórbico 0.1% Tioglicolato de sodio 0.05% Fosfato Diácido de Potasio 0.5 g/L
7	Estructura básica Hemina 10 mg/L Metabisulfito de sodio 1 g/L Tioglicolato de sodio 0.05% Fosfato Diácido de Potasio 0.5 g/L
TABLA 2 (continuación)	
TABLA 2 (continuación)	

FORMULACIÓN	COMPONENTES
8	Estructura básica Sulfato Férrico 0.5 g/L Metabisulfito de sodio 1 g/L Tioglicolato de sodio 0.10%
9	Estructura básica Sulfato Férrico 0.5 g/L Metabisulfito de sodio 1 g/L Tioglicolato de sodio 0.13%
10	Estructura básica Sulfato Férrico 0.5 g/L Metabisulfito de sodio 1 g/L Tioglicolato de sodio 0.15%
11	Estructura básica Sulfato Férrico 0.5 g/L Metabisulfito de sodio 1 g/L Tioglicolato de sodio 0.17%
12	Estructura básica Sulfato Férrico 0.5 g/L Metabisulfito de sodio 1 g/L Tioglicolato de sodio 0.19%
13	Estructura básica Sulfato Férrico 0.5 g/L Metabisulfito de sodio 1 g/L Tioglicolato de sodio 0.20%
14	Estructura básica Sulfato Férrico 0.5 g/L Metabisulfito de sodio 1 g/L Tioglicolato de sodio 0.25%
TABLA 2 (continuación)	
FORMULACIÓN	COMPONENTES

15	Estructura básica Sulfato Férrico 0.5 g/L Metabisulfito de sodio 1 g/L Tioglicolato de sodio 0.30%
16	Estructura básica Sulfato Férrico 0.5 g/L Metabisulfito de sodio 1 g/L Tioglicolato de sodio 0.50%
17	Estructura básica Sulfato Férrico 0.5 g/L Metabisulfito de sodio 1 g/L Tioglicolato de sodio 0.55%
18	Estructura básica Sulfato Férrico 0.5 g/L Metabisulfito de sodio 1 g/L Tioglicolato de sodio 0.59%
19	Estructura básica Sulfato Férrico 0.5 g/L Metabisulfito de sodio 1 g/L Tioglicolato de sodio 0.70%
20	Estructura básica Sulfato Férrico 0.5 g/L Metabisulfito de sodio 1.5 g/L Tioglicolato de sodio 0.75%

La forma de evaluación de las formulaciones se realizó de tres maneras distintas, buscando el mejor método de medición de la efectividad de aislamiento: en un principio la capacidad se probaba por comparación directa con el medio Tran, en muestras naturalmente contaminadas. Posteriormente esta forma de evaluación fue sustituida por mediciones espectrofotométricas o cuentas de microorganismos vivos empleando las

diferentes formulaciones y controles. Finalmente la capacidad de aislamiento se midió haciendo ensayos de recuperación en donde se inoculaban números conocidos de campylobacterias. Las formulaciones se iban modificando para tratar de recuperar bajos números de unidades formadoras de colonias, empleando un grupo heterogéneo de campylobacterias.

Inicialmente a las formulaciones propuestas 1, 2, y 3 se les midió su capacidad para poder aislar campylobacterias de matrices complejas naturalmente contaminadas, tal como la piel de pollo.

Existen algunas variantes que se probaron para una misma formulación, tal como en la formulación 1, donde se utilizó la incubación en una atmósfera de CO₂ al 10% y aeróbica (21% O₂). Encontramos que en atmósfera con alto contenido de CO₂ si tenía esa capacidad de aislamiento, mas no cuando se utilizaba atmósfera normal. Cabe señalar que en todos los casos se utilizó como control el medio Tran completo.

Como uno de los objetivos era desarrollar un medio que no empleara incubación microaerofílica, se probaron diferentes componentes con el fin de eliminar el carbón activado de la fórmula original del propuesto por Tran. Debido a los resultados anteriores, se decidió aumentar la concentración del metabisulfito de sodio, apareciendo la fórmula 2 (F2). Sin embargo, con este medio, no fue posible obtener los mismos resultados en comparación con el control cuando se incubaban los tubos en atmósfera normal (aislamiento de campylobacterias). Una variante que se probó con esta F2 fue ajustar el espacio de cabeza de un 10% a un 5%; pero tampoco con ese cambio se obtuvieron resultados satisfactorios.

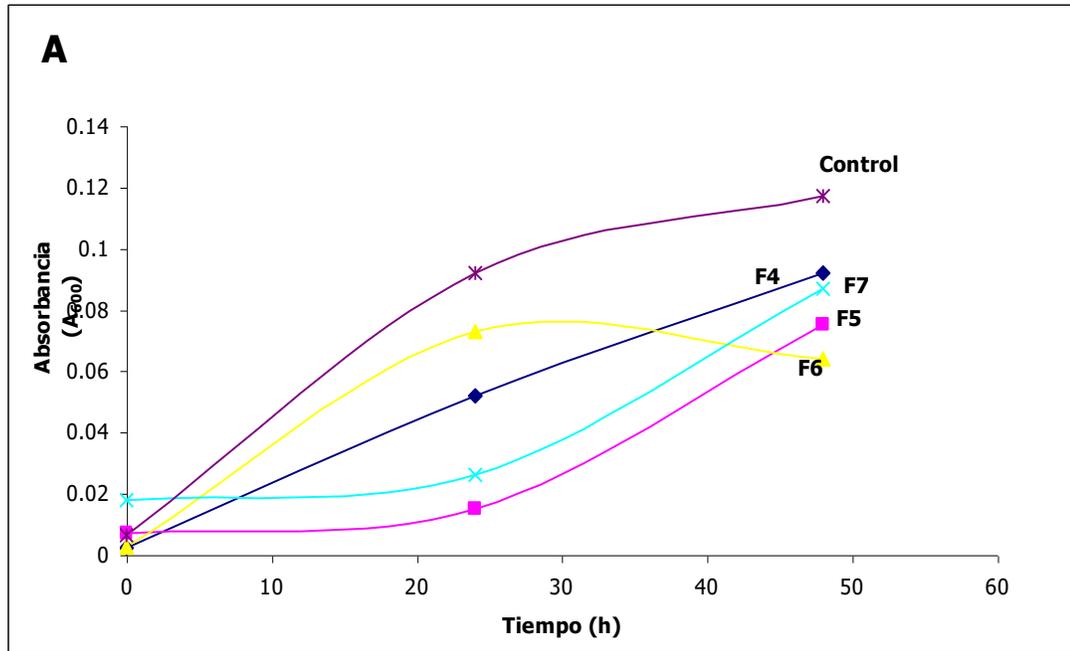
Nuevamente fue necesario modificar el medio y esta consistía en la adición de un agente reductor, tal como el tioglicolato de sodio al 0.5%, el uso de una capa de aceite mineral (F3) y un espacio de cabeza del 5%. En este caso los resultados obtenidos fueron satisfactorios, tanto el control como la F3 permitieron el aislamiento de campylobacterias de piel de pollo.

Sin embargo se decidió eliminar el empleo de aceite mineral, debido a que su uso hacía difícil y tediosa la manipulación del material, existía más probabilidad de contaminación cruzada, costos etc. Se probó una modificación en donde se eliminó el aceite mineral. Nuevamente los resultados obtenidos no mostraron diferencia entre el control y la F3.

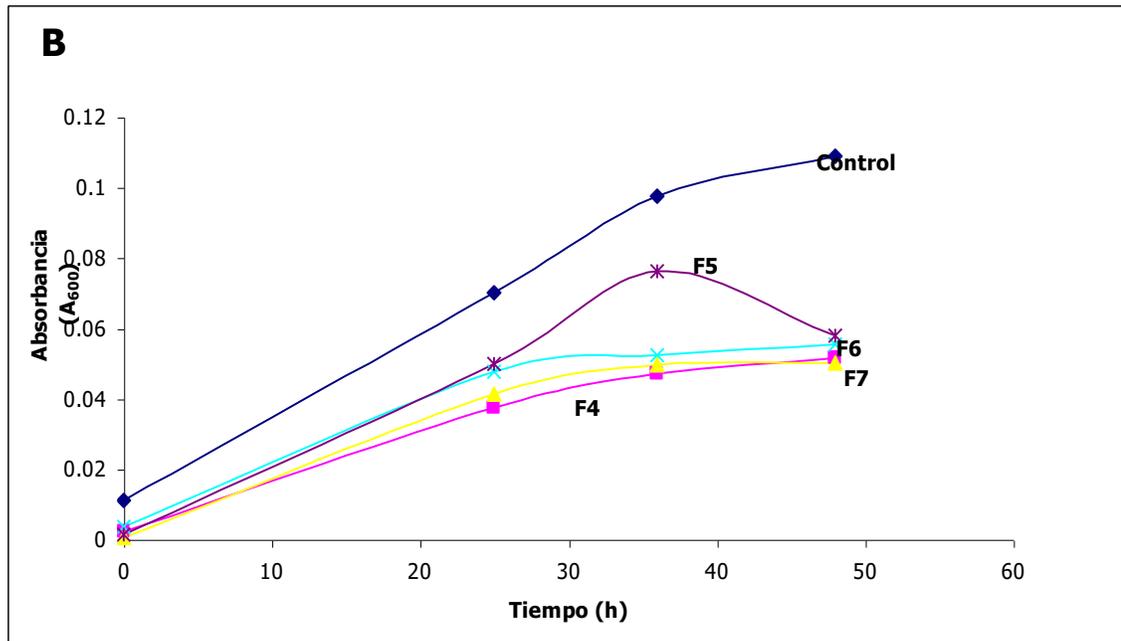
Aunque la concentración empleada inicialmente de tioglicolato de sodio fue del 0.5%, se decidió determinar la concentración mínima requerida para lograr el aislamiento de campylobacterias. Para esto probamos la F4 con una concentración de tioglicolato de sodio del 0.05%, la cual es comúnmente empleada en los medios de cultivo de algunos microorganismos anaerobios. Cuando utilizamos esta formulación se realizaron las cinéticas de crecimiento para que, en una segunda fase, probar la mejor formulación con diversos alimentos.

Utilizando esta formulación analizamos si permitió el mantenimiento o desarrollo de *C. coli/jejuni* en el tiempo. Para esto se realizaron curvas de crecimiento en donde se monitoreaba la densidad óptica de los cultivos en función del tiempo. Además se probaron dos fuentes de hierro: hemina y sulfato de hierro y dos agentes reductores: tioglicolato de sodio y ácido ascórbico. En todos los casos se utilizó un espacio de cabeza de 5% o menos.

Cuando analizamos las formulaciones 4, 5, 6 y 7, se realizaron cinéticas de crecimiento monitoreando la densidad óptica del crecimiento de las cepas *C. coli* 19 y *C. jejuni* 37, encontrando que existían diferencias entre especies: la mejor formulación para *C. coli* fue la F6, mientras que para *C. jejuni* fue la F5. El control empleado fue el medio ICC + EL al 0.6%. La figura 2 muestra los resultados obtenidos.



F4: FeSO₄ s/ aa, F5: FeSO₄ c/ aa, F6: Hemina + s/aa, F7: Hemina + c/aa, control ICC + EL 0.6%



F4: FeSO₄ s/ aa, F5: FeSO₄ c/ aa, F6: Hemina + s/aa, F7: Hemina + c/aa, control ICC + EL 0.6%

Figura 2. Curvas de crecimiento de *C. coli* 19 (A) y *C. jejuni* 37 (B) utilizando las formulaciones F4, F5, F6 y F7. Los cultivos se incubaron en atmósfera normal (21% oxígeno).

Se decidió eliminar el uso de ácido ascórbico como componente de las formulaciones, debido a que posee un poder reductor inferior al del tioglicolato o el metabisulfito de sodio.

Cuando analizamos las cuentas viables de la F4 y la F6 el análisis estadístico mostró que existían diferencias significativas entre estas fórmulas, tal como lo muestra la tabla 3.

Tabla 3

Cuentas viables de *Campylobacter* en las formulaciones F4 y F6^a

Tiempo (Horas)	Control (UFC/ml)	F4 (UFC/ml)	F6 (UFC/ml)
0	1.00E+05 ^a	1.60E+05 ^b	1.35E+05 ^c
12	8.00E+06 ^a	4.00E+07 ^b	1.00E+06 ^c
24	2.60E+08 ^a	2.00E+07 ^b	3.00E+07 ^c
36	8.00E+08 ^a	1.00E+08 ^b	2.00E+06 ^c
48	1.00E+08 ^a	9.00E+07 ^b	1.00E+07 ^c

^a Cuentas obtenidas a partir de tubos inoculados con cepas de *C. jejuni* 37 con 24 horas de activación. Las formulaciones empleadas fueron la F4 y la F6 (pag. 38), el control fue ICC + EL 0.6%. En cada tiempo de muestreo, se tomaron 100µL de muestra, se diluyó en agua peptonada estéril, para posteriormente sembrarse por extensión sobre agar brucella adicionado con 5 – 10 % de sangre desfrinada. Las placas se incubaron invertidas por espacio de 48 horas, en atmósfera microaerofílica. Valores con diferentes letras en las columnas son significativamente diferentes (P< 0.05)

Basándose en los resultados obtenidos del análisis estadístico, se decidió eliminar como fuente de hierro a la hemina y utilizar sulfato de hierro, lo cual disminuyó el costo de la formulación ya que la hemina es más cara.

Se realizaron cinéticas de crecimiento con tres cepas nativas: *C. jejuni* 37, *C. coli* 19 y *C. coli* 49, con el objetivo de estudiar el desarrollo de las cepas en la F4. Los resultados obtenidos se resumen en la figura 3.

