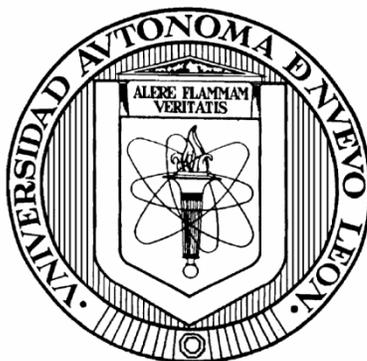


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**PREVALENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE  
*Campylobacter jejuni* y *C. coli* AISLADOS DE ALIMENTOS MEDIANTE EL  
DESARROLLO DE UN MÉTODO RÁPIDO**

**Por**

**M.C. LUISA YOLANDA SOLÍS SOTO**

**Como requisito parcial para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS con  
Acentuación en Microbiología**

**Marzo 2011**

**PREVALENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE  
*Campylobacter jejuni* y *C. coli* AISLADOS DE ALIMENTOS MEDIANTE EL  
DESARROLLO DE UN MÉTODO RÁPIDO**

**Aprobación de la Tesis:**

---

**Dra. Norma Laura Heredia Rojas**

**Director**

---

**Dr. Juan Francisco Contreras Cordero**

**Secretario**

---

**Dr. José Santos García Alvarado**

**Primer Vocal**

---

**Irene V. Wesley Ph.D.**

**Segundo Vocal**

---

**Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna**

**Tercer Vocal**

---

**Dra. Licet Villarreal Treviño**

**Suplente**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Norma Laura Heredia Rojas, la coordinación del Dr. José Santos García Alvarado y la asesoría de la Dra. Irene V. Wesley, Dr. Juan Francisco Contreras Cordero, Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna y la Dra. Licet Villarreal Treviño.

Este trabajo fue financiado por el programa SAGARPA-CONACYT y el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICyT) de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

## **DEDICATORIA**

### **A DIOS**

Por tercera ocasión y sin cansarme de escribirlo: *No hay tinta que alcance para agradecerte.*

### **A MIS PADRES**

Luis Raúl Solís Vázquez y María Yolanda Soto Ruiz...*por estar allí como los árboles...siempre fuertes...orgullosa de ser una rama de ustedes.*

### **A MI FAMILIA**

Lilián Adriana, Luis Raúl, Brenda Julieta Solís Soto y Tía Gloria Elva Soto...*por el metal de sus palabras y el amor de sus enseñanzas.*

### **A MI HIJA**

Valeria Rocha Solís...*por enseñarme que el amor verdadero existe.*

### **A MI PAREJA**

Juan Carlos Rocha Nieto...*por el tiempo perdido, el invertido, el ganado y....el compartido.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a **DIOS** por prestarme 28 años buenos...y los 3 años 9 meses mejores de mi vida. Por darme la paciencia para terminar este proyecto...y la fuerza y sabiduría para seguir con mi proyecto de vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por financiar este proyecto, siendo yo becaria y estar aprobado por SAGARPA-CONACYT.

A mis **padres** Luis R. Solís y Yolanda Soto, mis **hermanos** Lilián, Luis Raúl y Brenda Solís Soto así como mi **tía** Gloria Soto, por enseñarme que cuando todo se acabe ellos estarán siempre ahí, como hasta este momento. Dios no se equivoca, me prestó a la mejor familia...*siempre juntos*.

A la **Dra. Norma L. Heredia Rojas** y el **Dr. José Santos García Alvarado**, por dejarme permanecer en su equipo de trabajo, por las enseñanzas de la investigación y sobre todo las de la vida. Por ser así y dejarme ser así...*gracias*.

A la **Dra. Irene** y el **Dr. Ron Wesley**, por enseñarme a “querer” a esta bacteria, por dejarme entrar en su hogar, por enseñarme lo que en la investigación te puedes encontrar y sobre todo cómo enfrentar...*gracias siempre*.

A mi **amiga** la Dra. Ma. Guadalupe Rojas Verde, por estar aquí siempre...aun en la distancia o el tiempo mutilado. Por enseñarme que la tenacidad surte efecto. Tenemos lo que nos merecemos...*gracias infinitas*.

A mi **pareja** Juan Carlos Rocha Nieto, por todo el tiempo compartido, por las lágrimas y las risas, por el ayer y el hoy, por enseñarme que hay ocasiones en el que el dolor es muy fuerte...y a pesar de ello demostrarle que soy *guerrera e invencible*...*mil gracias*.

A todas las personas que de alguna manera, a lo largo de este tiempo de trabajo de tesis contribuyeron a que fuera mejor y que a pesar de todo fueron o son **COMPAÑEROS DE RUTA**: QBP. Brenda del Ángel, QBP. Rodolfo Cruz, QBP. Rocío Amador, MC. Rosa Ma. Casillas, MC. Sandra Castillo, MC. Eduardo Sánchez,

MC. Nydia Orué, Arturo Dávila, MC Diana Valtierra, sobre todo a QBP. Isaac Gil, QBP. Sagrario García, MC. Mayra Gómez y QBP. Omar Tovar...*gracias totales!*

A mi **pequeña familia** un agradecimiento especial: MC. Fabiola Venegas, QBP. Nereida Rivera, Alma Solís, Aldo Galván y Roberto Blancas...por todo lo bueno, lo malo, lo inevitable, las risas y los corajes, sobre todo porque gracias a ustedes sé que los amigos que no traicionan existen...*gracias de nuevo.*

Y finalmente y más importante, agradezco a Dios por prestarme a **mi mejor amiga** y **mi mejor sonrisa**...Valeria Rocha Solís. Gracias princesa por sufrir conmigo esta tesis, por revelarte en los muestreos desde tu primer mes de gestación hasta el nacimiento, por enseñarme a ser feliz, a reír cuando la lágrima es la mejor opción, a mantenerme en pie cuando creo que no vale la pena, por dejarme pasar los mejores años de mi vida a tu lado, por enseñarme que el amor verdadero existe, por demostrarle a la vida que hasta cuando lloras gozas. Gracias princesa por enseñarme día a día que esto también pasará ...tu por tu lado y yo por el mío somos fuertes...juntas somos invencibles. Pertenece a árboles fuertes...*gracias eternas.*

*Los árboles mueren de pie...*

*GRACIAS SINCERAS*

## TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA .....	4
AGRADECIMIENTOS .....	5
TABLA DE CONTENIDO .....	7
LISTA DE TABLAS .....	10
LISTA DE FIGURAS .....	12
NOMENCLATURA .....	14
RESUMEN .....	17
ABSTRACT.....	19
I. INTRODUCCIÓN.....	21
II. HIPÓTESIS.....	24
III. OBJETIVOS.....	25
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
IV. ANTECEDENTES.....	26
4.1 <i>Campylobacter</i> .....	26
4.1.1 Características generales.....	26
4.1.2 Morfología y fisiología .....	28
4.1.3 Microaerofilia .....	28
4.1.4 Potencial redox.....	29
4.1.5 Temperatura y pH de crecimiento.....	29
4.1.6 Susceptibilidad y metabolismo .....	30
4.1.7 Características genómicas.....	31
4.1.8 Factores de virulencia .....	32
4.2 Aspectos clínicos y epidemiología.....	33
4.3 Complicaciones.....	34
4.4 Reservorio y vía de transmisión.....	35
4.5 Aislamiento de <i>Campylobacter</i> .....	37
4.5.1 Composición básica de los medios .....	37
4.5.2 Formulación de medios de pre-enriquecimiento.....	39

4.5.3 Medios aeróbicos .....	43
4.6 <i>Campylobacter</i> en alimentos.....	47
4.7 <i>Campylobacter</i> en México .....	49
4.8 Resistencia a antibióticos .....	50
4.8.1 Mecanismo de resistencia .....	54
4.8.2 Resistencia a antibióticos de cepas de <i>Campylobacter</i> aisladas de alimentos .....	56
V. JUSTIFICACIÓN .....	58
VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....	60
6.1 Cepas bacterianas.....	60
6.2 Mantenimiento y activación de las cepas.....	60
6.3 Desarrollo de un medio de cultivo aeróbico .....	61
6.3.1 Caldos de enriquecimiento.....	61
6.3.2 Límite de detección y sensibilidad en la recuperación de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> .....	63
6.3.3 Ensayo de PCR .....	63
6.3.4 Influencia de la flora competidora para la recuperación de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> en los medios de enriquecimiento .....	65
6.3.5 Recuperación de <i>C. jejuni/coli</i> inoculada artificialmente en piel de pollo.....	67
6.3.6 Recuperación de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> inoculada artificialmente en carne de cerdo.....	68
6.4 Prevalencia de <i>Campylobacter</i> spp en muestras alimentos.....	68
6.4.1 Obtención de las muestras de carne de pollo .....	68
6.4.2 Obtención de las muestras de carne cerdo .....	69
6.4.3 Procesamiento de las muestras de alimentos .....	70
6.4.4 Calidad microbiológica de las muestras de alimentos .....	71
6.5 Determinación del perfil de resistencia a antimicrobianos de las cepas aisladas.....	72
6.6 Análisis estadístico.....	73
VII. RESULTADOS.....	74
7.1 Desarrollo de un medio de cultivo aeróbico .....	74
7.1.1 Límite de detección y sensibilidad en la recuperación de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> .....	76
7.1.2 Influencia de la flora competidora para la recuperación de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> en los medios de enriquecimiento .....	80
7.1.3 Recuperación de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> inoculada artificialmente en piel de pollo .....	82
7.1.4 Recuperación de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> inoculada artificialmente en carne de cerdo.....	85

7.2 Prevalencia de <i>Campylobacter</i> spp en muestras alimentos.....	86
7.2.1 Carne de pollo .....	86
7.2.2 Carne de cerdo .....	93
7.3 Calidad microbiológica de las muestras de alimentos .....	93
7.3.1 Carne pollo cruda.....	93
7.3.2 Carne pollo cocida .....	94
7.3.3 Carne de cerdo cruda.....	95
7.3.4 Carne de cerdo cocida.....	96
7.4 Determinación del perfil de resistencia a antimicrobianos de las cepas aisladas.....	96
VIII. DISCUSIÓN .....	101
IX. CONCLUSIONES.....	124
X. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS.....	126
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	127
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO .....	148

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Clasificación del género <i>Campylobacter</i>	27
2	Principales antimicrobianos y su blanco de acción	51
3	Composición de los caldos de enriquecimiento.	62
4	Oligonucleótidos usados para la confirmación de <i>C. jejuni/coli</i> .	64
5	Inóculo de cepas de <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> y <i>E. coli</i> a fin de comparar la influencia de la flora competidora en la recuperación de cepas de <i>Campylobacter</i> .	66
6	Relación de muestras analizadas	70
7	Nivel de detección de <i>Campylobacter</i> con respecto al inóculo detectado después del 48h de enriquecimiento en los caldos, mediante metodología tradicional y PCR.	78
8	Recuperación de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> en competencia con <i>E. coli</i> a las 48h de incubación de los caldos y 48h de incubación en agar Brucella-sangre a 42°C.	81
9	Recuperación de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> inoculada artificialmente en piel de pollo en mezclas a diferentes concentraciones (10 a 10 <sup>6</sup> UFC/ml). Detección a las 48 h de enriquecimiento mediante el método tradicional (siembra en agar Campy-Cefex) y por PCR.	83
10	Nivel de detección de <i>Campylobacter</i> inoculada artificialmente en la carne de cerdo utilizando diferentes medios de enriquecimiento incubados por 48 h y seguido de siembra en agar Campy-cefex por 48h a 42°C	85
11	Aislados de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> a partir de muestras de carne de pollo crudo empleando tres medios de enriquecimiento y siguiendo la metodología convencional y directo a PCR	90

Tabla		Página
12	Relación de las muestras positivas de pollo para <i>Campylobacter</i> , analizadas mediante 3 diferentes medios de enriquecimiento.	91
13	Número de muestras positivas de carne de pollo cruda para diferentes parámetros.	94
14	Número de muestras positivas de carne de pollo cocida para diferentes parámetros.	95
15	Número de muestras positivas de carne de cerdo cruda para diferentes parámetros.	95
16	Número de muestras positivas de carne de cerdo cocida para diferentes parámetros.	96
17	Zonas de inhibición mostrada por cepas de <i>Campylobacter</i> aislados a partir de carne de pollo cruda a diferentes antibióticos mediante la técnica de difusión en disco de acuerdo a National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).	97
18	Zonas de inhibición y patrón de sensibilidad a los antimicrobianos probados a concentraciones definidas sobre los aislados de <i>Campylobacter</i> usando la metodología de difusión en disco.	98
19	Perfil de resistencia a uno o más antimicrobianos de los aislados de <i>Campylobacter</i> .	100

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág
1	Algunos reservorios ambientales	36
2	Apariencia final de los caldos de enriquecimiento.	75
3	Detección de <i>C. coli</i> 75 inoculada a diferentes concentraciones (de 10 a $1 \times 10^8$ UFC/ml) en los caldos de enriquecimiento. Línea MPM: Marcador Peso molecular (HyperLadder IV, BIOLINE); línea 1-8: Caldo Preston; línea 9-16: Caldo Bolton; línea 17-24: Caldo BFEB; línea 25-32: Caldo M-BFEB (línea 29 no inoculada). <i>C. coli</i> : 894pb	79
4	Identificación de la mezcla de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> inoculada artificialmente en piel de pollo mediante la técnica de PCR directamente a partir de los caldos de enriquecimiento. Línea MPM: Marcador Peso molecular (HyperLadder IV, BIOLINE); línea 1-6: Caldo Preston ( $10$ a $10^6$ UFC/ml); línea 7-12: Caldo Bolton ( $10$ a $10^6$ UFC/ml); línea 13-18: Caldo BFEB ( $10$ a $10^6$ UFC/ml); línea 19-24: Caldo M-BFEB ( $10$ a $10^6$ UFC/ml). <i>C. coli</i> : 894pb, <i>C. jejuni</i> : 159pb, <i>C. jejuni/coli</i> : 400pb.	84
5	Número de muestras positivas de <i>C. jejuni</i> y/o <i>C. coli</i> a partir de los caldos de enriquecimiento siguiendo posteriormente la metodología tradicional.	87
6	Número de muestras positivas de <i>C. jejuni</i> y/o <i>C. coli</i> a partir de diferentes caldos de enriquecimiento siguiendo para su análisis la técnica de PCR.	89

Figura		Pág.
7	<p>Confirmación de los aislados de <i>Campylobacter</i> a partir de las muestras de pollo. Línea MPM: Marcador Peso molecular (HyperLadder IV, BIOLINE); línea 1 y 15: Cepa control <i>C. coli</i> 19; línea 2 y 14: cepa control <i>C. jejuni</i> NADC 5653; línea 3: Muestra 014T; línea 4: Muestra 062F; línea 5: Muestra M424; línea 6: Muestra 054B; línea 7: Muestra 034B; línea 8: Muestra 002B; línea 9: Muestra 060B; línea 10: Muestra 031CF; línea 11: Muestra 009B; línea 12: Muestra 074F; línea 13: Muestra 07CF; línea 16: Muestra 27PFF; línea 17: Muestra 009B; línea 18: Muestra BCO48h; línea 19: Muestra 31PVB; línea 20 y 21: Muestra 35PVB; línea 22: Muestra 61PVT; línea 23: Muestra 67PVB; línea 24: Muestra 68PVB. <i>C. coli</i>: 894pb, <i>C. jejuni</i>: 159pb, <i>C. jejuni/coli</i>: 400pb.</p>	92
8	<p>Patrón de resistencia y sensibilidad de los aislados probados contra los antimicrobianos.</p>	99

## NOMENCLATURA

%	Por ciento, porcentaje
β-	Beta
°C	Grados Celsius
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
ABS	Absorbancia
ATCC	American Type Culture Collection, Colección Americana de Cultivos Tipo
BAM	Bacteriological Analytical Manual, Manual de Bacteriología Analítica
BFEB	Blood Free Enrichment Broth, Caldo libre de sangre
bv.	Biovar
CCDA	Campy Blood-Free Selective Medium, medio selectivo para <i>Campylobacter</i> libre de sangre
CDC	Center for Disease Control, Centro para el Control de Enfermedades
CDT	Cytolethal distending toxin, toxina citoletal distensora
CEB	<i>Campylobacter</i> Enrichment Broth, caldo de enriquecimiento de <i>Campylobacter</i>
células/g	Células por gramo
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DNA	Desoxirribonucleic acid, ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid, ácido etile-diamino tetraacético
EE. UU	Estados Unidos
<i>et al.</i>	Y otros
FDA	Food and Drug Administration, Administración de Drogas y Alimentos
g	Gramo
G+C	Guanina-Citosina
h	Hora

HCl	Ácido Clorhídrico
ICC	Infusión cerebro-corazón
ICC+EL	Infusión cerebro-corazón con extracto de levadura
ISO	International Organization for Standardization, Organización Internacional de Estandarización
KCl	Cloruro de potasio
L	Litro
LOS	Lipooligosacárido
M-BFEB	Modified-Blood Free Enrichment Broth, Caldo libre de sangre modificado
MHS	Mueller-Hinton Sangre
miliQ	Agua miliQ, agua milipura
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de sodio
NADC	National Animal Disease Center, Centro Nacional de Enfermedades Animales
nm	Nanómetro
NMP/g	Número más probable por gramo
NOM	Norma Oficial Mexicana
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial hidrógeno
PHLS	Public Health Laboratory Service, Laboratorio de salud pública de servicio
p/v	Concentración peso-volumen
RNAr	Ribonucleic acid ribosomal, ácido ribonucleico ribosomal
s	Segundos
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
spp	Especies