De acuerdo con los resultados obtenidos, encontramos que la formulación 4 permitía el crecimiento de las dos cepas de *C. coli* probadas, pero no así a *C. jejuni* 37; por lo que fue necesario hacer un ajuste a los componentes de la formulación. En estos ajustes, el componente que sufrió más cambios fue el tioglicolato de sodio, aunque en los ajustes finales también se modificó la concentración del metabisulfito de sodio.

Se aumentó la concentración de tioglicolato de sodio a 0.10% (F8) y se probó con las mismas cepas y dos cepas más (*C. coli* 75 y 81), los resultados obtenidos se resumen en la figura 4. En esta ocasión se encontró que se obtuvieron mejores resultados con las cepas de *C. coli* 19 y 49, las cuales crecen en forma muy parecida al control, en tanto que no resultó ser muy efectivo para las cepas 75 y 81. También se obtuvieron mejores resultados con la cepa de *C. jejuni*.

Dado que 2 cepas de *C. coli* y la de *C. jejuni* crecieron bien en la F8, el siguiente paso fue estudiar la eficiencia de esta para aislar campylobacterias a partir de alimentos. En este caso se analizó el nivel de recuperación de bacterias inoculados en la muestra, así como el nivel de contaminación presente en ella (bacterias mesofílicas aerobias, hongos y levaduras, y bacterias coliformes totales y fecales).

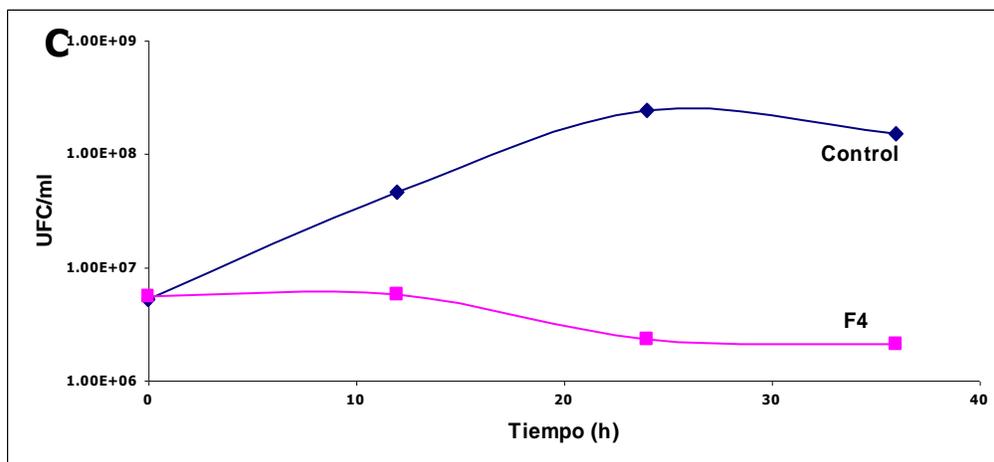
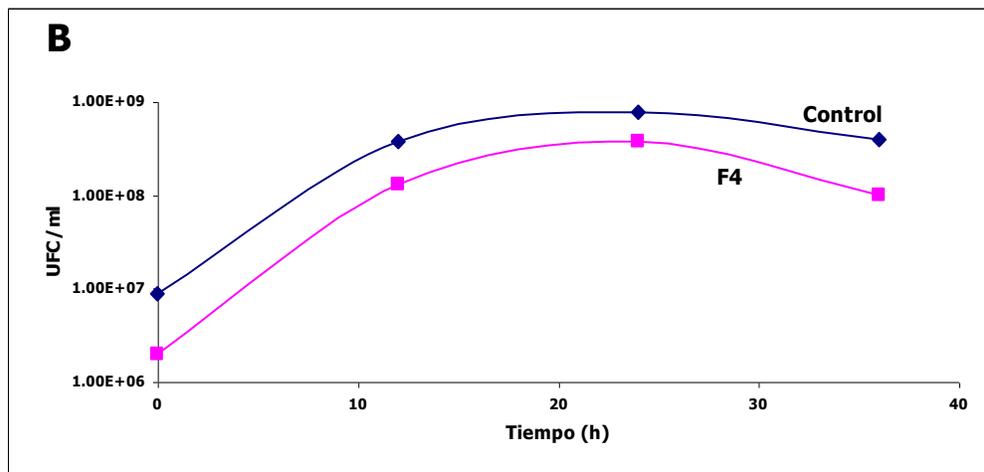
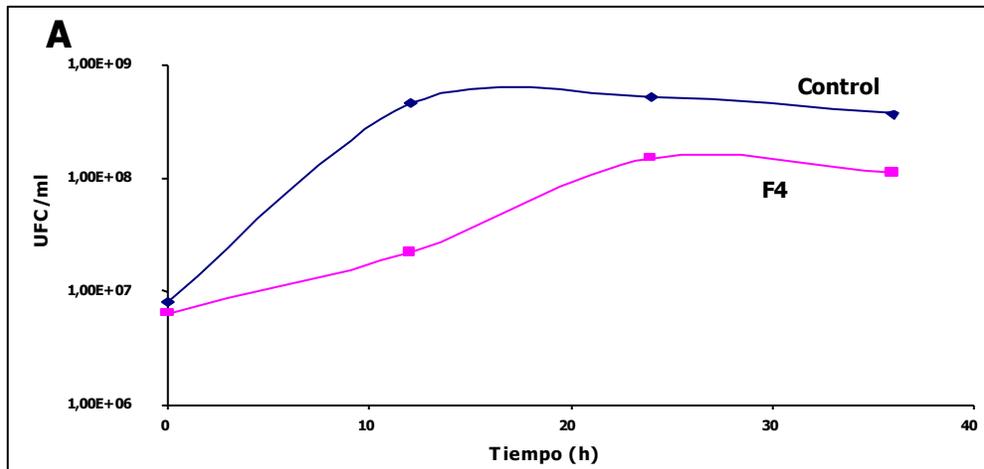


Figura 3. Cinéticas de crecimiento de tres cepas de *Campylobacter* (A) *C. coli* 19; (B) *C.coli* 49; y (C) *C. jejuni* 37, creciendo en la formulación 4. El control fue el

medio ICC + EL 0.6%

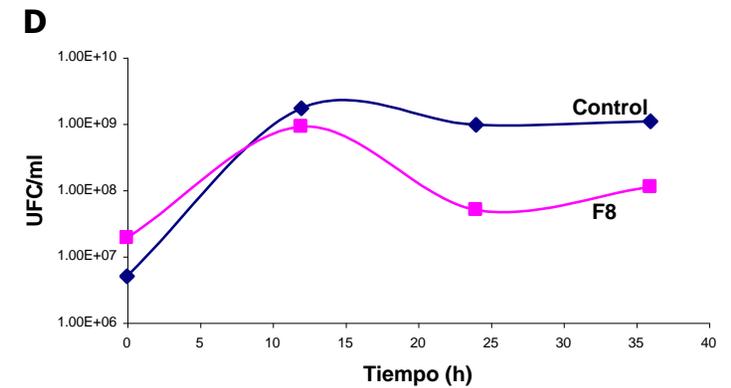
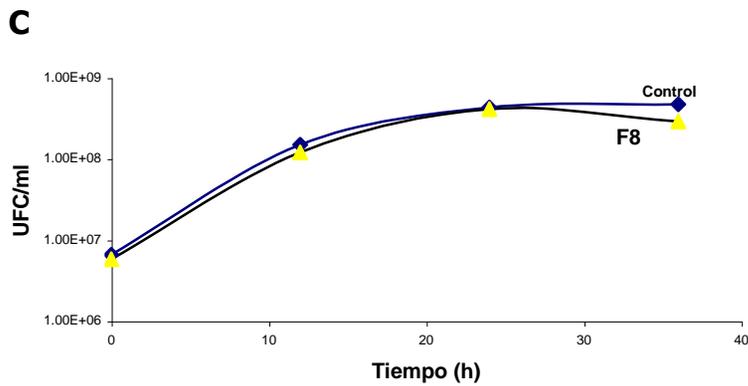
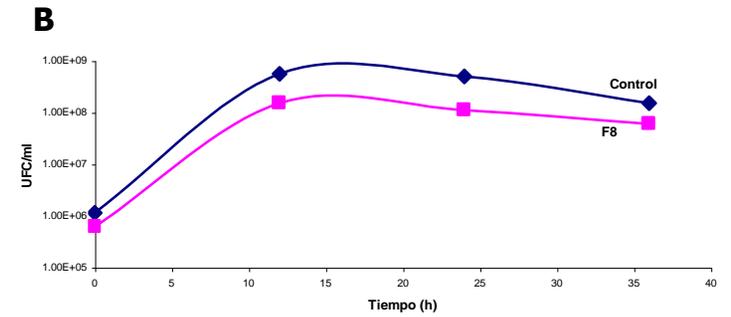
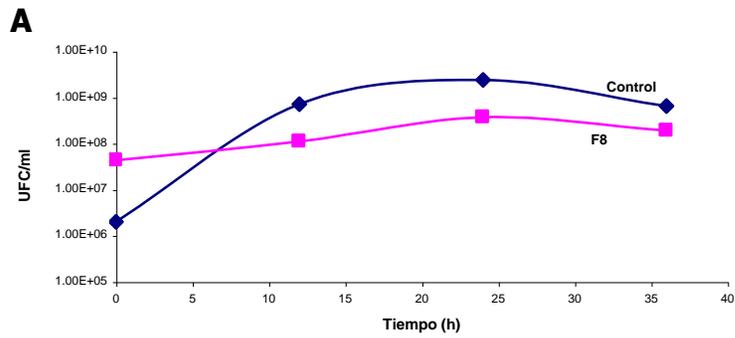
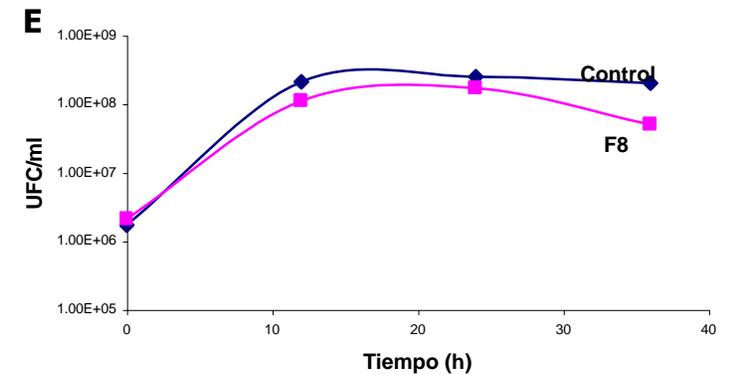


Figura 4. Cinéticas de crecimiento de cinco cepas de *Campylobacter* (A) *C. coli* 75; (B) *C. jejuni* 37; (C) *C. coli* 19, (D) *C. coli* 81, (E) *C. coli* 49 creciendo en la formulación 8. El control fue el medio ICC + EL 0.6%



Encontramos que el nivel de recuperación de *C. jejuni* utilizando la F8 fue de 10^6 y los niveles de la flora acompañante estaban en el orden de 10^6 a 10^7 UFC/g o ml de muestra. Debido a esto, se decidió modificar nuevamente la concentración del tioglicolato de sodio al 0.13%. La formulación así diseñada tomó el número F9. Para esta se probó su nivel de recuperación en leche sin pasteurizar y pasteurizada, almejas congeladas (sin pasteurizar) y piel de pollo, contaminada con *C. jejuni* 37. Los resultados se resumen en la tabla 4.

TABLA 4
Recuperación de *C. jejuni* 37 empleando la F9^a

Alimento	
Leche Pasteurizada	<p>Flora Acompañante (UFC/ml): Aerobios totales: 3.1×10^1, Mohos y Levaduras: ND, Coliformes: Totales: Negativo, Fecales: Negativo</p> <p>Recuperación: En el 100% de los resultados: 0.4 UFC/ 1.4 ml (0.3 UFC/ml).</p>
	<p>Flora Acompañante (UFC/ml): Aerobios totales: 3.1×10^2, Mohos y Levaduras: 6×10^1, Coliformes: Totales: Negativo, Fecales: Negativo</p> <p>Recuperación: En el 50% de los resultados: 400 UFC/ 1.4 ml (286 UFC/ml), en el otro 50%: 4 UFC/ 1.4 ml (2.9 UFC/ml).</p>
Leche no pasteurizada	<p>Flora Acompañante (UFC/ml): Aerobios totales: 7.8×10^7, Mohos y Levaduras: 1.2×10^5, Coliformes: Totales: 9.0×10^5, Fecales: 7.0×10^5</p> <p>Recuperación: En el 50% de los resultados: 400 UFC/ 1.4 ml (286 UFC/ ml), en el otro 50%: 4 UFC/ 1.4 ml (2.9 UFC/ ml).</p>

TABLA 4 (continuación)

Alimento	
	Flora Acompañante (UFC/g):
	Aerobios totales: 7.8×10^7 , Mohos y Levaduras: 1.2×10^5 ,
Piel de pechuga de pollo	Coliformes: Totales: 9.0×10^5 , Fecales: 7.0×10^5
	Recuperación:
	No se obtuvieron resultados concluyentes. Blanco positivo.
	Flora Acompañante (UFC/g):
	Aerobios totales: 3.3×10^3 , Mohos y Levaduras: 5.5×10^1 ,
Almeja chocolata	Coliformes: Totales: 1.1×10^2 , Fecales: 0.5×10^1
	Recuperación:
	En el 100% de los resultados 10 UFC/ 1.4 g (7.1 UFC/ g).

^a Ensayo para estudiar el nivel de recuperación de la F9 con diferentes alimentos contaminados artificialmente empleando diluciones seriadas de campylobacterias de concentración conocida (UFC/ml). Los tubos se incubaron por espacio de 24 horas, en atmósfera normal de oxígeno, una vez finalizado el período, se homogenizaron suavemente y se tomó una alícuota de 100µL, la cual fue estriada sobre agar cefex para las muestras de almejas y skirrow para las demás. Las placas así inoculadas, se llevaron a incubar por 48 horas en atmósfera microaerofílica. Al final, se buscó la presencia de colonias típicas de campylobacterias en las placas para determinar en cuales ya no había presencia de colonias sospechosas. También se analizó el nivel de flora acompañante presente en la muestra, siguiendo los procedimientos de la normativa vigente. En todos los casos se incluyó un blanco para asegurar la ausencia de campylobacterias en la muestra inicialmente.