SSA	Secretaría de Salubridad y Asistencia
Subsp	Subespecie
U	Unidades
UFC/g	Unidades formadoras de colonias por gramo
UFC/ml	Unidades formadoras de colonias por mililitro
UK	United King, Reino Unido
V	Volts
v/v	Concentración volumen/volumen
<i>x g</i>	Unidades de gravedad

## RESUMEN

La naturaleza microaerofílica de *Campylobacter* y su requerimiento del 5% de O<sub>2</sub> para su crecimiento hacen difícil su recuperación a partir de alimentos. La adición al medio de pre-enriquecimiento de compuestos secuestrantes de oxígeno tales como el carbón activado o la sangre podría interferir con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para su detección. En este trabajo realizamos un método rápido para la identificación de *Campylobacter jejuni* y *C. coli* usando un medio de pre-enriquecimiento aeróbico y la técnica de PCR. Se realizó un caldo basado en la formulación libre de sangre propuesta por Tran en 1998 (Blood Free Enrichment, BFEB), sin embargo a nuestro medio (M-BFEB) se le excluyó el carbón activado y se comparó con la formulación original y otros caldos de enriquecimiento (M-BFEB). *C. jejuni* y *C. coli* se identificaron por PCR a partir de los medios de enriquecimiento. Diversos niveles de cultivos puros de *C. jejuni* y *C. coli* se combinaron con *Escherichia coli* y se inocularon en caldos Preston, Bolton, BFEB y el BFEB modificado (M-BFEB). Además, *Campylobacter* se inoculó en piel de pollo y su recuperación fue cuantificada. La tasa de recuperación se determinó después de 24-48 h de enriquecimiento a 42°C bajo condiciones aeróbicas para los caldos BFEB y M-BFEB y microaeróbicas para los caldos Preston y Bolton.

En promedio, los resultados indicaron que el medio más sensible para la recuperación de *C. jejuni* y *C. coli* fue el Bolton, seguido ya sea por el BFEB o M-BFEB, el menos sensible fue el Preston. El M-BFEB se acopló directamente a PCR evitando la siembra en placa. *Campylobacter* se detectó en presencia de 10<sup>8</sup> células de *E. coli*. El medio M-BFEB facilitó la detección de *C. jejuni* y *C. coli* inoculada artificialmente en piel de pollo. En estos ensayos de manera global, no hubo diferencia significativa en la detección de *C. jejuni* y *C. coli* mediante ya sea metodología convencional o PCR. Empleando los cuatro medios de cultivo se determinó el nivel de recuperación de estos patógenos en la carne de cerdo por metodología convencional encontrando que los medios Bolton, BFEB y M-BFEB fueron igualmente sensibles en la recuperación para estos patógenos, en tanto que el medio Preston fue el menos sensible.

Asimismo, se estableció la prevalencia de *C. jejuni* y *C. coli* en muestras de alimentos siendo éstos carne cruda y cocida de pollo y cerdo mediante microbiología convencional y el método de PCR directamente de los caldos de enriquecimiento. El porcentaje de la presencia de estos patógenos en 204 muestras analizadas de pollo crudo fue de 9.8 y 41.6% mediante siembra y PCR respectivamente. Al analizar muestras de carne de pollo cocida y cerdo crudo y cocido no se detectó al microorganismo en ninguna muestra por ninguna metodología.

Actualmente la resistencia a antimicrobianos ha emergido en cepas de *Campylobacter* y se han elucidado algunos de los mecanismos responsables de ello. En el presente estudio, todos los aislados fueron probados contra siete antimicrobianos usados potencialmente para el tratamiento de campylobacteriosis, encontrando que las cepas mostraron mayor resistencia al ácido nalidíxico y la tetraciclina y menor para ampicilina.

## ABSTRACT

Campylobacteriosis is one of the most important causes of foodborne diseases in many countries and antimicrobial resistance has emerged in strains of *Campylobacter*. The microaerophilic nature of *Campylobacter* and its requirement of 5% O<sub>2</sub> for growth have complicated its recovery from foods. The addition to the enrichment media of oxygen quenchers such as charcoal or blood could interfere with PCR for its detection. In this study, a two-step simple aerobic method for *Campylobacter* detection is proposed.

In this study, a modification of the Tran blood-free enrichment broth (BFEB), in which charcoal was excluded from the medium (M-BFEB), was compared with the original formulation and other enrichment broths. *Campylobacter jejuni* and *C. coli* were screened by PCR directly from the enrichment media. Various levels of pure cultures of *C. jejuni* and *C. coli* combined with *Escherichia coli* were inoculated into Preston, Bolton, BFEB, and the modified BFEB (M-BFEB). In addition, *Campylobacter* was inoculated onto retail purchased chicken skin and recovery was quantified. Rates of recovery after 24 to 48 h of enrichment at 42°C under aerobic incubation for BFEB and M-BFEB and microaerobic incubations for Preston and Bolton broths were determined. The four culture media were used to determine the level of recovery of these pathogens in pork, applying conventional methodology. Bolton, BFEB and M-BFEB were equally sensitive in recovering these pathogens, whereas Preston was least sensitive.

The prevalence of *C. jejuni* and *C. coli* in raw and cooked chicken and pork was also established using conventional and PCR methods directly from enrichment broths. All isolates were tested against seven antimicrobial agents used for the treatment of campylobacteriosis.

Overall, our results indicated that the most sensitive medium was Bolton's, followed by either BFEB or M-BFEB; the least sensitive was Preston's. M-BFEB was directly coupled to a PCR assay to detect *Campylobacter*, avoiding intermediate plating. *Campylobacter* was detected in the presence of up to 10<sup>8</sup> *E. coli* cells/ml. M-BFEB facilitated detection of both *C. jejuni* and *C. coli* artificially inoculated onto chicken skin

samples. M-BFEB coupled to PCR is a rapid and attractive alternative for isolation and identification of *C. coli* and *C. jejuni* from poultry.

Analyses of 204 raw chicken samples by plating and PCR, showed the presence of these pathogens in 9.8 and 41.6% of the samples respectively. The microorganisms were not detected in samples of cooked chicken and raw and cooked pork by any method. Resistance to nalidixic acid and tetracycline was the most observed and to ampicillin the less frequent.

## I. INTRODUCCIÓN

*Campylobacter* spp es un microorganismo principalmente presente en el tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente como la mayoría de los utilizados por el hombre como alimento. Esta bacteria no se multiplica efectivamente en la mayoría de los alimentos, sin embargo, puede sobrevivir en los mismos y debido a la baja dosis infecciosa (500 células o menos) puede ser asociado con enfermedad en humanos, por lo que la proliferación en los alimentos no es un prerrequisito para la infección (Food Safety Authority of Ireland, 2002).

La contaminación de alimentos, como vegetales y ensaladas, puede ocurrir a través del contacto con heces de animales durante la cosecha, por el contacto con agua contaminada, o bien, por contaminación cruzada en el momento de su preparación. Aunque muchos alimentos pueden estar contaminados con este microorganismo, actualmente se considera la contaminación de aves de corral y cerdos así como los alimentos derivados de éstos, los que tienen mayor importancia como fuente de infección humana (Food Safety Authority of Ireland, 2002).

La gastroenteritis aguda con diarrea y/o vómito es la característica principal de una infección por *Campylobacter* spp (conocida como campylobacteriosis) sin embargo, estos mismos síntomas son provocados por otros microorganismos tales como *Salmonella* y *Shigella*. En la mayoría de los casos la enfermedad es autolimitante, sin embargo en ocasiones puede generar complicaciones severas, sobre todo neurológicas, tales como el Síndrome de Guillain-Barré y el síndrome de Reiter.

Las características clínicas de la gastroenteritis por *Campylobacter* no permiten la diferenciación de otras causas de gastroenteritis y por lo tanto la confirmación en el laboratorio es de suma importancia.

En la actualidad, la información disponible concerniente a los niveles de contaminación de productos cárnicos por *C. jejuni* y *C. coli* proviene de países desarrollados, no así de México, de ahí la necesidad de investigar la incidencia y prevalencia de estas bacterias en alimentos como carne de cerdo y pollo.

La carne de cerdo y pollo, así como sus derivados, comprenden un alimento de elección en nuestra región, debido a su fácil adquisición y sobre todo al bajo costo de éstos en comparación con otros productos cárnicos tales como la carne de res. Y con conocimiento de que *C. jejuni* y *C. coli* son bacterias que se encuentran principalmente en este tipo de productos cárnicos y sobre todo de su patogenicidad, esta investigación va enfocada a determinar el nivel de frecuencia y prevalencia de estos microorganismos en este tipo de alimentos.

Aunado a lo anterior, en México no existe una regulación sanitaria de patógenos como *Campylobacter* spp, en parte por el desconocimiento que hay sobre esta bacteria, así también debido a que los métodos actuales para su identificación y tipificación tienen muchas limitaciones. Aún más, muchos laboratorios clínicos no tienen las facilidades y los recursos para identificar a este tipo de microorganismos debido a su exigencia para el aislamiento, ya que al ser una bacteria de naturaleza microaerofílica, es decir, que requiere una atmósfera específica para su desarrollo, además, de la necesidad de usar medios de cultivo suplementados con antibióticos, lo cual eleva significativamente su costo y hacen que la búsqueda de este patógeno no sea una práctica rutinaria.

Dada la complejidad y problemática para el aislamiento de *Campylobacter* ya sea a partir de heces, alimentos o muestras ambientales, se hace imprescindible la necesidad de desarrollar un medio de cultivo que no requiera de la incubación bajo una atmósfera microaerofílica minimizando así los costos y el tiempo para el aislamiento de este microorganismo.

Además, la identificación de patógenos como *Campylobacter*, requieren de hasta siete días, lo cual hace muy tardada la entrega de resultados y por ende, no se pueden

tomar acciones correctivas inmediatas por lo cual en este trabajo también nos propusimos acoplar el enriquecimiento a un método molecular y rápido para la detección oportuna del patógeno.

Por último, la resistencia que han desarrollado los microorganismos a ciertos antimicrobianos resulta un problema grave para la población. Hasta el momento existen varios reportes donde se ha mostrado que *C. jejuni* y *C. coli* han adquirido resistencia a antimicrobianos comúnmente prescritos por médicos, así como a los usados comúnmente en la dieta de animales. En este rubro, en nuestro país no se cuenta con reportes sobre la susceptibilidad a antimicrobianos de las cepas nativas, por lo que resulta de gran importancia su estudio.

## II. HIPÓTESIS

Es posible desarrollar un método rápido para la búsqueda e identificación de *Campylobacter jejuni* y *C. coli* a partir de alimentos, para en un análisis posterior determinar el perfil de susceptibilidad a antimicrobianos de las cepas circulantes en nuestro medio.

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la prevalencia y perfil de resistencia a antimicrobianos de cepas de *Campylobacter jejuni* y *C. coli* aisladas de muestras de alimentos en nuestra región mediante el desarrollo de un método rápido de identificación.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Desarrollar un medio de cultivo (enriquecimiento) que no requiera una incubación en atmósfera microaerofílica y que permita el crecimiento de *Campylobacter jejuni* y *C. coli* a partir de alimentos.
2. Acoplar el medio de enriquecimiento a un método de biología molecular (reacción en cadena de la polimerasa, PCR) para la identificación de las cepas de *C. jejuni* y *C. coli*.
3. Determinar la prevalencia de *C. jejuni* y *C. coli* en muestras de carne de cerdo y pollo cruda y cocida.
4. Determinar el perfil de resistencia a antimicrobianos de las cepas de *Campylobacter* aisladas.

## IV. ANTECEDENTES

### 4.1 *Campylobacter*

#### 4.1.1 Características generales

*Campylobacter* spp pertenece a la familia *Campylobacteriaceae*, la cual, a su vez incluye los géneros *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Sulfospirillum* y los mal clasificados *Bacteroides ureolyticus*. Son bacterias Gram negativas, no sacarolíticas con requerimientos microaerofílicos para su crecimiento y bajo contenido de bases G+C (30%) (Nachamkin *et al.*, 2008).

En el inicio del siglo XX, el microorganismo se conoció como *Vibrio fetus* siendo responsable de aborto espontáneo en bovinos y ovejas. Sin embargo, este organismo difiere de las especies de *Vibrio* ya que no puede crecer bajo condiciones atmosféricas de oxígeno ni fermentar azúcares. Fue así como en 1963, Sebald y Veron propusieron el nombre *Campylobacter* con la finalidad de diferenciarlo de *Vibrio* spp (Catteau, 1995). Aunque las primeras especies de este género se identificaron hace más de 90 años en animales, no fue sino hasta 1970 cuando finalmente se reconoció como patógeno humano (Koneman, 1997).

Aunque la clasificación de estas bacterias está en continua revisión y modificación, actualmente se consideran 18 especies dentro del género *Campylobacter* (Tabla 1) además de subespecies y biovariedades.

Tabla 1. Clasificación del género *Campylobacter*.

GÉNERO	ESPECIE	SUBESPECIE (subsp.)	BIOVAR (bv.)
<i>Campylobacter</i>	<i>canadensis</i>		
<i>Campylobacter</i>	<i>coli</i>		
<i>Campylobacter</i>	<i>concisus</i>		
<i>Campylobacter</i>	<i>curvus</i>		
<i>Campylobacter</i>	<i>fetus</i>	<i>fetus</i>	
<i>Campylobacter</i>		<i>venerealis</i>	
<i>Campylobacter</i>	<i>gracilis</i>		
<i>Campylobacter</i>	<i>helveticus</i>		
<i>Campylobacter</i>	<i>hominis</i>		
<i>Campylobacter</i>	<i>hyointestinalis</i>	<i>hyointestinalis</i>	
<i>Campylobacter</i>		<i>lawsonii</i>	
<i>Campylobacter</i>	<i>insulaenigrae</i>		
<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>	<i>doylei</i>	
<i>Campylobacter</i>		<i>jejuni</i>	
<i>Campylobacter</i>	<i>lanienae</i>		
<i>Campylobacter</i>	<i>lari</i>		
<i>Campylobacter</i>	<i>mucosalis</i>		
<i>Campylobacter</i>	<i>rectus</i>		
<i>Campylobacter</i>	<i>showae</i>		
<i>Campylobacter</i>	<i>sputorum</i>		<i>bubulus</i>
<i>Campylobacter</i>			<i>sputorum</i>
<i>Campylobacter</i>			<i>paraureolyticus</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>upsaliensis</i>		

Fuente: Koong Hong Teh, 2008.

Dentro del género *Campylobacter* se encuentran diversas especies, sin embargo, las bacterias enteropatógenas más importantes para humanos son *C. jejuni* y *C. coli* y en menor grado, *C. lari* y *C. upsaliensis* (Koneman, 1997). De estas especies, *C. jejuni* es responsable del 80-85% de todas las infecciones debidas a este género, en tanto que *C. coli* es la segunda especie más aislada (10 a 15%) (Lastovica and Le Roux, 2001).

#### 4.1.2 Morfología y fisiología

*Campylobacter* spp son bacilos Gram negativos, pequeños, con forma de espiral y aspecto de *Vibrio* cuando se observan a partir de cultivos jóvenes. Dichos bacilos miden de 0.2 a 0.5 micras de ancho y 0.5 a 5 micras de largo pudiendo llegar a 8 micras (Holt *et al.*, 1994). Observados bajo el microscopio, estos microorganismos poseen una movilidad característica tipo “sacacorchos” debido a que poseen un flagelo polar en uno o ambos extremos de la célula. Por la presencia de estos flagelos las células son altamente móviles, sin embargo, *C. gracilis* es inmóvil, a diferencia de *C. showae* que posee múltiples flagelos (Nachamkin *et al.*, 2008).

Dos morfologías de *C. jejuni* se han descrito; forma espiral cultivable y forma cocoide no cultivable. Algunos estudios han demostrado que la transición de la forma espiral a curva depende de muchos factores, tales como la cepa, temperatura, pH, osmolaridad y medio de cultivo (Lazaro *et al.*, 1999). Aunque también, con más de 48 h de incubación o tras una prolongada exposición al aire adoptan una forma cocoide (Koneman, 1997). A pesar de lo anterior, *Campylobacter* es capaz de sobrevivir por periodos prolongados con exposición a concentraciones aeróbicas de oxígeno, estrés osmótico y de temperatura teniendo capacidad de cambiar de su forma espiral a cocoide después de una exposición a algún estrés (Rollins and Colwell, 1986).

#### 4.1.3 Microaerofilia

Las campylobacterias son organismos microaerófilicos, requiriendo una concentración de oxígeno de 5 a 7% y de 5 a 10% de dióxido de carbono para su crecimiento (van Vliet and Ketley, 2001), aunque algunas especies se han encontrado que pueden crecer bajo condiciones anaeróbicas o aeróbicas (Everest and Ketley, 2002).

La exposición al oxígeno, al mismo tiempo inevitable para bacterias patógenas, conduce a la formación de intermediarios reactivos de oxígeno (ROI), como los radicales superóxido. Si estos agentes altamente reactivos no son neutralizados, puede ocurrir un daño letal a los ácidos nucleicos, proteínas y membranas. En consecuencia, como una respuesta contra distintos y excesivos ROI, muchas células procariontas son

capaces de inducir la síntesis de enzimas antioxidantes. A pesar de que *Campylobacter* es capaz de crecer en presencia de aire en determinadas condiciones (Jones *et al.*, 1993), estos microorganismos por su naturaleza microaerofílica, tienen una sensibilidad inherente hacia el oxígeno y sus productos reducidos.

Por lo tanto, la síntesis de enzimas capaces de minimizar el efecto dañino causado por exposición al oxígeno así como sus especies reactivas juega un papel importante en la sobrevivencia bacteriana. Una serie de enzimas, como la superóxido dismutasa (SOD) (Purdy and Park, 1994; Pesci *et al.*, 1994; Purdy *et al.*, 1999), hidropéroxido reductasa alquilo (AHP) (Baillon *et al.*, 1999), y la catalasa (katA) (Grant and Park, 1995), representan un sistema de defensa contra la oxidación en *Campylobacter*.