Encontramos que esta formulación permitió aislar bajos números de campylobacterias en muestras como la almeja chocolata y la leche pasteurizada, las cuales mostraron bajos niveles de flora acompañante, sin embargo, conforme aumentaba el nivel de contaminación, la recuperación disminuía. En el caso de la muestra de piel de pollo, la recuperación no se realizó en todas las diluciones (aún en las más concentradas) y en los blancos se demostró la presencia de contaminación inicial por campylobacterias. Por lo que nuevamente fue necesario hacer cambios en la formulación.

Debido a los resultados anteriores, se estableció la formulación 10 (F10) en donde la concentración del tioglicolato de sodio fue aumentada a 0.15%. La F10 fue probada con *C. jejuni* 5653, y se estudio su comportamiento con y sin alimentos. En la tabla 5 se resumen los resultados obtenidos con esta formulación.

TABLA 5
Recuperación de *C. jejuni* 5653 empleando F10^a

ALIMENTO	
Agua Peptonada Estéril	<p>Flora Acompañante (UFC/ml): Aerobios totales: N/A, Mohos y Levaduras: N/A. Coliformes: Totales: N/A, Fecales: N/A Recuperación: En el 50% de los resultados: 290 UFC/1.4ml (207 UFC/ ml)</p>
Almeja chocolata	<p>Flora Acompañante (UFC/g): Aerobios totales: 6.5×10^2, Mohos y Levaduras: $< 1.0 \times 10^1$. Coliformes: Totales: 5.0×10^1, Fecales: $< 1.0 \times 10^1$ Recuperación: En el 100% de los resultados 140 UFC/ 1.4g (100 UFC/ g), solo en el 25% 14 UFC/1.4g (10 UFC/ g).</p>
Ensalada de lechuga y tomate (cruda)	<p>Flora Acompañante (UFC/g): Aerobios totales: 1.3×10^4, Mohos y Levaduras: 2.5×10^2. Coliformes: Totales: 8.0×10^3, Fecales: 5.5×10^2 Recuperación: En el 100% de los resultados 500 UFC/1.4 g (357 UFC/g), solo en el 50% 50 UFC/1.4g (35.7 UFC/g)</p>

^a Ensayo para estudiar el nivel de recuperación de la F10 en agua peptonada estéril, almejas y ensalada de lechuga, contaminadas artificialmente empleando diluciones seriadas de campylobacterias de concentración conocida (UFC/ml). Los tubos se incubaron por espacio de 24 horas, en atmósfera normal de oxígeno, una vez finalizado el período, se homogenizaron suavemente y se tomó una alícuota de 100µL, la cual fue estriada sobre agar cefex para las muestras de almejas y el agua peptonada y skirrow para la ensalada. Las placas así inoculadas, se llevaron a incubar por 48 horas en atmósfera microaerofílica. Al final, se buscó la presencia de colonias típicas de campylobacterias en las placas para determinar en cuales no había presencia de colonias sospechosas. También se analizó el nivel de flora acompañante presente en la muestra, siguiendo los procedimientos de la normativa vigente. En todos los casos se incluyó un blanco para asegurar la ausencia de campylobacterias en la muestra inicialmente.

Haciendo las modificaciones pertinentes, obtuvimos resultados contradictorios utilizando esta formulación. Cuando probamos agua peptonada los niveles de recuperación fueron mayores (esto es, que aislaban menos número de células) que al compararlos con los obtenidos en alimentos; lo cual podría indicar que la concentración del agente reductor empleado era muy alta. Por lo que nuevamente se realizó una modificación a la formulación. Esta formulación (F11) contenía un 0.17% de tioglicolato de sodio. Se probó su eficiencia de recuperación en ensalada de lechuga y tomate (aproximadamente 90% lechuga con 10% tomate en peso) adquirida en una cafetería universitaria. La cepa utilizada fue *C. jejuni* 5653 y los resultados son mostrados en la tabla 6.

TABLA 6
Recuperación de *C. jejuni* 5653 empleando F11^a

ALIMENTO	FLORA ACOMPAÑANTE (UFC/ g)	RECUPERACIÓN
Ensalada de lechuga y tomate (cruda)	Aerobios totales: 2.3×10^4 Mohos y Levaduras: 9.5×10^3 Coliformes Totales: 1.9×10^3 Fecales: 1.8×10^3	En el 100% de los resultados 30 UFC/ 1.4g (21.4 UFC/ g)

^a Ensayo para estudiar el nivel de recuperación de la F11 en ensalada de lechuga lista para consumir adquirida en una cafetería, contaminada artificialmente empleando diluciones seriadas de campylobacterias de concentración conocida (UFC/ml). Los tubos se incubaron por espacio de 24 horas, en atmósfera normal de oxígeno, una vez finalizado el período, se homogenizaron suavemente y se tomó una alícuota de 100µL, la cual fue estriada sobre agar skirrow. Las placas así inoculadas, se llevaron a incubar por 48 horas en atmósfera microaerofílica. Al final, se buscó la presencia de colonias típicas de campylobacterias en las placas para determinar en cuales no había presencia de colonias sospechosas. También se analizó el nivel de flora acompañante presente en la muestra, siguiendo los procedimientos de la normativa vigente. En este caso se incluyó un blanco para asegurar la ausencia de campylobacterias en la muestra inicialmente.

De acuerdo con los r iperar hasta 30 UFC/g de ensalada, cabe señalar que no se in ón (3 UFC/g) y por lo tanto los resultados obtenidos son concluyentes, debido a que el nivel de recuperación puede ser aún menor.

Aunque los resultados mostraban que esta formulación podría tener un nivel de recuperación bajo; se decidió hacer una nueva modificación a los componentes del medio. Este cambio se realizó debido a que el nivel de flora acompañante en ese ensayo fue del orden de 10^4 UFC/g, este nivel se considera que es intermedio, pero muestras más complejas tal como la piel de pollo, poseen mayor carga microbiana y diversidad de flora acompañante. Pensando que una posible aplicación que tendría este medio sería el que pueda actuar de forma eficiente aun con muestras complejas, se realizó la modificación de la concentración del tioglicolato de sodio a 0.19%(F12). Esta fue probada con las cepas *C. jejuni* 37 y *C. jejuni* 5653, en dos alimentos (almejas y ensalada de lechuga y tomate). La tabla 7 muestra a detalle los resultados obtenidos.

Los resultados con las muestras de almejas mostraron que existen diferencias en el nivel de recuperación entre las dos cepas empleadas, (tabla 7). Con estos resultados fue evidente que se tendría que volver a modificar la concentración del agente reductor a un 0.20% para dar paso a la F13.

TABLA 7
Recuperación de *C. jejuni* 5653 y *C. jejuni* 37 empleando F12^a

ALIMENTO	
Ensalada de lechuga y tomate (cruda) <i>C. jejuni</i> 37	<p>Flora Acompañante (UFC/g): Aerobios totales: 1.3×10^5, Mohos y Levaduras: 1.5×10^1 Coliformes: Totales: 9.0×10^4, Fecales: 3.0×10^1</p> <p>Recuperación: En el 100% 61 UFC/1.4g (43.5 UFC/g), mientras que solo en el 75% 6 UFC/1.4g (4.3 UFC/g).</p>

ALIMENTO	
Almeja chocolata	<p>Flora Acompañante (UFC/g)^b: Aerobios totales: 1.9×10^4, Mohos y Levaduras: 2.3×10^1 Coliformes: Totales: 2.8×10^1, Fecales: 0.5×10^1</p> <p>Recuperación <i>C. jejuni</i> 37: En el 100% 1.0 UFC/1.4g (0.7 UFC/g)</p> <p>Recuperación <i>C. jejuni</i> 5653: En el 100% 420 UFC/1.4g (300 UFC/g), mientras solo en el 25% 42 UFC/1.4g (30 UFC/g).</p>

^a Ensayo para estudiar el nivel de recuperación de la F12 en ensalada de lechuga y almejas, contaminadas artificialmente empleando diluciones seriadas de campylobacterias de concentración conocida (UFC/ml). Los tubos se incubaron por espacio de 24 horas, en atmósfera normal de oxígeno, una vez finalizado el período, se homogenizaron suavemente y se tomó una alícuota de 100µL, la cual fue estriada sobre agar skirrow para las muestras de ensalada y en agar cefex para las de almejas. Las placas así inoculadas, se llevaron a incubar por 48 horas en atmósfera microaerofílica. Al final, se buscó la presencia de colonias típicas de campylobacterias en las placas para determinar en cuales no había presencia de colonias sospechosas. También se analizó el nivel de flora acompañante presente en la muestra, siguiendo los procedimientos de la normativa vigente. En este caso se incluyó un blanco para asegurar la ausencia de campylobacterias en la muestra inicialmente.

^b Los resultados mostrados son el promedio para una misma muestra.

Para estudiar el comportamiento de la F13 se eligieron dos cepas de *C. jejuni*: 5653 y 50sp en leche sin pasteurizar y agua peptonada estéril, la tabla 8 muestra los resultados obtenidos en los ensayos.

De acuerdo a los resultados, encontramos que el mismo patrón con la F10, se volvió a repetir con la F13, en el caso del agua peptonada estéril, donde a diferencia de los resultados con *C. jejuni* 5653 (290 UFC/ml), la recuperación de *C. jejuni* 50sp (200 UFC/ml) se llevó a cabo de una forma ligeramente más eficiente (en términos de mínimo de número de células recuperadas), esto quizás se debió, como ya se había comentado, a diferencias entre las cepas. Sin embargo cuando se empleo leche no pasteurizada los niveles de recuperación fueron más bajos.

TABLA 8

Recuperación de *C. jejuni* 5356 y *C. jejuni* 50 sp empleando F13^a

ALIMENTO	FLORA ACOMPañANTE (UFC/ ml)	RECUPERACIÓN
Agua Peptonada Estéril <i>C. jejuni</i> 50 sp	Aerobios totales: N/A Mohos y Levaduras: N/A Coliformes Totales: N/A Fecales: N/A	En el 100% de los resultados: 200 UFC/1.4ml (143 UFC/ml), solo en el 25% 20 UFC/1.4ml (14.3 UFC/ml).
Leche no pasteurizada <i>C. jejuni</i> 5653	Aerobios totales: 1.4×10^6 Mohos y Levaduras: 3×10^1 Coliformes Totales: 5×10^4 Fecales: 5×10^4	En el 100% de los resultados: 10 UFC/1.4ml (7.1 UFC/ml), solo en el 25%: 1 UFC/1.4ml (0.71 UFC/ml)

^a Ensayo para estudiar el nivel de recuperación de la F13 con agua peptonada estéril y leche no pasteurizada, contaminadas artificialmente empleando diluciones seriadas de campylobacterias de concentración conocida (UFC/ml). Los tubos se incubaron por espacio de 24 horas, en atmósfera normal de oxígeno, una vez finalizado el período, se homogenizaron suavemente y se tomó una alícuota de 100µL, la cual fue estriada sobre agar skirrow para la muestra de leche no pasteurizada y en agar cefex para el agua peptonada estéril. Las placas así inoculadas, se llevaron a incubar por 48 horas en atmósfera microaerofílica. Al final, se buscó la presencia de colonias típicas de campylobacterias en las placas para determinar en cuales no había presencia de colonias sospechosas. También se analizó el nivel de flora acompañante presente en la leche, siguiendo los procedimientos de la normativa vigente. En este caso se incluyó un blanco para asegurar la ausencia de campylobacterias en la muestra inicialmente.

Consideramos que esta cepa (*C. jejuni* 50 sp) era más exigente que las anteriores probadas (*C. jejuni* 5653 y 37), por lo que se decidió utilizarla para ensayos posteriores.

Esta decisión se tomó hipotetizando que si el medio podría recuperar cepas exigentes, también podría hacerlo con aquellas que no lo eran en la misma medida.

Se decidió hacer otra ligera modificación en la composición del tioglicolato de sodio, (0.25%, F14). Este cambio se realizó debido a que existía la posibilidad de que la F13 no pudiera ser capaz de aislar bajos números de campylobacterias exigentes (*C. jejuni* 50sp) en presencia de altos niveles de flora acompañante.

Con la F14 se realizó un ensayo empleando ensalada de lechuga. En la tabla 9 se detallan los resultados obtenidos en este ensayo.

TABLA 9
Recuperación de *C. jejuni* 50 sp empleando F14^a

ALIMENTO	FLORA ACOMPAÑANTE (UFC/ g)	RECUPERACIÓN
Ensalada de lechuga y tomate <i>C. jejuni</i> 50sp	Aerobios totales: 9.5 x 10 ³ Mohos y Levaduras: 2.6 x 10 ³ Coliformes Totales: 1.5 x 10 ³ Fecales: 7.5 x 10 ¹	En el 100% de los resultados 5 UFC/1.4g (3.6 UFC/g), mientras que solo en el 50% de los casos 0.5 UFC/1.4g (0.36 UFC/g)

^a Ensayo para estudiar el nivel de recuperación de la F14 en ensalada de lechuga, contaminada artificialmente empleando diluciones seriadas de campylobacterias de concentración conocida (UFC/ml). Los tubos se incubaron por espacio de 24 horas, en atmósfera normal de oxígeno, una vez finalizado el período, se homogenizaron suavemente y se tomó una alícuota de 100µL, la cual fue estriada sobre agar skirrow. Las placas así inoculadas, se llevaron a incubar por 48 horas en atmósfera microaeroflica. Al final, se buscó la presencia de colonias típicas de campylobacterias en las placas para determinar en cuales no había presencia de colonias sospechosas. También se analizó el nivel de flora acompañante presente en la leche, siguiendo los procedimientos de la normativa vigente. En este caso se incluyó un blanco para asegurar la ausencia de campylobacterias en la muestra inicialmente.