#### **4.1.4 Potencial redox**

El potencial redox (Eh) o potencial de oxidación-reducción es la medida de la habilidad de los sustratos de ganar o perder electrones. El potencial redox se define como la relación del poder oxidante (aceptar electrones) y el poder total reductor de un alimento (Jay *et al.*, 2005). Cuando los electrones se transfieren entre dos compuestos una diferencia de potencial se crea entre ellos. Esta diferencia que puede ser medida por un instrumento y expresado en milivolts (mV) es el potencial redox (Jay *et al.*, 2005).

Productos altamente oxidados tendrán un valor positivo de Eh (+Eh) y los productos altamente reducidos tendrán valores negativos (-Eh). Generalmente, las bacterias aerobias pueden tolerar altos valores de Eh mejor que los anaerobios que requiere valores negativos de Eh para su desarrollo. Bacterias microaerofílicas como *Lactobacillus* y *Campylobacter* crecen bien bajo condiciones levemente reducidas. Los rangos de Eh para el crecimiento microbiano son +500 a +300mV para aerobios, +300 a -100mV para anaerobios facultativos y +100 a -250mV para anaerobios (Ray, 2001)

#### **4.1.5 Temperatura y pH de crecimiento**

*Campylobacter* spp posee un rango amplio de temperatura de crecimiento, de 37 a 42°C y no es capaz de desarrollarse por debajo de los 30°C (Lee *et al.*, 1998), sin

embargo, se ha encontrado que posee actividad fisiológica a 4°C (Hazeleger *et al.*, 1998). La temperatura óptima para *C. jejuni* y *C. coli* es de 42°C, lo cual probablemente refleja una adaptación al intestino de animales de sangre caliente (van Vliet and Ketley, 2001). A pesar de su carácter termófilo, se ha encontrado que la muerte celular ocurre a 56-57°C (Nguyen *et al.*, 2006).

Así mismo, se ha determinado que el rango de pH óptimo para el desarrollo de este microorganismo es de 6.5 a 7.5, sin embargo, puede crecer en un rango de 4.9 a 9 (Anónimo, 2001). Aunado a esto, Blaser *et al.*, en 1980 reportaron que *C. jejuni* era incapaz de desarrollarse a un pH debajo de 4.9 (Blaser *et al.*, 1980).

#### **4.1.6 Susceptibilidad y metabolismo**

Con respecto a la susceptibilidad de este microorganismo, se ha reportado que es altamente susceptible a diversas condiciones medio-ambientales siendo con ello menos capaz de tolerar estrés ambiental que otros patógenos transmitidos por alimentos. *Campylobacter* spp es muy sensible a la desecación a esta condición no sobreviviendo en superficies secas (Fernández *et al.*, 1985). Similarmente, estos microorganismos son más sensibles al estrés osmótico que otros patógenos y no crecen en concentraciones de NaCl de 2% (Doyle and Roman, 1982).

Con respecto a su metabolismo, miembros del género *Campylobacter* no son capaces de fermentar ni oxidar carbohidratos, en su lugar, obtienen su energía de la degradación de aminoácidos o intermediarios del ciclo del ácido tricarbóxico (Vandamme, 2000).

En general, entre las características bioquímicas para los miembros de este género se encuentran que varias especies pueden crecer en condiciones anaeróbicas con fumarato o nitrato como aceptor final de electrones. Estas especies crecen sólo en condiciones microaeróbicas si el hidrógeno, formato o succinato es suplementado como fuente de electrones. La gelatina, caseína, almidón y tirosina no son hidrolizadas por el género. La actividad de oxidasa está presente en todas las especies, excepto en *C.*

*gracilis*, además no manifiestan actividad de lipasa o lecitinasa (Nachamkin *et al.*, 2008).

Las especies de *Campylobacter* mayormente asociadas a enfermedades transmitidas por alimentos, como anteriormente se había mencionado, son *C. jejuni* y *C. coli*, las cuales, fisiológicamente solo se diferencian por microbiología convencional mediante la prueba de hidrólisis del hipurato, en la que *C. jejuni* da una reacción positiva. Sin embargo, cepas hipurato-negativas de esta especie también pueden presentarse, por lo que existe la posibilidad de proporcionar falsos positivos para especies no-*C. jejuni*, por lo que se hace inminente la necesidad de utilizar otras estrategias para lograr una identificación más exacta (On and Jordan, 2003).

#### **4.1.7 Características genómicas**

Con respecto a su naturaleza genómica, gracias a la secuenciación total de su genoma en el año 2000 se estableció que *C. jejuni* tiene un genoma relativamente pequeño (1.6 a 2 megabases) rico en adenina-timina, la relación guanina-citosina es de 30% (Parkhill *et al.*, 2000; Vandamme 2000). Con ello, también se determinó que este microorganismo posee una extensa variación genética, la cual ha surgido de la alta frecuencia de mecanismos intragenómicos así como el intercambio entre cepas.

*C. jejuni* es naturalmente competente, es decir que puede tomar DNA del medio ambiente, conllevando a la recombinación entre cepas y permitiendo la generación de una gran diversidad genética. La transferencia horizontal de DNA cromosomal y plasmídico ocurre tanto *in vitro* como durante la colonización del pollo, lo cual indica que la transformación natural podría jugar un papel importante en el genoma y en la transmisión de nuevos factores, tales como la resistencia a antibióticos aun en ausencia de presión de selección (Boer *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2003; Avrain *et al.*, 2004).

#### 4.1.8 Factores de virulencia

Poco a poco se han elucidado los factores de virulencia de *C. jejuni* ya que hace 10 años poco se sabía de la patogenia de este microorganismo. A continuación se mencionan brevemente los principales factores de virulencia asociados a este patógeno.

a) Flagelo: *Campylobacter* spp se caracteriza por un movimiento rápido, el cual es debido a la presencia de uno o dos flagelos polares cuyas estructuras han sido reconocidas como factores cruciales en la patogénesis. Estructuralmente, está compuesto de una flagelina mayor y una menor, flagelina FlaA y FlaB respectivamente, ambas codificadas por dos genes en tándem (*flaA* y *flaB*) (Guerry 2007; Nuijten *et al.*, 1990; Guerry *et al.*, 1991).

b) Quimiotaxis: la frecuencia de los cambios de dirección que se producen durante el movimiento bacteriano en respuesta a señales extracelulares, y se regula por la rotación alterna del flagelo hacia la derecha e izquierda. El resultado neto de este proceso es llamado quimiotaxis y permite a la bacteria moverse o nadar hacia entornos favorables y lejos del ambiente desfavorable (Young *et al.*, 2007). Para el caso de *C. jejuni*, las sustancias quimiotrayentes incluyen componentes de la mucina como la L-fucosa y L-serina, así como ciertos ácidos orgánicos (por ejemplo piruvato y succinato) (Hugdahl *et al.*, 1988).

c) Invasión y adhesión: la penetración a la mucosa intestinal juega un papel vital en la patogénesis de *Campylobacter* ya que dicho microorganismo se adhiere al epitelio intestinal y se internaliza (Fauchere *et al.*, 1986; Grant *et al.*, 1993). La translocación de *C. jejuni* a través de la barrera epitelial refleja el mecanismo por el cual la bacteria obtiene acceso a la mucosa intestinal causándole daño, inflamación y por lo tanto gastroenteritis. Los factores de virulencia a través de los cuales *Campylobacter* se adhiere a la célula epitelial incluyen proteínas, el flagelo y el lipooligosacárido (LOS) (Grant *et al.*, 1993).

d) Lipooligosacárido (LOS) y cápsula: consistente con el papel de evadir la respuesta inmune del huésped, el LOS de *C. jejuni* es altamente variable. Diversas estructuras de LOS son similares a los gangliósidos neuronales, conteniendo ácido siálico. Tal mimetismo molecular lleva a una complicación autoinmune llamada síndrome de Guillain-Barré (SGB) y el síndrome de Miller-Fisher (Karlyshev *et al.*, 2000).

e) Toxinas: *C. jejuni* produce una toxina de mayor importancia llamada toxina citoletal distensora (CDT), la cual, también es producida por un diverso grupo de otras especies bacterianas incluyendo *E. coli*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus ducreyi* y *Helicobacter hepaticus*. La toxina causa un arresto en la transición G1/S o G2/M del ciclo celular dependiendo del tipo de célula (Whitehouse *et al.*, 1998; Lara-Tejero and Galan 2000; Hassane *et al.*, 2001).

#### **4.2 Aspectos clínicos y epidemiología**

El término campylobacteriosis se refiere a un grupo de infecciones causadas por bacterias del género *Campylobacter* que afectan tanto a humanos como a animales, constituyendo una zoonosis de distribución mundial.

La dosis infecciosa *C. jejuni* y *C. coli* en humanos para causar la enfermedad puede ser tan baja como 500 células (Robinson, 1981). Dicha enfermedad ocurre principalmente en niños menores de cinco años y en adultos jóvenes de 15 a 29 años. La tasa de incidencia varía según la estación del año o la región. Con esto, la presentación clínica de pacientes con campylobacteriosis difiere entre países en vías de desarrollo e industrializados (Ketley, 1997).

La enfermedad generalmente comienza con fiebre asociada a malestar sistémico con dolor de cabeza. Estos síntomas a veces preceden a la aparición de los síntomas abdominales y los vómitos también pueden ocurrir. Los calambres abdominales y los demás síntomas se asemejan a los de una apendicitis aguda (Altekruse *et al.*, 1999; Catteau, 1995). Los síntomas generalmente se resuelven en una semana, aunque la

excreción del microorganismo dura en promedio 16 días. Los bebés excretan los organismos durante más tiempo que los niños mayores (media, 14 días en niños contra 8 días en niños de 1 a 5 años) (Taylor and Courvalin, 1988).

Los pacientes con campylobacteriosis usualmente se recuperan sin necesidad de terapia antimicrobiana. Sin embargo, el tratamiento se indica en algunos pacientes con enfermedad prolongada, en las que la eritromicina o ciprofloxacina son los tratamientos de elección, seguidos de tetraciclina y doxiciclina como antibióticos alternativos (Ge *et al.*, 2003).

### **4.3 Complicaciones**

Aunque generalmente no hay complicaciones posteriores, en un 15-20% de los casos se pueden producir recaídas y en un porcentaje mucho menor, algunas secuelas más graves (García-Peña *et al.*, sin año).

a) Síndrome de Guillain-Barré (SGB): es una neuropatía caracterizada por parálisis muscular flácida, sensación de ardor, dolor y debilidad muscular. Esta complicación ocurre en 1 de cada 1000 casos de campylobacteriosis (Nachamkin *et al.*, 1998). Hallazgos serológicos y cultivos indican que del 30 al 40% de los pacientes con SGB tuvieron una infección por *C. jejuni* (Komagamine and Yuki, 2006). Este síndrome es severo y posee una tasa de mortalidad de 2% mientras que el porcentaje restante se recupera parcial o totalmente (Briscoe *et al.*, 1987).

b) Artritis reactiva y síndrome de Reiter: es un proceso que se presenta en un 1 a 7% de infecciones por *Campylobacter*. Se trata de un proceso post-infeccioso que se manifiesta normalmente entre los 7 y 14 días después del comienzo de los síntomas. La duración de la artritis oscila desde varias semanas hasta un año y aunque puede llegar a ser incapacitante, el pronóstico suele ser bueno (Yu *et al.*, 2003; García-Peña *et al.*, sin año). Cuando la artritis reactiva forma parte de una triada de síntomas acompañándose de uretritis y conjuntivitis, el proceso se denomina síndrome de Reiter (García-Peña *et al.*, sin año).

c) Síndrome de Miller-Fisher: es una variante de SGB y se caracteriza por oftalmoplejía, ataxia y arreflexia, también se ha asociado con *C. jejuni* (Neisser *et al.*, 1997).

#### **4.4 Reservorio y vía de transmisión**

Varias especies de *Campylobacter* se encuentran como comensales en el tracto gastrointestinal de animales salvajes y domésticos. Los principales reservorios lo constituyen el ganado bovino, ovino, suino, roedores, todas las aves de corral, perros y gatos. Sin embargo, el espectro de reservorios varía con la especie: *C. jejuni* tiene un reservorio amplio, encontrándose principalmente en pollos, mientras que *C. coli* es más frecuentemente aislada en suinos (Blaser, 2000).

Una vez que *Campylobacter* es considerada como flora normal en muchos mamíferos y aves, la habilidad de estas bacterias para crecer a 42°C probablemente refleja su adaptación al intestino aviar. *Campylobacter* parece colonizar permanentemente el tracto gastrointestinal de las aves, sin embargo, éstas no manifiestan la enfermedad o en ocasiones solo se observa una diarrea leve en animales jóvenes, conduciendo a éstos a un estado de portador de por vida (Newell, 2001; Blaser, 2000).

Se ha reportado una alta tasa de nivel bacteriano en patos y gansos, además, *Campylobacter* puede sobrevivir en el agua durante semanas, por lo cual, esta agua puede ser una fuente de infección para los animales domésticos. Con respecto a esto, un estudio realizado por Axelsson-Olson *et al.*, en el 2005, demostraron que *C. jejuni* es capaz de infectar a un protozoario llamado *Acanthamoeba polyphaga* y no solo sobrevivir dentro de él, sino recuperar su viabilidad. Estos resultados muestran que este parásito puede ser un reservorio invertebrado para *C. jejuni* en el ambiente.

El vasto reservorio animal es probablemente la fuente de la mayoría de las infecciones humanas. La contaminación fecal de carne a menudo ocurre durante el

sacrificio de los animales y la infección humana usualmente se adquiere a través del consumo de carne contaminada mal cocinada o por contaminación cruzada en alimentos. Sin embargo, *Campylobacter* spp también puede adquirirse a través de leche no pasteurizada o agua contaminada y posiblemente de las mascotas domésticas con diarrea (van Vliet and Ketley, 2001).

Diversos reservorios ambientales pueden conducir a la infección humana por *C. jejuni*. Esta bacteria coloniza el tracto gastrointestinal del pollo principalmente en la capa mucosa y se transmite entre los pollos dentro de un rebaño vía fecal-oral. *C. jejuni* puede entrar en el suministro de agua, donde se puede asociar con protozoos como amibas de agua dulce y posiblemente formar biofilm. También puede infectar a los humanos directamente a través del agua potable o por el consumo de productos animales contaminados, tales como la leche no pasteurizada o la carne, particularmente las aves de corral. En los humanos, *C. jejuni* puede invadir la capa del epitelio intestinal, resultando en inflamación y diarrea (Fig. 1) (Young *et al.*, 2007).

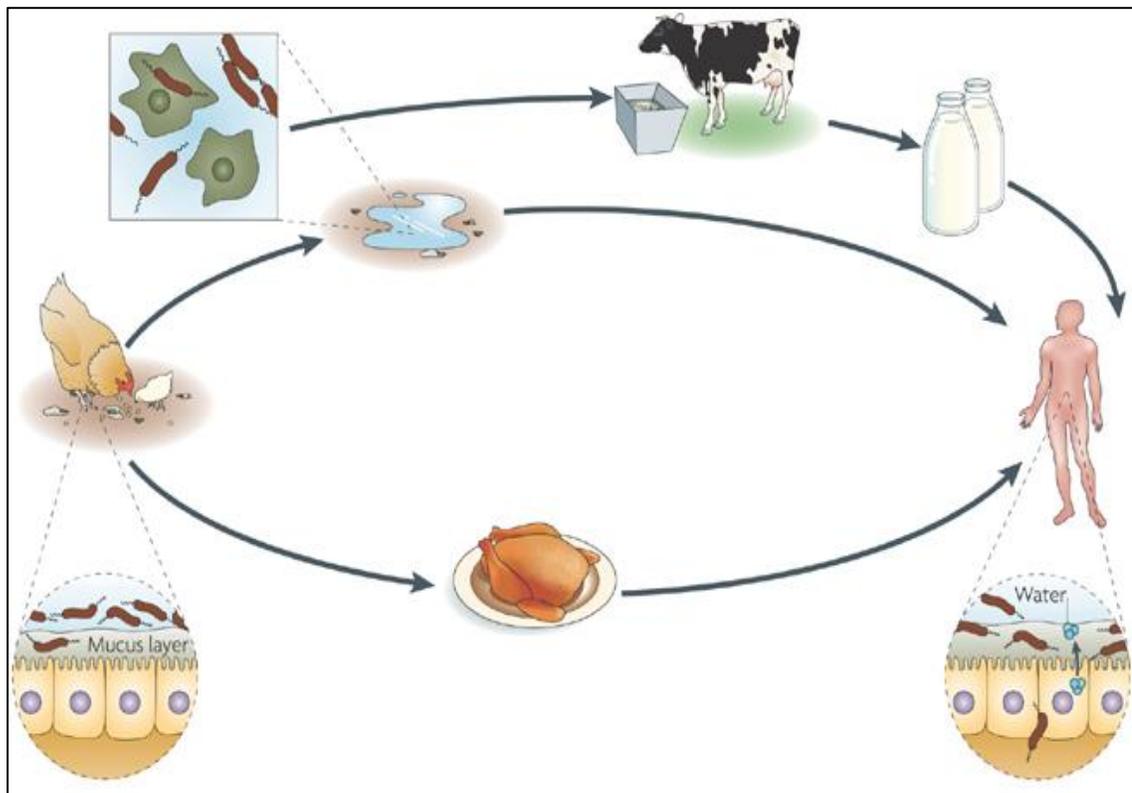


Fig. 1. Algunos reservorios ambientales.