Los resultados obtenidos indicaron que se podían recuperar bajos números de campylobacterias, sin embargo, en estos casos el nivel de flora acompañante era bajo comparado con otras muestras analizadas, y este factor era muy importante. Sin hacer un ensayo adicional se decidió hacer una modificación a la concentración de tioglicolato de sodio, debido a que el nivel de flora acompañante era muy bajo y los resultados obtenidos quizás podrían ser diferentes en muestras con valores altos de flora acompañante.

Así, la F15 contaba con un porcentaje final de tioglicolato de sodio del 0.30%. Nuevamente para probar el nivel de recuperación se utilizó ensalada de lechuga, y la cepa empleada fue *C. jejuni* 50sp. Los resultados de este ensayo, se muestran en la tabla 10.

TABLA 10
Recuperación de *C. jejuni* 50 sp empleando F15^a

ALIMENTO	FLORA ACOMPAÑANTE (UFC/ g)	RECUPERACIÓN
Ensalada de lechuga y tomate <i>C. jejuni</i> 50sp	Aerobios totales: 3.7 x 10 ⁷ Mohos y Levaduras: 9.0 x 10 ³ Coliformes Totales: 1.1 x 10 ⁷ Fecales: 9.6 x 10 ⁶	7300 UFC/1.4 g (5214 UFC/g) No se obtuvieron resultados concluyentes.

^a Ensayo para estudiar el nivel de recuperación de la F15 en ensalada de lechuga, contaminada artificialmente empleando diluciones seriadas de campylobacterias de concentración conocida (UFC/ml). Los tubos se incubaron por espacio de 24 horas, en atmósfera normal de oxígeno, una vez finalizado el período, se homogenizaron suavemente y se tomó una alícuota de 100µL, la cual fue estriada sobre agar skirrow. Las placas así inoculadas, se llevaron a incubar por 48 horas en atmósfera microaerofílica. Al final, se buscó la presencia de colonias típicas de campylobacterias en las placas para determinar en cuales no había presencia de colonias sospechosas. También se analizó el nivel de flora acompañante presente en la leche, siguiendo los procedimientos de la normativa vigente. En este caso se incluyó un blanco para asegurar la ausencia de campylobacterias en la muestra inicialmente.

El nivel de recuperación tentativo de la F15 con este nivel de flora acompañante fue de 7300 UFC/ 1.4 g de muestra (5214 UFC/g). Sin embargo, en algunas placas que provenían con números más bajos (de inoculación) se observó crecimiento característico de campylobacterias, sin embargo estos datos no fueron tomados en cuenta. Uno de los posibles factores que influyó para que no se obtuvieran resultados concluyentes, fue el agar selectivo empleado. En este ensayo el alimento tenía una carga microbiana muy alta, y aunque se supone que estuvieron en presencia de sustancias antimicrobianas, no fueron suficientes para eliminarlas, y ya que estos microorganismos tienen la capacidad de adaptarse a diferentes ambientes y crecer a una velocidad mayor. Debido a esto, como medio selectivo para muestras que tenían una carga microbiana $\geq 10^5$ UFC/ ml o g de muestra, fue utilizado el Agar Skirrow, el cuál tiene un mayor poder selectivo en comparación con el Cefex.

A partir de este momento, se hizo un cambio drástico en el diseño de las formulaciones, ya que se empezaron a emplear altas concentraciones de tioglicolato de sodio. Este cambio obedeció a que los niveles de flora acompañante mayores a 10^5 UFC/ ml o g no permitían el aislamiento de bajos niveles de inoculación; además de que un nivel de concentración del 0.5% ya había demostrado ser eficaz con muestras problema. De acuerdo con lo anterior, se propuso la F16 la cual empleaba una concentración final de 0.50% y se analizó su nivel de recuperación en leche sin pasteurizar inoculada con *C. jejuni* 50sp y los resultados se muestran en la tabla 11.

Los resultados obtenidos de este ensayo fueron nula capacidad de recuperación, ni aún en las diluciones más bajas (o con mayor número de campylobacterias). El problema fue el agar selectivo empleado para estriar la alícuota después de las 24 horas de incubación, y este error se cometió debido a que no se realizó de forma adecuada la cuenta de los microorganismos de la flora acompañante, ya que antes de las 12 horas existía crecimiento en las placas sembradas. Por lo tanto, es difícil concluir que la capacidad de aislamiento de la F16 no sea la adecuada, debido a que no se realizaron ensayos posteriores a este y a lo accidentado del ensayo mostrado en la tabla 11.

TABLA 11
Recuperación de *C. jejuni* 50 sp empleando F16^a

ALIMENTO	FLORA ACOMPAÑANTE (UFC/ ml)	RECUPERACIÓN
Leche no pasteurizada <i>C. jejuni</i> 50sp	Aerobios totales: 8.0 x 10 ⁴ Mohos y Levaduras: 3.5 x 10 ¹ Coliformes Totales: 5.5 x 10 ⁴ Fecales: 5.5 x 10 ⁴	No se obtuvieron resultados concluyentes

^a Ensayo para estudiar el nivel de recuperación de la F16 en leche no pasteurizada, contaminada artificialmente empleando diluciones seriadas de campylobacterias de concentración conocida (UFC/ml). Los tubos se incubaron por espacio de 24 horas, en atmósfera normal de oxígeno, una vez finalizado el período, se homogenizaron suavemente y se tomó una alícuota de 100µL, la cual fue estriada sobre agar skirrow. Las placas así inoculadas, se llevaron a incubar por 48 horas en atmósfera microaerofílica. Al final, se buscó la presencia de colonias típicas de campylobacterias en las placas para determinar en cuales no había presencia de colonias sospechosas. También se analizó el nivel de flora acompañante presente en la leche, siguiendo los procedimientos de la normativa vigente. En este caso se incluyó un blanco para asegurar la ausencia de campylobacterias en la muestra inicialmente.

Probamos F17 la cual contenía tioglicolato de sodio al 0.55%. Los niveles de recuperación se realizaron en leche no pasteurizada y ensalada de lechuga inoculada con *C. jejuni* 50sp y *C. jejuni* 57 sp respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 12.

TABLA 12

Recuperación de *C. jejuni* 50 sp y *C. jejuni* 57 sp empleando F17^a

ALIMENTO	FLORA ACOMPAÑANTE (UFC/g o ml)	RECUPERACIÓN
Leche no pasteurizada <i>C. jejuni</i> 50 sp	Aerobios totales: 3.0 x 10 ⁷ Mohos y Levaduras: 5.5 x 10 ¹ Coliformes Totales: 7.0 x 10 ⁴ Fecales: 5.5 x 10 ⁴	En el 100% de los resultados 60 UFC/1.4 ml (42.9 UFC/ ml)
Ensalada de lechuga <i>C. jejuni</i> 57sp	Aerobios totales: 2.2 x 10 ⁵ Mohos y Levaduras: 6.0 x 10 ³ Coliformes Totales: 1.0 x 10 ⁵ Fecales: 1.0 x 10 ⁵	En el 100% de los resultados 540 UFC/1.4 g (386 UFC/ g).

^a Ensayo para estudiar el nivel de recuperación de la F16 en leche no pasteurizada y ensalada de lechuga, contaminada artificialmente empleando diluciones seriadas de campylobacterias de concentración conocida (UFC/ml). Los tubos se incubaron por espacio de 24 horas, en atmósfera normal de oxígeno, una vez finalizado el período, se homogenizaron suavemente y se tomó una alícuota de 100µL, las cuales fueron estriadas sobre agar skirrow. Las placas así inoculadas, se llevaron a incubar por 48 horas en atmósfera microaerofílica. Al final, se buscó la presencia de colonias típicas de campylobacterias en las placas para determinar en cuales no había presencia de colonias sospechosas. También se analizó el nivel de flora acompañante presente en las muestras, siguiendo los procedimientos de la normativa vigente. En este caso se incluyó un blanco para asegurar la ausencia de campylobacterias en la muestra inicialmente.

Los resultados mostraron que esta formulación permitía el aislamiento de bajos números de campylobacterias (*C. jejuni* 50 sp), sin embargo estos resultados no se repitieron cuando probamos la *C. jejuni* 57 sp ya que el nivel de recuperación fue de 540 UFC/ 1.4g (386 UFC/ g). Tratando de disminuir este nivel de recuperación, se optó por

aumentar la concentración de tioglicolato de sodio a 0.59% (F18), la cual fue probada en leche no pasteurizada inoculada con *C. jejuni 57* sp, los resultados obtenidos se muestran a detalle en la tabla 13.

TABLA 13
Recuperación de *C. jejuni 57* sp empleando la F18^a

ALIMENTO	FLORA ACOMPAÑANTE (UFC/ ml)	RECUPERACIÓN
Leche sin pasteurizar <i>C. jejuni 57</i> sp	Aerobios totales: 1.0 x 10 ⁴ Mohos y Levaduras: NR* Coliformes Totales: <10 ⁴ Fecales: <10 ⁴	En el 100% de los resultados 246 UFC/ 1.4 ml (175.7 UFC/ ml)

^a Ensayo para estudiar el nivel de recuperación de la F18 en leche no pasteurizada, contaminada artificialmente empleando diluciones seriadas de campylobacterias de concentración conocida (UFC/ml). Los tubos se incubaron por espacio de 24 horas, en atmósfera normal de oxígeno, una vez finalizado el período, se homogenizaron suavemente y se tomó una alícuota de 100µL, la cual fue estriada sobre agar skirrow. Las placas así inoculadas, se llevaron a incubar por 48 horas en atmósfera microaeroflica. Al final, se buscó la presencia de colonias típicas de campylobacterias en las placas para determinar en cuales no había presencia de colonias sospechosas. También se analizó el nivel de flora acompañante presente en la leche, siguiendo los procedimientos de la normativa vigente. En este caso se incluyó un blanco para asegurar la ausencia de campylobacterias en la muestra inicialmente.

*NR: No Realizado.

Encontramos que al aumentar la concentración de tioglicolato de sodio se podían recuperar números bajos de campylobacterias (*C. jejuni 57* sp), aún cuando un nivel de flora acompañante sea intermedio. Y aunque se mostró una mejoría en cuanto al nivel de recuperación, nuevamente se trato investigar si era posible disminuir mas el nivel de recuperación. Debido a lo anterior se probó una concentración de tioglicolato de sodio al

0.70% (F19). La F19 fue probada con la misma cepa empleada en el ensayo anterior en ensalada de lechuga, los resultados se muestran en la tabla 14.

TABLA 14
Recuperación de *C. jejuni* 57 sp empleando F19^a

ALIMENTO	FLORA ACOMPañANTE (UFC/ g)	RECUPERACIÓN
Ensalada de lechuga <i>C. jejuni</i> 57sp	Aerobios totales: 2.9 x 10 ⁴ Mohos y Levaduras: ND* Coliformes Totales: 1.1 x 10 ⁴ Fecales: 1.0 x 10 ⁴	En el 100% de los resultados 126 UFC/ 1.4 g (90 UFC/g)

^a Ensayo para estudiar el nivel de recuperación de la F19 en ensalada de lechuga contaminada artificialmente empleando diluciones seriadas de campylobacterias de concentración conocida (UFC/ml). Los tubos se incubaron por espacio de 24 horas, en atmósfera normal de oxígeno, una vez finalizado el período, se homogenizaron suavemente y se tomó una alícuota de 100µL, la cual fue estriada sobre agar skirrow. Las placas así inoculadas, se llevaron a incubar por 48 horas en atmósfera microaerofílica. Al final, se buscó la presencia de colonias típicas de campylobacterias en las placas para determinar en cuales no había presencia de colonias sospechosas. También se analizó el nivel de flora acompañante presente en la leche, siguiendo los procedimientos de la normativa vigente. En este caso se incluyó un blanco para asegurar la ausencia de campylobacterias en la muestra inicialmente.

*ND: No Determinado.

Cabe señalar que con estos ensayos, no podríamos concluir si la F19 es mejor que la F18 o viceversa, ya que en ambos casos faltó realizar más diluciones, el nivel de flora acompañante fue muy similar; por lo tanto tentativamente el nivel de recuperación para la F19 fue 126 UFC.

Con estos resultados, se procedió a hacer un ajuste final. Este se realizó pensando en que hasta el momento la F19 trabajaba fácilmente con niveles de flora acompañantes intermedios. Este ajuste final consistió en aumentar la concentración del tioglicolato de sodio a 0.75% y la de metabisulfito de sodio a 1.5 g/L. La F20 fue probada con varias cepas de *C. jejuni*, y *C. coli*, en diversos alimentos. Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 15.

TABLA 15
Recuperación de varias cepas de *C. jejuni* y *C. coli* empleando F20^a

Alimento	
	Flora Acompañante (UFC/ml):
Leche no pasteurizada	Aerobios totales: 1.0×10^4 , Mohos y Levaduras: 1.0×10^1 , Coliformes: Totales: $< 10^4$, Fecales: $< 10^4$
<i>C. jejuni</i> 5653	Recuperación: En el 100% de los resultados: 73 UFC/ 1.4ml (52.1 UFC/ ml).
	Flora Acompañante (UFC/g):
Ensalada de Lechuga	Aerobios totales: 8.5×10^4 , Mohos y Levaduras: 5.5×10^3 , Coliformes: Totales: 8.5×10^3 , Fecales: 4.0×10^3
<i>C. jejuni</i> 94	Recuperación: En el 50% de los resultados: 27 UFC/ 1.4g (19.3 UFC/ g).
	Flora Acompañante (UFC/g):
Ensalada de Lechuga	Aerobios totales: 4.5×10^4 , Mohos y Levaduras: 6.5×10^3 , Coliformes: Totales: 2.3×10^4 , Fecales: 1.8×10^4
<i>C. jejuni</i> 173 ip	Recuperación: En el 100% de los resultados: 32 UFC/ 1.4g (22.9 UFC/ g).
Alimento	

	Flora Acompañante (UFC/ml):
Leche no pasteurizada	Aerobios totales: 4.7×10^6 , Mohos y Levaduras: 2.1×10^2 , Coliformes: Totales: 1.1×10^6 , Fecales: 1.2×10^4
<i>C. jejuni</i> 101	Recuperación: En el 100% de los resultados: 44 UFC/ 1.4g (31.4 UFC/ g)
	Flora Acompañante (UFC/g):
Almeja chocolata	Aerobios totales: 2.5×10^4 , Mohos y Levaduras: 2.0×10^1 , Coliformes: Totales: ND ^b , Fecales: ND ^b
<i>C. jejuni</i> 193 ip	Recuperación: En el 100% de los resultados 44 UFC/ 1.4g (31.4 UFC/ g)
	Flora Acompañante (UFC/g):
Ensalada de Lechuga	Aerobios totales: 2.0×10^4 , Mohos y Levaduras: 9.2×10^2 , Coliformes: Totales: 1.8×10^4 , Fecales: 4.0×10^3
<i>C. jejuni</i> 180 ip	Recuperación: En el 50% de los resultados: 56 000 UFC/ 1.4g (40 000 UFC/g).
	Flora Acompañante (UFC/ml):
Leche no pasteurizada	Aerobios totales: 2.4×10^5 , Mohos y Levaduras: NR ^c , Coliformes: Totales: 1.5×10^4 , Fecales: 1.4×10^4
<i>C. jejuni</i> 37	Recuperación: En el 100% de los resultados: 95 UFC/ 1.4g (67.9 UFC/ g)
	Flora Acompañante (UFC/ml):
Leche no pasteurizada	Aerobios totales: 2.0×10^5 , Mohos y Levaduras: 1.5×10^2 , Coliformes: Totales: 1.5×10^4 , Fecales: 9.0×10^3
<i>C. coli</i> 19	Recuperación: En el 100% de los resultados: 20 UFC/ 1.4g (14.3 UFC/ g)
	Flora Acompañante (UFC/ml):
Leche no pasteurizada	Aerobios totales: 1.4×10^7 , Mohos y Levaduras: 2.5×10^1 , Coliformes: Totales: 2.6×10^5 , Fecales: 1.3×10^5
<i>C. coli</i> 49	Recuperación: En el 100% de los resultados: 4.2 UFC/ 1.4g (3 UFC/ g)
Alimento	

Flora Acompañante (UFC/g):	
Almeja	Aerobios totales: 2.7×10^4 , Mohos y Levaduras: 4.0×10^1 ,
chocolata	Coliformes: Totales: ND ^b , Fecales: ND ^b
<i>C. coli</i> 75 ip	Recuperación: En el 100% de los resultados 29 UFC/ 1.4g (20.7 UFC/g).

^a Ensayo para estudiar el nivel de recuperación de la F20 en muestras de ensalada de lechuga, leche sin pasteurizar y almejas, contaminadas artificialmente empleando diluciones seriadas de campylobacterias de concentración conocida (UFC/ml). Los tubos se incubaron por espacio de 24 horas, en atmósfera normal de oxígeno, una vez finalizado el período, se homogenizaron suavemente y se tomó una alícuota de 100µL las cuales fueron estriadas sobre agar skirrow en el caso de la ensalada y leche y en agar cefex para las almejas. Las placas así inoculadas, se llevaron a incubar por 48 horas en atmósfera microaerofílica. Al final, se buscó la presencia de colonias típicas de campylobacterias en las placas para determinar en cuales no había presencia de colonias sospechosas. También se analizó el nivel de flora acompañante presente en las muestras, siguiendo los procedimientos de la normativa vigente. En este caso se incluyó un blanco para asegurar la ausencia de campylobacterias en la muestra inicialmente.

^b ND: No Determinado.

^c NR: No Realizado.

Los resultados indicaron que la F20 fue la mejor formulación ya que los niveles de recuperación en la mayoría de los casos se encontraron por debajo de las 100 UFC/ml o g. El siguiente paso fue comparar la efectividad de la F20 con medios de referencia: Bolton (incubación microaerofílica), y el Caldo Tran (incubación aeróbica). En esta etapa, se siguió en el mismo procedimiento, solo que al mismo tiempo, se inocularon los medios anteriormente mencionados. El alimento empleado fue la leche sin pasteurizar encontrando los siguientes resultados resumidos en la tabla 16.

TABLA 16

Comparación de los niveles de recuperación de varias cepas de *C. jejuni* y *C. coli* empleando la F20, Caldo Bolton y Caldo Tran^a

CEPA	CALDO BOLTON	CALDO F20	CALDO TRAN
<i>C.jejuni</i> 37	En el 50% de los resultados, recuperó 28 UFC/ 1.4ml (20 UFC/ ml)	En el 100% de los resultados, recuperó 28 UFC/ 1.4ml (20 UFC/ ml)	En el 75% de los resultados, recuperó 28 UFC/ 1.4ml (20 UFC/ ml)
<i>C.jejuni</i> 50sp	En el 50% de los resultados, recuperó 3 UFC/ 1.4ml (2.1 UFC/ ml)	En el 100% de los resultados, recuperó 30 UFC/ 1.4 ml (2.1 UFC/ ml)	En el 50% de los resultados, recuperó 30 UFC/ 1.4 ml (2.1 UFC/ ml)
<i>C.jejuni</i> 173ip	En el 100% de los resultados, recuperó 3 UFC/ 1.4 ml (2.1 UFC/ ml)	En el 50% de los resultados, recuperó 3 UFC/ 1.4 ml (2.1 UFC/ ml)	En el 50% de los resultados, recuperó 3 UFC/ 1.4 ml (2.1 UFC/ ml)
<i>C.jejuni</i> 193ip	En el 100% de los resultados, recuperó 2.5 UFC/ 1.4ml (1.7 UFC/ ml)	En el 100% de los resultados, recuperó 25 UFC/ 1.4ml (17 UFC/ ml)	En el 25% de los resultados, recuperó 25 UFC/ 1.4ml (17 UFC/ ml)
<i>C.jejuni</i> 5653	En el 100% de los resultados, recuperó 1.5 UFC/ 1.4ml (1.07 UFC/ ml)	En el 100% de los resultados, recuperó 15 UFC/ 1.4ml (10.7 UFC/ ml)	En el 100% de los resultados, recuperó 150 UFC/ 1.4ml (10.7 UFC/ ml)
CEPA	CALDO BOLTON	CALDO F20	CALDO TRAN

TABLA 16 (continuación)

<i>C. coli</i> 19	En el 100% de los resultados, recuperó 0.6 UFC/ 1.4ml (0.4 UFC/ ml)	En el 100% de los resultados, recuperó 6 UFC/ 1.4ml (4 UFC/ ml)	En el 100% de los resultados, recuperó 0.6 UFC/ 1.4ml (4 UFC/ ml)
<i>C. coli</i> 49	En el 25% de los resultados, recuperó 5.4 UFC/ 1.4ml (3.9 UFC/ ml)	En el 50% de los resultados, recuperó 5.4 UFC/ 1.4ml (3.9 UFC/ ml)	En el 75% de los resultados, recuperó 5.4 UFC/ 1.4ml (3.9 UFC/ ml)
<i>C. coli</i> 75	En el 100% de los resultados, recuperó 2.9 UFC/ 1.4ml (2.1 UFC/ ml)	En el 50% de los resultados, recuperó 2.9 UFC/ 1.4ml (3.9 UFC/ ml)	En el 50% de los resultados, recuperó 2.9 UFC/ 1.4ml (3.9 UFC/ ml)
<i>C. coli</i> 81	En el 100% de los resultados, recuperó 5 UFC/ 1.4ml (3.6 UFC/ ml)	En el 50% de los resultados, recuperó 5 UFC/ 1.4ml (3.6 UFC/ ml)	En el 100% de los resultados, recuperó 50 UFC/ 1.4ml (3.6 UFC/ ml)
<i>C. coli</i> 90	En el 100% de los resultados, recuperó 7.6 UFC/ 1.4ml (5.4 UFC/ ml)	En el 100% de los resultados, recuperó 7.6 UFC/ 1.4ml (5.4 UFC/ ml)	En el 100% de los resultados, recuperó 7.6 UFC/ 1.4ml (5.4 UFC/ ml)

^a Ensayo para comparar el nivel de recuperación de la F20, Caldo Tran y Caldo Bolton en muestras de leche sin pasteurizar, contaminada artificialmente empleando diluciones seriadas de campylobacterias de concentración conocida (UFC/ml). Los tubos se incubaron por espacio de 24 horas, en atmósfera normal de oxígeno para el Caldo Tran y F20 y en atmósfera microaerófila para el Caldo Bolton. Finalizado el período, se homogenizaron suavemente y se tomó una alícuota de 100µL las cuales fueron estriadas sobre agar skirrow. Las placas así inoculadas, se llevaron a incubar por 48 horas en atmósfera microaerófila. Al final, se buscó la presencia de colonias típicas de campylobacterias en las

placas para determinar en cuales no había presencia de colonias sospechosas. También se analizó el nivel de flora acompañante presente en las muestras, siguiendo los procedimientos de la normativa vigente. En este caso se incluyó un blanco para asegurar la ausencia de campylobacterias en la muestra inicialmente.

Con estos resultados obtenidos, fue posible realizar un análisis de varianza de un solo factor, el cual mostró que existían diferencias significativas entre los niveles de recuperación entre los medios con *C. jejuni*, pero no a sí entre los de *C. coli*.

7.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa

7.3.1 Extracción de DNA y Condiciones de amplificación

Uno de los objetivos de esta investigación fue modificar la formulación del Caldo Tran, para que este pueda ser acoplado a una técnica de biología molecular, tal como la reacción en cadena de la polimerasa. La formulación original no puede emplearse directamente sin hacer una extracción simple con agua, ya que la concentración empleada de carbón activado, así como la hierro, impiden el funcionamiento de la Taq DNA polimerasa, la cual es la enzima encargada de la síntesis de DNA a partir de los templados.

En primer instancia lo que se hizo fue estandarizar las condiciones de extracción del DNA. El método elegido fue, el de una extracción sencilla con agua. En este método, las células se hierven y por lo tanto se rompen, así el DNA y otras macromoléculas quedan en solución. Para los fines que se perseguían se compararon dos métodos, en los cuales su principal diferencia era el tiempo en el cual se sometían las células a altas temperaturas. Los datos más relevantes se muestran a continuación en esta tabla 17.

El parámetro de R280/260 nos proporciona datos de la pureza del material genómico. Un valor mayor de 1.8 es deseable porque significa que el DNA extraído es de buena calidad. En las tres corridas de extracción entre el M1 y el M2, el M2 siempre obtuvo valores mayores a 1.8, no siendo así para el M1, por lo tanto, se prefirió el M2 como método de extracción de DNA. También se corrió un gel, con el DNA obtenido por los dos métodos, para visualizar posibles problemas de degradación del material

genético, sin embargo, tanto en el M1 como en el M2, no observando problemas de degradación.

TABLA 17

Comparación de diversos parámetros con los métodos de extracción de DNA genómico^a

M1	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	R 280/260
λ260	0.023	0.054	1.04
λ280	0.022	0.011	4.9
Concentración (μgDNA /ml)	1.15	2.7	
M2			
λ260	0.045	0.044	2.25
λ280	0.033	0.021	2.2
Concentración (μgDNA /ml)	2.25	2.2	

^a Comparación de dos métodos de extracción de DNA con agua, el método 1 (M1) consistía en hervir las células por espacio de 10 minutos, posteriormente se centrifugaba a 11 250 r.p.m. por 2.5 min. El método 2 (M2) hervía las células por espacio de 15 minutos y el tiempo de centrifugación se extendía a 5 minutos.

Una vez estandarizadas las condiciones de extracción, se procedió a establecer las condiciones de corrida en el termociclador. Como ya fue mencionado en el apartado de material y métodos, se utilizaron el juego de primers propuesto por Cloak y Fratamico (2002) y por lo tanto se utilizaron las condiciones de trabajo que proponen para este conjunto de tres pares de iniciadores. No fue necesario hacer modificaciones a las temperaturas y tiempos propuestos originalmente, la figura 5 muestra los resultados obtenidos.

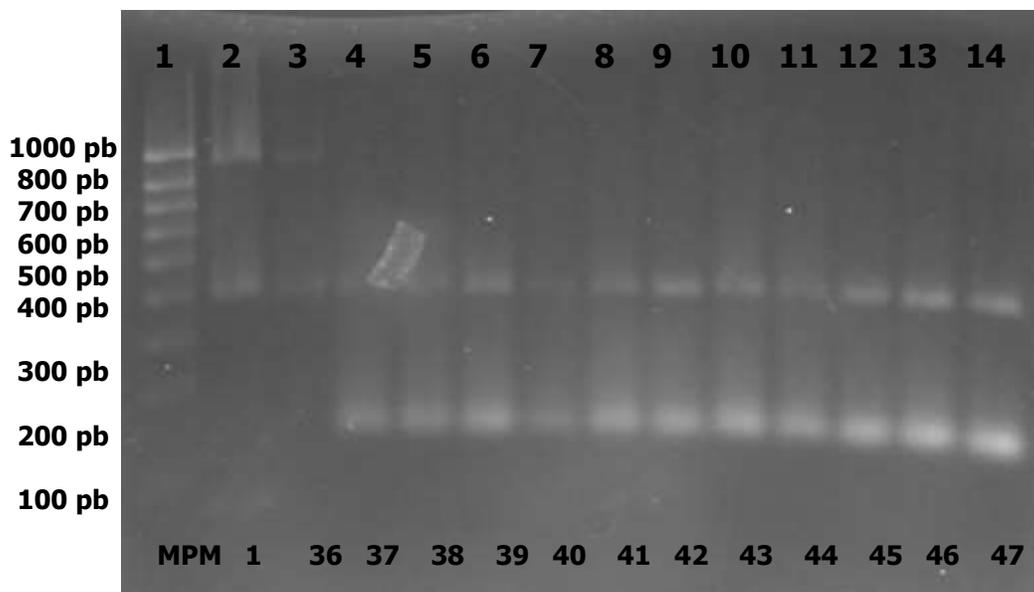


Figura 5. Productos de amplificación obtenidos de aislados nativos. Carril 1, marcador de talla molecular. Carriles 2 – 14, aislados de aves.