Han sido propuestos cuatro modos de transmisión para explicar la presencia de *Campylobacter* como fuente de infección para humanos: contacto Animal–Animal; contacto directo Animal–Hombre; contacto Persona–Persona y contaminación cruzada (Chantarapanont *et al.*, 2004).

#### **4.5 Aislamiento de *Campylobacter***

Las técnicas de aislamiento de *C. jejuni* y *C. coli* ya sea a partir de alimentos o heces, necesitan de medios de enriquecimiento esenciales para conseguir su recuperación cuando las células han sufrido algún daño por estrés (Fernandez and Farace, 2003).

Aunque no existe un método “estándar” aceptado para el aislamiento de *Campylobacter* a partir de heces, alimentos o muestras ambientales, se han publicado algunos protocolos para realizar este cometido, por laboratorios u organizaciones con alto renombre a nivel mundial, tal es el caso del método propuesto por la ISO (International Standards Organization), la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de Estados Unidos, e inclusive, los Servicios de Laboratorio de Salud Pública (PHLS) del Reino Unido (Donnison, 2003).

Es por ello que desde hace muchos años, una variedad amplia de medios de enriquecimiento y cultivo han sido propuestos para el aislamiento de *Campylobacter* spp, lo anterior, aunado a que este microorganismo puede ser ocultado por el crecimiento de la flora acompañante, se han desarrollado medios selectivos a los que se le han incorporado antibióticos y/o agentes antimicrobianos.

##### **4.5.1 Composición básica de los medios**

###### **4.5.1.1 Fuente de nutrientes.**

Debido a que *Campylobacter* no fermenta carbohidratos, las peptonas se incluyen en los medios de cultivo como fuente de nutrientes. Entre diferentes caldos, el Preston

(Bolton and Robertson, 1982) y el Exeter (Martin *et al.*, 1996) contienen únicamente extracto de carne y peptona, en tanto que el caldo Bolton y el caldo *Campylobacter* contienen peptonas, extracto de levadura y ácido alfacetoglutárico, éste último intermediario del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

En cuanto a otras fuentes de energía también se les han agregado a los medios otros compuestos que funcionan como tal como son el piruvato, citrato, succinato, cis-aconitato, alfa cetoglutarato, fumarato, malato y oxaloacetato, todos ellos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

#### **4.5.1.2 Sangre**

Muchos medios para *Campylobacter* contienen sangre (5-7% v/v) para eliminar los compuestos tóxicos del oxígeno (por ejemplo, peróxido de hidrógeno) (Bolton *et al.*, 1984) que se forman cuando los medios de cultivo son expuestos a la luz. Además, se ha visto que la sangre neutraliza los compuestos antagonistas del trimetoprim (Corry *et al.*, 1995). Aunque la sangre lisada de caballo se prefiere, se pueden utilizar de otras fuentes tal como la sangre de cabra. Para el medio libre de sangre, la hemina, extracto de levadura, carbonato de sodio y el ácido alfacetoglutárico se usan para suplir la sangre (Line *et al.*, 2002).

#### **4.5.1.3 Antibióticos**

La inclusión de antibióticos en medios de aislamiento es crucial para la recuperación de *Campylobacter*. Este microorganismo es resistente a varios de estos incluyendo: vancomicina (inhibe cocos Gram positivos); polimixina B (inhibe *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas* spp), trimetoprim (inhibe *Proteus* spp y cocos Gram positivos) y cefalosporinas (inhiben *Enterobacter* spp., especies de *Serratia*, *Pseudomonas aeruginosa*, algunos *Proteus* spp y *Yersinia enterocolitica*). La rifampicina fue sustituida por vancomicina en el medio Preston (Bolton and Robertson, 1982), sin embargo, estudios posteriores (Humphrey and Cruikshank, 1985; Humphrey, 1990) se encontró que la rifampicina tiene efectos inhibidores de las células estresadas de *C. jejuni*.

Entre los agentes antimicrobianos probados se han incluido en los medios como vancomicina, trimetoprim, polimixina B, cicloheximida, rifampicina, nistatina, anfotericina y cefoperazona, así como sus sales o mezclas de ellos. Todos estos antimicrobianos se usan para disminuir el crecimiento de microorganismos contaminantes, no inhibiendo el desarrollo de *Campylobacter* (Line *et al.*, 2002).

También se han incluido antibióticos que inhiben hongos y levaduras, de los cuales, la cicloheximida fue el antifúngico más ampliamente utilizado, sin embargo, actualmente se considera demasiado tóxico para su inclusión en los medios microbiológicos y actualmente para suplir este antibiótico se permite el uso de anfotericina B y natamicina (Martin *et al.*, 2002).

Aunado a lo anterior, la adición diferida de antibióticos puede potenciar la recuperación de campylobacterias termotolerantes. En algunos protocolos, caldos inoculados se incuban durante 4h a 37°C seguido por la adición de antibióticos y luego se transfieren a microaerofilia a 42°C durante 44 h (Wallace, 1997; Jones *et al.*, 1999).

#### **4.5.1.4 Aerotolerancia**

Con la finalidad de potenciar el crecimiento y/o la aerotolerancia de *Campylobacter* también se han agregado otros compuestos. Entre éstos se incluyen sulfato ferroso, ácido pirúvico y bisulfito de sodio. Se sabe que el uso de sangre en los medios potencia la aerotolerancia debido a que contiene el grupo heme, la catalasa y superóxido dismutasa (Line *et al.*, 2002).

#### **4.5.2 Formulación de medios de 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 en ese momento 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 usado consiste de 4 h de incubación a 37°C (Humphrey, 1989; Bolton, 2000), para después los cultivos ser transferidos a 42°C. Se recomienda que la resucitación este limitada a 4 h para prevenir el crecimiento excesivo de los microorganismos contaminantes (Goosens and Bultzer, 1992).

El Caldo Preston, Exeter, Bolton, CEB (*Campylobacter* Enrichment Broth), Park & Sanders y Tran son caldos de preenriquecimiento usados comúnmente en la búsqueda de *Campylobacter* (Donnison, 2003).

Inicialmente, en 1977, el desarrollo del caldo Skirrow fue la clave de éxito en los estudios de cepas de *Campylobacter* termotolerantes ya que este medio permitió la recuperación exitosa de estas bacterias proporcionando evidencia que vinculó la enfermedad a la contaminación de alimentos, en particular de pollo (Skirrow, 1977).

Sin embargo, a lo largo de al menos tres décadas se han sugerido numerosos medios de enriquecimiento selectivos para el aislamiento de *Campylobacter*, tratándose la mayoría de las ocasiones de modificaciones de los medios ya utilizados para el aislamiento. Entre ellos, podemos mencionar que tomando como antecedente que Robinson en 1981 demostró que la presencia de un bajo número de células de *C. jejuni* en leche (2-3 bacterias/ml) son suficientes para desarrollar gastroenteritis en humanos adultos se hace evidente el desarrollo de un medio de cultivo que permita el enriquecimiento de una muestra aun cuando *Campylobacter* se encuentre en muy bajos números en diversas matrices.

Rothenberg *et al.*, en 1984 desarrollaron un medio de cultivo para la recuperación de *C. jejuni* a partir de canales de pollo crudo. Dicho medio era una modificación al reportado por Doyle y Roman en 1982 al que se le agregó un compuesto llamado FBP (sulfato ferroso 0.2%, metabisulfito de sodio 0.025% y piruvato de sodio 0.05%), además de 0.1% de lauril sulfato de sodio y 0.075% de agar y se incubó en condiciones aeróbicas y microaerofílicas. Dicho medio resultó ser comparable con el reportado previamente por Doyle and Roman en la recuperación de *Campylobacter*, sin embargo, el medio de Doyle fue más selectivo en la inhibición de la flora acompañante de este microorganismo. Ambos medios permitieron aislar a *Campylobacter* ya sea a las 7 o 16 h de enriquecimiento (Rothenberg *et al.*, 1984).

El siguiente año, (1985) Ng *et al.*, realizaron diferentes formulaciones de medios de cultivo para el enriquecimiento de *Campylobacter* en el que solo se modificaron las concentraciones y tipos de antibióticos usados en los medios (polimixina, colistina, rifampina, cefalotina y novobiocina) con la finalidad de determinar si estos compuestos tenían algún efecto sobre cepas de *C. jejuni* y *C. coli* encontrando que la combinación de antibióticos usada generalmente en los medios de cultivo para *Campylobacter* (polimixina, colistina, rifampina, cefalotina y novobiocina) usada para suprimir la flora acompañante en muestras clínicas, inhibían más de  $10^7$  células de *C. coli* específicamente, no siendo así para *C. jejuni* (Ng *et al.*, 1985). Esto podría ser de importancia una vez que se desee cuantificar la presencia de este microorganismo en muestras de alimentos.