Este gel se obtuvo a partir de muestras de cepas nativas que se pretendían identificar por este método. Los números corresponden al numero de aislado en la tabla de cepas nativas aisladas e identificadas.

Otro de los objetivos por los cuales se estandarizó el procedimiento de PCR fue para comprobar si las modificaciones que se le hacían a la formulación original del caldo Tran, permitían el uso de esta técnica sin el empleo de métodos sofisticados y caros de extracción de DNA. Para nuestros fines, solo dos grupos de formulaciones fueron probadas, y la condiciones de empleo fueron las siguientes: el medio se inoculó con la cepa, se incubó en condiciones sin el empleo de atmósfera microaerofílica por 24 horas y posteriormente se tomó una alícuota para someterla a extracción de DNA. Una imagen que muestra los resultados obtenidos es la numero 6.

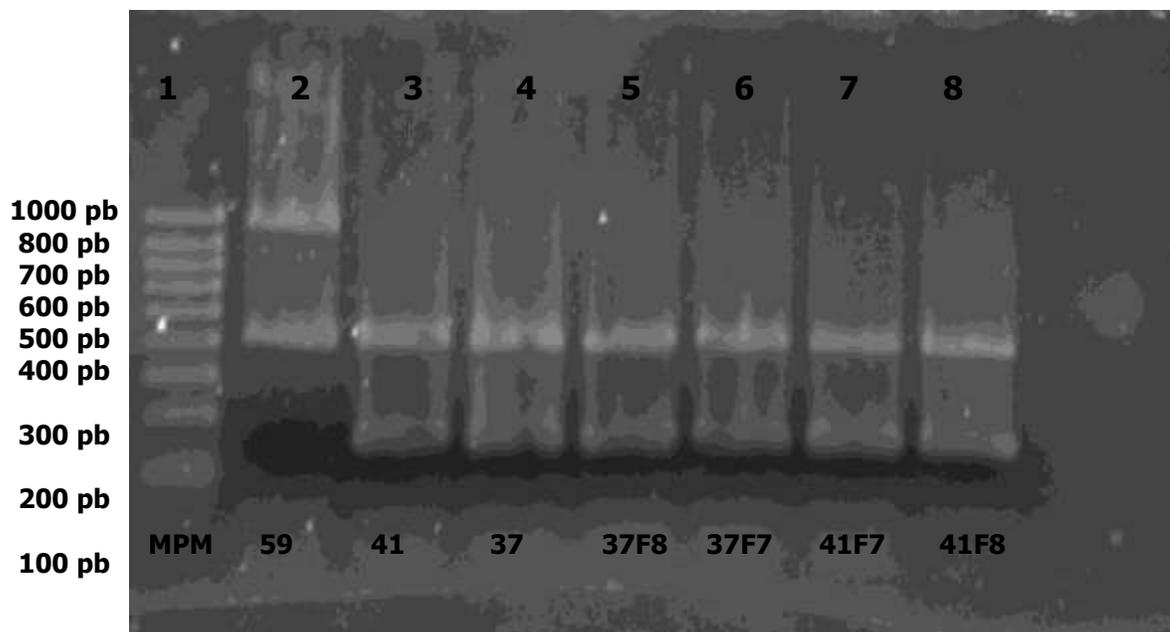


Figura 6. Productos de amplificación obtenidos de aislados nativos y empleando las formulaciones 7 y 8. Carril 1, marcador de talla molecular. Carril 2, *C. coli* proveniente de una muestra de piel de pollo, Carril 3 – 4, *C. jejuni* aisladas de muestras de aves, Carriles 5 –7, cepas de *C. jejuni* nativas cosechadas en las formulaciones 7 y 8.

Los resultados mostrados se obtuvieron por duplicado y corresponden al uso de la formulación número 8. Cabe señalar que no hicieron este tipo de experimentos para las demás formulaciones propuestas, incluidas el ajuste final, así que se cree que tentativamente puede funcionar. También es oportuno mencionar que tampoco se realizaron ensayos en donde se hayan inoculado una muestra con campylobacterias, por lo que los resultados obtenidos deberán tomarse con reserva.

Discusión

El aislamiento e identificación de campylobacterias es un proceso difícil, largo, tedioso y que requiere que la persona que lo realiza, tenga cierta experiencia o adiestramiento, además de que los métodos empleados sean lo más sensible y selectivos posible, ya que a diferencia de otros géneros de bacterias, las campylobacterias tienden a encontrarse en números intermedios o bajos al compararse con las enterobacterias, debido a que al ser bacterias microaerófilas, las condiciones del medio ambiente (concentración de oxígeno, temperatura, radiación, humedad, etc) las estresan, haciendo que el número inicial tienda hacia la baja, o bien que su nivel de estrés sea tal, que no sea posible recuperar la célula en los tiempos normales o estándares de marchas microbiológicas, con lo cual los resultados sin lugar a dudas se alteran.

Otro aspecto muy importante es el costo de los medios empleados. Debido a la naturaleza microaerófila de las campylobacterias, es necesario el empleo de atmósferas especiales, las cuales implican un gasto importante, ya que también por lo tanto se requiere de equipo de incubación especial, lo cual finalmente hace que en muchos laboratorios el aislamiento e identificación de esta bacteria no sea de rutina.

Debido a lo anterior, nuevas propuestas que faciliten el trabajo y bajen los costos de operación, deben continuamente ser presentadas para todo tipo de aplicaciones. En el presente trabajo, se propone una nueva formulación de un medio que no requiere incubación sobre una atmósfera microaerófila. Esta es una modificación a la composición original propuesta por el Dr. Tran, la cual podría acoplarse a otras técnicas de identificación tal como el PCR, ELISA, etc. acortando así el tiempo requerido para la obtención de los resultados.

De acuerdo con los resultados obtenidos la F20 fue la formulación que reunió las concentraciones adecuadas de los componentes nutritivos, agentes supresores de la flora acompañante y de los agentes reductores. Se demostró que fue capaz de aislar niveles

bajos de campylobacterias en presencia de altos niveles de flora acompañante, en diversos tipos de alimentos.

En todo lo anteriormente mostrado en los resultados, la idea central del trabajo fue primero encontrar la(s) sustancias reductoras ideales que sustituyeran el uso de carbón activado y segundo, encontrar la concentración ideal para el aislamiento de las campylobacterias a partir de alimentos.

No se modificaron las concentraciones y la composición de las sustancias nutritivas e inhibidoras de la flora acompañante. En el caso de las primeras, porque los distintos componentes proteínicos, así como la exclusión de glucosa de estos es ventajoso para las campylobacterias. Las campylobacterias son microorganismos proteolíticos que no tienen la capacidad de oxidar la glucosa y la no adición de esta sustancia proporciona una ligera ventaja ya que retrasa un poco el desarrollo de la flora acompañante, la cual en su mayoría, esta compuesta por microorganismos no exigentes, los cuales en presencia de esta fuente de carbono, dispararían velozmente su crecimiento. Así mismo, se debe recordar que el tiempo de generación de estos microorganismos es corto en comparación con las campylobacterias, de ahí que restringiendo la disposición de sustancias que favorecerían a la flora acompañante, así como la adición de sustancias con alto contenido de proteínas (tal como las peptonas) fueron factores que no sufrieron cambios y se mantuvieron igual que la composición del caldo Tran.

Otro grupo de sustancias que tan poco fue modificada en cuanto a concentración y composición fueron las sustancias encargadas del “resucitar” a las células estresadas. Estos componentes (ácido pirúvico y ácido alfa-cetoglutarico) los cuales son intermediarios del ciclo de Krebs, ayudan a re-establecer el metabolismo de células dañadas por diversos tipos de estrés. La inclusión de ellas, es vital cuando se trata de medios para este genero de bacterias, ya que son muy sensibles al estrés oxidativo, salino, luz UV, etc. y por lo tanto un medio que las contenga, favorece la recuperación

de las campylobacterias al ser estas, microorganismos que no se multiplican en la matriz que contaminan y paulatinamente bajan sus cuentas con respecto al tiempo.

En cuanto a las sustancias inhibidoras, la concentración de estas tampoco se modifico. Se hizo una comparación bibliográfica con otros medios selectivos de enriquecimiento y sólidos, actualmente empleados, y no se encontraron diferencias en las concentraciones empleadas. A partir de estos datos se decidió no aumentar o disminuir la concentración, o intercambiar sustancias de este grupo.

El grupo de sustancias que sufrió muchos cambios a lo largo del estudio fue el de las sustancias reductoras. En este rubro se paso por probar diversas sustancias, tal como el ácido ascórbico y el tioglicolato de sodio. La decisión del empleo de esta misma, se realizó en base una búsqueda bibliográfica sobre estas sustancias en microbiología. El empleo del ácido ascórbico generalmente se usa con adición de cisteína y económicamente el uso de esta última es caro. También es conveniente mencionar que el poder reductor del ácido ascórbico es menor en comparación con el tioglicolato de sodio. Pocos datos también podemos encontrar en la literatura sobre el empleo del ácido ascórbico en medios de cultivo a diferencia de los encontrados sobre el tioglicolato.

El empleo del ácido tioglocólico o su sal sódica (que es la más empleada) ha sido con el objeto de cultivar microorganismos anaerobios tales como los del género *Clostridium*, sin embargo, también en medios diseñados para *Campylobacter* han sido incluidos, tal como en el caso del Medio Tioglicolato para *Campylobacter* con 5 antimicrobianos, una modificación propuesta por Koidis y Doyle (Koidis and Doyle, 1984) para aumentar el nivel de recuperación de las campylobacterias y el Jeffrey y colaboradores (2000). En el caso del primero, su incubación no requería el empleo de una atmósfera microaerofílica y fue de los primeros medios en ser propuestos como alternativas para el aislamiento de las campylobacterias, sin embargo, al ir estudiando mejor a estos microorganismos, así como al proponer nuevas formulaciones, este medio paulatinamente fue dejándose de emplear, debido también a que cuando se hicieron comparaciones con otros medios, su nivel de recuperación no era comparable con los

nuevos, y más que emplearse como medio de aislamiento, actualmente es recomendado su uso como medio de transporte.

En cuanto a la modificación propuesta por Koidis y Doyle (Koidis and Doyle, 1984) consistía en la adición de 0.01% de metabisulfito y 0.15% de tioglicolato de sodio a unas muestras de leche sin pasteurizar. De sus resultados obtenidos, se concluyó que la adición de estas sustancias aumentaba la supervivencia de las campylobacterias. Otro medio de aislamiento semisólido que no requería incubación en atmósfera microaerofílica, era el propuesto por Jeffrey y sus colaboradores (2000). Este medio estaba propuesto para su uso con muestras de alimentos, dentro de uno de sus componentes se encuentra el tioglicolato de sodio, sin embargo, actualmente no figura como uno de los más utilizados, quizás a que faltaron mas ensayos que demostraran su eficacia, así como trabajos con muestras problema.

Una de las características que más llama la atención de la F20 fue la alta concentración (0.75%) de tioglicolato de sodio empleada. Esta es la primera vez que un medio es propuesto con una alta concentración de este agente reductor. Las concentraciones empleadas de esta sustancia son del orden de 0.05% y reportes en la literatura demuestran que esta concentración es suficiente para el desarrollo de microorganismos anaerobios o dicho de otra forma, microorganismos que su tolerancia al oxígeno es menor que la de las campylobacterias. Inicialmente se pensó que esta cantidad sería mas que suficiente para el desarrollo de las campylobacterias y esto es verdad, sin embargo, si este medio (F5) se emplea con fines de aislamiento en matrices alimenticias altamente contaminadas, la F5 pierde actividad y se demostró que no fue capaz de aislar las bacterias de interés.

Debido a esto, se procedió a aumentar las concentraciones de tioglicolato basados en la siguientes suposición: el medio inicialmente después del proceso de esterilización esta reducido. Por efecto de la manipulación, corrientes de aire, atmósfera con alto contenido de oxígeno, espacio de cabeza amplio, paulatinamente se va a oxidar,

sin embargo quienes realmente terminan por oxidar el medio, son los microorganismos de la flora acompañante.

Estos microorganismos tienen la capacidad de metabolizar casi cualquier sustrato y en condiciones de bajas tensiones de oxígeno, se favorece su metabolismo oxidativo, del cual, como productos finales de sus rutas, se encuentran gran variedad de compuestos oxidados, los cuales finalmente serán más en concentración que los agentes reductores inicialmente empleados.

Químicamente lo que sucede en el medio es la producción de sustancias oxidadas, las cuales al estar en contacto con los agentes reductores, hacen que estas últimas donen sus equivalentes de reducción o sus electrones a estas sustancias con alto contenido de oxígeno, reduciéndose éstas, y por lo tanto oxidándose las inicialmente reducidas. Se sabe que la oxidación de sustancias del tipo mercaptanos, tal como el tioglicolato de sodio, es oxidado a disulfuros y en el tubo muy probablemente al avanzar el tiempo habrá mayores concentraciones de ácido ditionoacético (Merck, 2004), el cual es el compuesto oxidado de este. Por lo tanto habrá un momento en donde la concentración de oxígeno disuelto será tal que no será posible el desarrollo de las campylobacterias.

Por lo tanto, es necesario añadir un exceso de las sustancias reductoras para asegurar que, aunque la concentración de sustancias oxidantes producidas sean altas, estas nunca estarán por encima de la concentración de las sustancias reductoras y que puedan inhibir el desarrollo de las campylobacterias presentes.

Esto último nos lleva a la conclusión que para que la F20 pueda trabajar de forma eficaz, requiere que la matriz alimenticia presente un nivel de flora acompañante. De acuerdo con nuestros resultados, la formulación trabajará eficazmente con un nivel de flora acompañante de 10^5 o más UFC por gramo o mililitro de muestra. Cabe señalar que en el caso de las muestras de almejas congeladas se mostraron niveles de recuperación diferentes a los obtenidos con las muestras de leche no pasteurizada o ensaladas y esta diferencia radica en el tipo y nivel de flora acompañante.

Y aunque fue posible eliminar el carbón activado de la formulación original propuesta por Tran, poco se probó experimentalmente sobre su desempeño con PCR. Tentativamente no habría porque haber problemas porque se trabajó con la F8 con esta técnica, no encontrando problemas de ningún tipo. Sin embargo, es necesario hacer mas ensayos que prueben claramente lo anterior.

Conclusiones

-
-
1. Se desarrolló una formulación para el aislamiento de *Campylobacter coli/jejuni*, la cual no requiere incubación en atmósfera microaerofílica ni carbón activado.
 2. El mejor agente reductor y más conveniente para el medio de cultivo fue el tioglicolato de sodio.
 3. El nivel tentativo de recuperación de la formulación con mejor desempeño (F20) fue menor de 100 UFC/ g o mL de muestra, con niveles de flora acompañantes de 10⁴ UFC/ g o mL y aún mayores.
 4. El desempeño para la F20 en comparación con dos formulaciones ampliamente utilizadas (Caldo Bolton y Tran) fue diferente en el caso de *C. jejuni*, pero no en el caso de *C. coli*.
 5. El tipo de alimento empleado afecta el nivel de recuperación y el alimento que mostró mayor divergencia fueron las almejas congeladas.
 6. Es probable que la F20 pueda acoplarse a métodos de biología molecular tal como el PCR.

LITERATURA CONSULTADA

- 1) Adhikari Bijay, Per Madie, Joanne Carnolly, Peter Davies, Megan Laydan, Lynn Rogers, 2002: Wild birds, flies and rodents as reservoirs of *Campylobacter* spp. On dairy Farm. Ministry of Agriculture of New Zealand. MAF Technical Paper No: 2002/18
- 2) Alterkruse, Sean F., Norman Stern, Patricia I. Fields, and David Swerdlow, 1999. “*Campylobacter jejuni* – An Emerging Foodborne Pathogen. Emerging Infectious Diseases. 5(1).
- 3) Barros – Velázquez Jorge, Ana Jiménez y Tomás G. Villa, 1999. Isolation and typing methods for the epidemiologic investigation of thermotolerant campylobacters” International Microbiology, Vol. 2, 1999, pp 217 – 226.
- 4) Baylis, C.L., S MacPhee, K.W. Martin, T.J. Humprey y R.P. Betts, 2000. Comparison of three enrichment media for the isolation of *Campylobacter* spp. from foods. J. Applied Microbiology. 89(5) pp 884 – 891.
- 5) Berrang, M.E., D.P. Smith, W.R. Windham, and P.W. Feldner, 2004. Effect of intestinal content contamination on broiler carcass *Campylobacter* counts. Journal of Food Protection. 67(2): 235-8.
- 6) Bolton F.J., Coates, D. and D.N. Hutchinson. 1984. The ability of *Campylobacter* supplements to neutralize photochemically induced toxicity and hydrogen peroxide. Journey of Applied Bacteriology. 56: 151 – 157.
- 7) Bolton F.J. and L. Robertson. 1982. A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni*. In: *Campylobacter: Epidemiology, Pathogenesis and Biochemistry*. Ed. D.G. Newell MTP Press ltd, Landcaster. pp 75-76.
- 8) Bork, B., H. Stryhn, A.K. Ersboll, and K. Pedersen, 2002. Thermophilic *Campylobacter* spp. In turkey samples: evaluation of two automated enzyme immunoassays and conventional microbiological techniques. J. Appl. Microbiology. 92(3): 574 – 582.
- 9) Brown P. E, O. F. Christensen, H. E. Clough, P. J. Diggle, C. A. Hart, S. Hazel, R. Kemp, A. J. H. Leatherbarrow, A. Moore, J. Sutherst, J. Turner, N. J.

-
-
- Williams, E. J. Wright, and N. P. French, 2004. Frequency and Spatial Distribution of Environmental *Campylobacter* spp.” Applied and Environmental Microbiology, 70(11) p. 6501-6511. Resumen.
- 10) Daczkowska – Kozon E. Janiszyn J., Walczak I., Sagalska A., Dabrowski W., 1999. *Campylobacter* spp. In Some Raw Materials of Animal Origin. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities. Food Science and Technology. Vol. 2, Issue 2.
- 11) Duim Birgitta, Peter A. R. Vandamme, Alan Rigter, Severine Laevens, Jeroen R. Dijkstra and Jaap A. Wagenaar, 2001: Differentiation of *Campylobacter* species by AFLP fingerprinting. Microbiology, 147: 2729 – 2737.
- 12) Canada Communicable Disease Report (CCDR), 1996. A Gastroenteritis Outbreak Among Canadian Tourist in Mexico. Volume 22 – 08. 15 April.
- 13) Canadian Food Inspection Agency (CFIA), 2001. Fact Sheet: Food Safety Facts on *Campylobacter*. P0026E-01, May.
<http://www.inspection.gc.ca/english/corpaffr/foodfacts/campye.shtml>
- 14) CDSC North West Quartely Bulletin 2002. July – September 2002. Weeks 27 – 39.
- 15) Chantarapanont, Walairut, Mark E. Berrang, and Joseph F. Frank, 2004. Direct Microscopic Observation of Viability of *Campylobacter jejuni* on Chicken Skin Treated with Selected Chemical Sanitizing Agents. Journal of Food Protection. 67(6) pp. 1146 – 1152.
- 16) Christensen, Bjarke, Helle Sommer, Hanne Rosenquist and Niels Nielsen. 2001. Risk Assessment on *Campylobacter jejuni* in chicken products. Institute of Food Safety and Toxicology, division of Microbiological Safety. Danish Veterinary and Food Administration. 1st Edition.
- 17) Cloak, M. Orla, G. Duffy, J.J. Sheridan, I.S. Blair, and D.A. MacDowell, 2001. A Survey on the Incidence of *Campylobacter* spp. and the Development of a Surface Adhesion Polymerase Chain Reaction (SA – PCR) Assay for the Detection of *Campylobacter jejuni* in Retail Meat Products. Food Microbiology. 18. pp. 287 – 298.
-
-

-
-
- 18) Cloak, M. Orla, and Pina M. Fratamico, 2002. A Multiplex Polymerase Chain Reaction for the Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Swine Processing Facility and Characterization of Isolates by Pulse – Field Gel Electrophoresis and Antibiotic Resistance Profiles. *Journal of Food Protection*, 65(2) pp 266 – 273.
- 19) Coker, Akitoye, Raphael D. Isokpehi, Bolaji N. Thomas, Kehinde O. Amisu y C. Larry Obit, 2002. Human Campylobacteriosis in Developing Countries, *Emerging infectious Diseases*. 8(3), March.
- 20) Corry, J.E.L., Post, D.E., Colin, P., and Laisney, M.J. 1995. Culture media for the isolation of campylobacters. *International Journal of Food Microbiology*. 26: 43 – 76.
- 21) Crushell, Ellen, Sinead Harty, Farhana Sharif and Billy Bourke, 2004. Enteric *Campylobacter*: Purging its Secrets??. *Pediatric Research*. Vol. 55, No.1, 3 – 12. Abstract.
- 22) Dyer, Neil W. and Charles L. Stoltenow, 2001. *Campylobacteriosis caused by the bacterium Campylobacter jejuni*. North Dakota State University.
- 23) Donnison, Andrea, 2003. Isolation of thermotolerant *Campylobacter* – Review and Methods for New Zealand Laboratories. *Enteric Zoonotic Disease Research*. New Zealand, May.
- 24) Doyle, Michael P., 1997. *Food Microbiology Fundamentals and Frontier*. ASM Press. 1 edición. pp 159 – 170. 1997.
- 25) ESR Ltd., 2001. Microbial Pathogen Data Sheet: *Campylobacter*” Prepared for the Ministry of Health. Issued May.
- 26) European Food Information Council (EUFIC), 2004. *Campylobacter jejuni* – A lesser Known Bacteria”, *Food Today*, No.15.
<http://www.eufic.org/gb/food/pag/food15/food15.htm>
- 27) FDA BAM, 1998. *FDA Bacteriological Analytical Manual*. Chapter 7. *Campylobacter*. Hunt J.M., Abeyta, C., & Tran, T. 8th edition.
- 28) FDA BAM, 2001. *FDA Bacteriological Analytical Manual*. Chapter 7. *Campylobacter*. Hunt J.M., Abeyta, C., & Tran, T. 9th edition.
-
-

-
-
- 29) FDA / CFSAN, 2001. Food & Drug Administration, Center for Safety & Applied Nutrition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. <http://www.cfsan.fda.gov/~mov/>
- 30) Fernández Escartín, E, 2001. Microbiología Sanitaria; Universidad de Querétaro; 1 edición, pp 161 – 175.
- 31) Fernández, Heriberto and Ma. Isabel Farace, 2003. Manual de Procedimientos: Diagnóstico de *Campylobacter* en muestras clínicas y de alimentos. A global *Salmonella* surveillance and laboratory support project of the World Health Organization.
- 32) Fernández H., A. García, MP Villanueva. 2004. Serotipos de *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni* aislado en carne de ave para consumo humano y en muestras de heces de niños con diarrea. Archivos de Medicina Veterinaria. 37(1): 79-81.
- 33) Friedman, Cindy R., Robert M. Hoekstra, Michael Samuel, Ruthanne Marcus, Jeffrey Bender, Beletshachew Shiferaw, Sudha Reddy, Shama Desai Ahuja, Debra L. Helfrick, Felicia Hardnett, Michael Carter, Bridget Anderson and Robert V. Tauxe, 2004. Risk Factors for Sporadic *Campylobacter* Infection in the United States: A Case – Control Study in FoodNet Sites”. Clinical Infectious Diseases. 38 (Suppl 3): S285 – 96.
- 34) Giacoboni, G., M. C. Puchuri, R. Cerdá, 1999. *Campylobacter* Termotolerantes en Menudos y Carcasas de Pollos Provenientes de Diferentes Comercios de la Ciudad de la Plata (Argentina). Analecta Veterinaria. 19, ½. pp 51 – 54.
- 35) Gillespie, Iain A., Sarah J. O’Brien, Jennifer A. Frost, Goutam K. Adak, Peter Orbi, Anthony V. Swan, Michael J. Painter, Keith R. Neal, and the *Campylobacter* Sentinel Surveillance Scheme Collaborators, 2002. A Case-Case Comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: A Tool for Generating Hypotheses”, Emerging Infectious Diseases. Vol. 8, No. 9, September 2002.
- 36) Goosens, H. & Butzler, J-P. 1992. Isolation and identification of *Campylobacter* spp. In: *Campylobacter jejuni*: Current status and future trends. Ed I. Nachamkin, M.J. Blaser & L.S. Tompkins. ASM, Washington, USA. Pp 93-109.
-
-

-
-
- 37) Helms, Morten; Pernille Vastrup, Peter Gender – Smidt, Kare Molbak, 2003. Short and long Term mortality Associated with Foodborne Bacterial Gastrointestinal Infections: Registry Based Study. *BMJ*. 326. 15 February 2003; pp 357 – 342. www.bmj.com
- 38) Hiatt, K.L., N.J. Stern, P. Fedorka-Cray, N.A. Cox, M. T. Musgrove, and S. Ladely, 2002. Molecular subtype analyses of *Campylobacter* spp. from Arkansas and California poultry operations. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(12). pp 6220 – 6236.
- 39) Hinton Jr., A., J.A. Cason, M.E. Hume, and K.D. Ingram, 2004. Spread of *Campylobacter* spp. During Poultry Processing in Different Seasons. *International Journal of Poultry Science*. 3(7) pp. 432 – 437.
- 40) Humphrey, Tom. 1999. The significance of *Campylobacter* species as foodborne pathogens. *The Society of Food Hygiene Technology*. No 26. Disponible en el sitio de red: www.softh.co.uk/technical/campylobacter.htm [revisado el 30 diciembre de 2004].
- 41) Humphrey, T. And J.G. Cruickshank.1985. Antibiotic and deoxycholate resistance in *Campylobacter jejuni* following freezing and heating. *Journal of Applied Bacteriology*. 59: 65 –71.
- 42) ISO 1995. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of thermotolerant *Campylobacter*. ISO 10272: 1995 (E) International Standards Organization, Genova.
- 43) Jacobs-Reitsma, W.F., 2000. *Campylobacter* in the food supply. In I. Nachamkin and M.J. Blaser, *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C. p. 497 – 509.
- 44) Jeffrey, J.S., A. Hunter, and E. R. Atwill, 2000. A Field-Suitable, Semisolid Aerobic Enrichment Medium for Isolation of *Campylobacter jejuni* in Small Numbers. *Journal of Clinical Microbiology*, April, 38(4) pp. 1668-1669.
- 45) Josefsen M.H., P.S. Lubeck, B. Aalbaek, J. Hoorfar, 2003. Preston and Park-Sanders protocols adapted for semi-quantitative isolation of thermotolerant *Campylobacter* from chicken rinse. *Int J Food Microbiol*. Jan 25;80(2):177-83. Resumen.
-
-

-
-
- 46) Josefsen M.H., P.S. Lubeck, F. Hansen, and J. Hoorfar, 2004. Towards an international standard for PCR-based detection of foodborne thermotolerant campylobacters: interaction of enrichment media and pre-PCR treatment on carcass rinse samples. *J Microbiol Methods*, July 1.58(1): 39-48. Resumen.
- 47) Keener, K.M., M.P. Bashor, P.A. Curtis, B.W. Sheldon, and S. Kathariou, 2004. Comprehensive Review of *Campylobacter* and Poultry Processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Institute of Food Technologists. Vol. 3. pp 105 – 116.
- 48) Ketley, Julian M, 1997. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology*. 143, 5 – 21.
- 49) Koidis, P., and M. Doyle, 1984. Recovery of *Campylobacter* from milk. *Applied Environmental Microbiology*. 47. pp. 455 – 460.
- 50) Larrosa Haro, A., Marcia Ruiz Pérez, Sergio Aguilar Benavides, 2002. Utilidad del estudio de las Heces para el Diagnóstico y Manejo de Lactantes y Preescolares con Diarrea Aguda. *Salud Pública Mexicana*. 44: 328 – 334.
- 51) Lecuit, Marc, Eric Abachin, Antoine Martin, Claire Poyart, Philippe Pochart, Felipe Suarez, Djaouida Bengoufa, Jean Feuillard, Anne Lavergne, Jeffrey J. Gordon, Patrick Berche, Loic Guillevin and Oliver Lortholary, 2004. Immunoproliferative Small Intestinal Disease Associated with *Campylobacter jejuni*. *The New England Journal of Medicine*. January 15 350(3) pp 239 – 248.
- 52) Leonard II, Edward E., Lucy S. Tompkins, Stanley Falkow and Irving Nachamkin, 2004. Comparison of *Campylobacter jejuni* Isolates Implicated in Guillain-Barré Syndrome and Strains That Cause Enteritis by a DNA Microarray. *Infection and Immunity*. 45(3) p. 1199 – 1203.
- 53) Logue, C.M.; J.S. Sherwood, L.M. Elijah, P.A. Olah and M.R. Dockter, 2003. The incidence of *Campylobacter* spp. on processed turkey from processing plants in the midwestern United States. *Journal of Applied Microbiology*. 25: 234 – 241.
- 54) Malavez Acevedo Yadira, 2005: Detección de *Campylobacter jejuni* en las incubadoras de una planta procesadora de pollos parrilleros de Puerto Rico. Tesis Maestría. Universidad de Puerto Rico.
-
-

<http://grad.uprm.edu/tesis/malavezacevedo.pdf>

- 55) Martin K.W., Mattick, K.L., Harrison, M. and Humphrey T. 2002. Evaluation of selective media for *Campylobacter* isolation when cycloheximide is replaced with amphotericin B. Letters in Applied Microbiology. 34: 124 – 129.
- 56) Martin William T., Charlotte M. Patton, Geroge K. Morris, Morris E. Potter and Nancy D. Puhr, 1983. Selective Enrichment Broth Medium for Isolation of *Campylobacter jejuni*. Journal of Clinical Microbiology. 17(5), p. 853 – 855.
- 57) Massachusetts Department of Public Health, Division of Epidemiology and Immunization, 2001. Guide to Surveillance and Reporting.
- 58) Meinersmann, Richard J., Charlotte M. Patton, Gracia M. Evins, I. Kaye Wachsmuth and Patricia I. Fields, 2002: Genetic diversity and relationships of *Campylobacter* species and subspecies. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 52: 1789:1797
- 59) Merk, Colombia. [internet]2004. www.merck.com.co/mcsa/site/wmsp.nsf, revisado el 17 Abril del 2005.
- 60) Modolo, José Rafael, Luiz Florêncio Fernandes Margato, Arnold Frederico Gottschalk, Carlos Alberto de Magalhães Lopes, 1999. Incidence of *Campylobacter* in pigs with and without diarrhea” Rev. Microbiol. 30(1) Sao Paulo.
- 61) Murinda, Shelton, Lien T. Nguyen, Stephen P. Oliver. 2004. Problems in isolating of *Campylobacter jejuni* from frozen – stored raw milk and bovine fecal samples: genetic confirmation using multiplex PCR. Mary Ann Liebert, Inc. 1(3): 166 – 171.
- 62) Moore, John E, 1999. *Campylobacter* enteritis in humans: sources of infection and modes of transmission. Hygiene Review. The Society of Food Hygiene Technology.
- 63) Moore, John E. 2001. An optimized recovery method for thermophilic *Campylobacter* from liver. BMC Microbiology. 1:32.
- 64) Muñoz, O. and J. Torres, 1992. Avances en los Criterios Diagnósticos y Terapéuticos en Diarrea Aguda. Gaceta Médica Mexicana. 1992; 128: 573 – 580.

-
-
- 65) Nachamkin, Irving and Martin J. Blaser, 2000. *Campylobacter*. American Society for Microbiology Press. Washington, USA. Segunda Edición.
- 66) Nachamkin, I., Jorgen Engberg, and Frank Moller Aarestrup, 2000. Diagnosis and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* spp. In I. Nachamkin and M.J. Blaser, *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C. p. 45 -66.
- 67) Newell, D.G., J. E. Shreeve, M. Toszeghy, G. Domingue, S. Bull, T. Humphrey, and G. Mead, 2001. Changes in the Carriage of *Campylobacter* Strains by Poultry Carcasses during Processing in Abattoirs. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(6) p. 2636-2640.
- 68) North Carolina Public Health, 2004. *Campylobacter infection*. North Carolina Communicable Disease Control Manual.
- 69) On Stephen, 2001. Campynet [internet] European Union. Disponible en el sitio de red: <http://campynet.vetinst.dk/contents.htm> [Revisado el 20 de Enero de 2005]
- 70) Park, P. 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International of Food Protection*. 74: 177 – 188.
- 71) Price, R.J., 2003: *Campylobacter* spp. Chapter 11, HACCP Compendium, <http://seafood.ucdavis.edu/haccp/compendium/chapt11.htm>
- 72) Puri, A. S., R. Aggarwal, E. M. Khan, S. Naik, A. Ayyagari, R. Pandey, and S. R. Naik, 1992. Explosive *Campylobacter jejuni* diarrhea un immunoproliferative small intestinal disease. *Indian J. Gastroenterology*, July 1. 11(3) pp 141 – 143.
- 73) Quiñónez – Ramírez, Elsa *et al*, 2000. Frequency of Isolation of *Campylobacter* from Roasted Chicken Samples from México City. *International of Food Protection* 63(1) pp 117 – 119.
- 74) Ransom, Gerri, Bruce Kaplan, Ann Marie McNamara, and I. Kaye Wachsmuth, 2000. *Campylobacter* prevention and control: the USDA-food safety and inspection service role and new food safety approaches. In I. Nachamkin and M.J. Blaser, *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C. p. 511 - 528.
- 75) Rudi Knut, Hilde Kristin Høidal, Tone Katla, Birgit Klungseth Johansen, John Nordal, and Kjetill S. Jakobsen, 2004. Direct Real-Time PCR Quantification of *Campylobacter jejuni* in Chicken Fecal and Cecal Samples by Integrated Cell
-
-

-
-
- Concentration and DNA Purification. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(2) p. 790-797. Resumen.
- 76) Sails, A. D., F. J. Bolton, A. J. Fox, D. R. A. Wareing, and D. L. A. Greenway, 2002. Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Environmental Waters by PCR Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Appl Environ Microbiol*. 68(3): 1319–1324.
- 77) Scates, P., Lynn Moran, and Robert H. Madden, 2003. Effect of Incubation Temperature on Isolation of *Campylobacter jejuni* Genotypes from Foodstuffs Enriched in Preston Broth. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(8) p. 4658-4661.
- 78) Scotter, S.L., Humphrey, T.J., Henley A., 1993. Methods for the detection of thermotolerant campylobacters in foods: results of an inter-laboratory study. *Journal of Applied Bacteriology*. 74: 155 – 163.
- 79) Sapsford K. E., A. Rasooly, C.R. Taitt, and F.S. Ligler, 2004. Detection of *Campylobacter* and *Shigella* species in food samples using an array biosensor. *Anal Chem*, January 15, 76(2): 433-40. Resumen.
- 80) Shahnaz Tahihra Al Rashid, I. Dakuna, H. Louie, D. Ng, P. Vandamme, w. Johnson, and V.L. Chan, 2000. Identification of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *Arcobacter butzleri* and *A. butzleri*-Like Species Based on the *glyA* Gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(4) pp. 1488 – 1494.
- 81) Slader J., G. Domingue, F. Jørgensen, K. McAlpine, R. J. Owen, F. J. Bolton, and T. J. Humphrey, 2002. Impact of Transport Crate Reuse and of Catching and Processing on *Campylobacter* and *Salmonella* Contamination of Broiler Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2) pp 713-719.
- 82) Smith, Kirk E., John M. Besser, Craig W. Hedberg, Fe T. Leano, Jeffrey B. Bender, Julie H. Wicklund, Brian P. Johnson, Kristine A. Moore, Michael T. Osterholm, 1999. Quinolone – Resistant *Campylobacter jejuni* infectious in Minnesota, 1992 – 1998. *The New England Journal of Medicine*. Vol. 340, No. 20, May 20. pp. 1525 – 1532.
-
-

-
-
- 83) Steinhauserova, I., M. Neboland and M. Kulicova. 2005. Prevalence of thermophilic *Campylobacter* spp. in slaughtered pigs in Czech Republic. 50(4): 171- 174.
- 84) Stern, Norman.2001. “*Campylobacter*”. Guide to Foodborne Pathogens”; Edited by Ronald G. Labbé and Santos García. John Wiley & Sons, Inc. 1 Edición.
- 85) Stern, N. J., V. A. Bannov, E. A. Svetoch, E. V. Mitsevich, I. P. Mitsevich, N. V. Volozhantsev, V. V. Gusev, and V. V. Perelygin.2004. Distribution and Characterization of *Campylobacter* spp. from Russian Poultry. Journal of Food Protection. 67(2) pp. 239 – 245.
- 86) Swaminathan, Bala, Timothy J. Barret, and The CDC PulseNet Task Force, 2000. A national molecular subtyping network for food-borne bacterial disease surveillance in the United States. In I. Nachamkin and M.J. Blaser, *Campylobacter*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C. p. 529 - 536.
- 87) Takkinen, J., A. Ammon, O. Robstad, t. Breuer and the *Campylobacter* Working Group.2001. European Survey on *Campylobacter* Surveillance and Diagnosis 2001”. Eurosurveillance. Vol. 8. No. 11.
- 88) Tauxe, R. 2000. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations, p 9–19, In I. Nachamkin, M. Blaser. *Campylobacter jejuni*: current status and future trends. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 89) Thunberg R.L., T.T. Tran, M.O. Walderhaug.2000. Detection of thermophilic *Campylobacter* spp. in blood-free enriched samples of inoculated foods by the polymerase chain reaction. Journal of Food Protection 63(3):299-303. Resumen.
- 90) Todd, Ewen. 2001.Epidemiology and Globalization of Foodborne Disease. Guide to Foodborne Pathogens. Edited by Ronald G. Labbé and Santos García. John Wiley & Sons, Inc. 1 Edición.
- 91) Torres, V. Ma. Refugio.1999.Agentes patógenos transmitidos por Alimentos. Universidad de Guadalajara; Volumen I, 1 Edición.
- 92) Trachoo, N., 2003. *Campylobacter jejuni*: An emergin pathogen. Songklanakarin J. Science Technology. 25(1) Jan-Feb.
-
-

-
-
- 93) Tran, T.T. 1995. Evaluation of Oxyrase® enrichment method for isolation of *Campylobacter jejuni* from inoculated foods. Letters in Applied Microbiology. 21. pp 345 – 347.
- 94) Tran, T.T. 1998. A blood – free enrichment medium for growing *Campylobacter spp.* under aerobic conditions. Letters in Applied Microbiology. 26. pp 145 – 148.
- 95) Walmsley, S.L and M.A. Karmali. 1989. Direct isolation of atypical thermophilic *Campylobacter* species from human feces on selective agar medium. Journal of Clinical Microbiology. 27(4): 668 – 670.
- 96) Whyte, P., K. McGill, R.H. Madden, L. Moran, P. Scates, C. Carroll, A. O’Leary, S. Fanning, J.D. Collins, E. McNamara, J.E. Moore, and M. Cormican. 2004. Occurrence of *Campylobacter* in retail foods in Ireland. Int. Journal Food Microbiology. September 95(2): 111 – 8. Resumen.
- 97) Wicker, Cécile, M. Giordano, S. Rourgier, M.L. Sorin and P. Arbault. 2001. *Campylobacter* Detection in Food Using an ELISA-Based Method. International Journal of Medical Microbiology. 291(3). Resumen.
- 98) Wong TeckLok, Megan Louise Deyane, John Andrew Hudson, Paula Scholes, Marion Grace Savill, John D. Klena. 2004. Validation of a PCR method for *Campylobacter* detection on poultry packs. British Food Journal. September 106(9), pp. 642 – 650. Resumen.
- 99) Yildirim, Murat., Ersin Stanbulluo/Lu, Burcu Ayvali. 2005. Prevalence and Antibiotic susceptibility of thermophilic *Campylobacter* species in broiler chickens. Turkey Journal Veterinarian of Animal Science. 29: 655 – 660.
- 100) Zhao, C., *et al*, 2001. Prevalence of *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* Serovars in Retail Chicken, Turkey, Pork, and Beef from the Greater Washington, D.C., Area”, Applied and Enviromental Microbiology. 67(12) pp 5431 – 5436.