Una revisión de los métodos de aislamiento para *Campylobacter* fue publicado por Corry *et al.* (1995) donde estos investigadores concluyeron que aunque no existía un método aceptado, sí existen ciertas consideraciones generales a tomar en cuenta para cuando se trata de aislar a *Campylobacter* de alguna muestra biológica. Estos incluyen: a) el uso de un periodo de incubación (resucitación) a temperatura reducida (37°C) por 4 h previas al incubar al microorganismo a 42°C, en esta última temperatura se incubaría por 48h. b) La inclusión de suplementos secuestrantes del oxígeno al medio de pre-

enriquecimiento permitiendo con esto incubar en atmósfera aerobia los cultivos. c) Para el análisis de heces de pacientes infectados, una siembra directa en agar sangre o un agar selectivo para *Campylobacter* en ocasiones es recomendable a un pre-enriquecimiento (Donnison, 2003).

Además de lo anterior, se debe tener en cuenta que los alimentos o heces que se van a investigar pueden estar altamente contaminados con una flora competitiva que hace difícil el crecimiento de *Campylobacter*. Por otra parte, el número puede ser escaso o su vitalidad disminuida o lesionada (dañada) como consecuencia de las condiciones ambientales, de almacenamiento y procesamiento (deseccación, calentamiento, congelación, acidificación, etc.). Sin embargo, el daño que hasta este momento ha sufrido la bacteria es reversible (Fernández and Farace, 2003).

Con respecto al daño que pueden sufrir las bacterias, Line y Pearson en el 2003 desarrollaron un caldo selectivo para el desarrollo de células dañadas de *C. jejuni* mediante una técnica de monitoreo del crecimiento por capacitancia. Dicho medio está compuesto de los mismos ingredientes del Campy-Line agar, solo que se eliminó el agar y el cloruro de trifetil tetrazolium y se le añadió arginina. Este medio pudo recuperar células estresadas de *Campylobacter* aun en bajos números (desde 1 célula por pozo) y ser fácilmente utilizado con sistemas de cuantificación basados en capacitancia, sin embargo se estableció que debía ser probado con muestras de alimentos debido a que la flora acompañante pudiera influir en el desarrollo de los microorganismos (Line and Pearson, 2003).

Dado que se había reportado que existía sensibilidad de bacterias dañadas para poder desarrollarse en medio con diversos antibióticos, en el 2004 Baserisalehi *et al.*, desarrollaron un método que implicaba el uso de un medio libre de antibióticos y sangre (KB) para el aislamiento y enumeración de *Campylobacter* spp a partir de muestras ambientales. Dicho medio era sólido, sin embargo, no incluía antibióticos ni sangre, solo contenía triptona, lactosa, sales, indicador de pH, verde de malaquita, glicerol y vitamina E. Este medio se comparó con el agar libre de sangre para *Campylobacter*

(CAT) y se encontró que el medio KB es similar al CAT en selectividad para la recuperación de *Campylobacter*, por lo que se concluyó que este método permitía la detección y enumeración de *Campylobacter* sensible a antibióticos a partir de muestras medioambientales (Baserisalehi *et al.*, 2004).

#### 4.5.3 Medios aeróbicos

Conforme se realizaban modificaciones a los medios de cultivo, ya sea con la eliminación de sangre, la incorporación de agentes secuestrantes de oxígeno y variación de antibióticos, las opciones de medios selectivos para el aislamiento de las campylobacterias creció, sin embargo, la mayoría de estos todavía requería del uso de una atmósfera microaerofílica de incubación, lo cual hacía costoso su búsqueda e identificación.

Por lo anterior, se empezaron a diseñar caldos que prescindieran de este tipo de atmósfera y permitieran la incubación aeróbica. En 1986, Shimada y Tsuji desarrollaron un cultivo semisólido para recuperar a *C. jejuni* presente en bajas cuentas (3-8 células/g o ml en heces y leche) el cual contenía 0.08% de agar, sangre lisada de caballo, caldo Brucella, carne cocida y/o caldo tioglicolato y suplementado con vancomicina, polimixina B, trimetoprim y anfotericina B (formulación conocida como GAM, Gifu-anaerobe modified) y podía ser incubado tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas o microaerofílicas (Shimada and Tsuji, 1986).

Posteriormente en 1995 Tran, probó la incorporación de la enzima Oxirasa (30 unidades) al medio CEB (*Campylobacter* enrichment Broth) con la finalidad de recuperar a *C. jejuni* de alimentos artificialmente contaminados (ostras, cangrejo, champiñones y leche cruda) e incubado bajo condiciones aeróbicas. Los resultados indicaron que no hubo diferencia entre el medio CEB con Oxirasa y el CEB recomendado por la FDA, sin embargo, el primero fue posible incubarlo en aerobiosis, en tanto que el segundo debía ser en microaerofilia. Además, el medio CEB con oxirasa tuvo menor costo, consumió menos tiempo y fue simple el método al realizar (Tran, 1995).

El mismo investigador, tan solo tres años después (1998) desarrolló un medio de cultivo libre de sangre (BFEB, Blood Free Enrichment Broth) y que permitió el desarrollo de *Campylobacter* en condiciones aeróbicas. Dicho medio incluía carbón activado y fue evaluado para recuperar a *Campylobacter* inoculada en leche cruda, ostras, cangrejo y champiñones bajo condiciones aeróbicas. Aunque Tran determinó que la eficiencia de dicho medio fue afectada por el tipo de alimento, la cepas probadas y sus interacciones, él concluyó que su medio fue comparable contra el método existente de incubación microaerofílica reportado (Tran, 1998).

La mayoría de los medios de enriquecimiento que actualmente se emplean para el aislamiento de *Campylobacter* tienen la desventaja de la necesidad de ser incubados bajo una atmósfera microaerofílica, con esto, los equipos requeridos para el establecimiento de este tipo de atmósfera representa quizá la mayor inversión para un laboratorio, lo cual a muchos de ellos los imposibilita para realizar pruebas de rutina y determinar la presencia de estos microorganismos. Aunque existen formulaciones que no necesitan la incubación en atmósfera microaerofílica y que aún tienen los mismos niveles de detección que los que sí la necesitan, se incluye forzosamente un paso adicional posterior que consiste en sembrar una alícuota a partir del cultivo y sembrarlo en una placa de agar que se deberá incubar por 48h en microaerofilia, con lo que, aunado a la inversión de dicha atmósfera y al tiempo requerido para aislar e identificar a la colonia sospechosa se hace imposible emitir un resultado a tiempo para tomar las acciones correspondientes.

Es por lo anterior que se han buscado alternativas para acoplar los medios de enriquecimiento para este patógeno a técnicas rápidas como las basadas en biología molecular. Aunque actualmente los métodos rápidos y sensibles para recuperar a *Campylobacter* no se usan generalmente para análisis de rutina y están restringidos para estudios epidemiológicos. Las técnicas moleculares como la PCR ha sido altamente efectivos para la detección de patógenos en alimentos, entre los que se encuentran, *Yersinia* spp, *S. aureus*, *Listeria* spp y *E. coli* (Gouws and Liedemann, 2005; Kawasaki *et al.*, 2009).

Uno de los principales objetivos en el desarrollo de tecnologías rápidas para el diagnóstico microbiológico es disminuir el tiempo global del ensayo, en donde en ocasiones se logra al desarrollar cultivos de enriquecimiento que requieran un tiempo corto de incubación.

En este contexto, Thunberg *et al.*, (2000) describieron el acoplamiento del PCR directo después de un enriquecimiento por 48 h con medio Preston a partir de diferentes alimentos tales como brócoli, setas, 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 un enriquecimiento de 48 h en medio Preston seguido del análisis por PCR podría ahorrar un día el tiempo requerido para la identificación presuntiva de *C. jejuni* en alimentos sospechosos (Thunberg *et al.*, 2000).

Así también diversos ensayos basados en PCR se han desarrollado para la detección de *Campylobacter* spp en agua (Kirk and Rowe, 1994), productos lácteos (Giesendorf *et al.*, 1992; Hazeleger *et al.*, 1994; On and Holmes, 1991) y pollo (Itoh *et al.*, 1995).

En general estos métodos basados en la detección de DNA de las bacterias, particularmente *Campylobacter* spp, poseen ciertas ventajas comparados con los métodos tradicionales: a) disminución de tiempo de ensayo, b) capacidad de identificar diferentes formas de *Campylobacter* (ej. no cultivable) y c) la capacidad de detectar diversos genes. Los métodos de PCR permiten la detección no solo de bacterias cultivables sino de *Campylobacter* en su forma no cultivable (Hazeleger *et al.*, 1994). Específicamente en *Campylobacter* spp, métodos de PCR se han encontrado ser altamente específicos y sensibles para detectar a este patógeno en alimentos naturalmente contaminados (Mayr *et al.*, 2010; Katzav *et al.*, 2008).

Desafortunadamente, a pesar de la utilización de la técnica de PCR, se han reportado compuestos inhibidores de la reacción, los cuales pueden ser componentes de alimentos, heces o estar presentes en los mismos medios de cultivo. Entre este tipo de sustancias inhibitorias podemos mencionar, a la sangre (por la presencia del grupo heme o productos de degradación de la hemoglobina), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), DNA de leucocitos, sales biliares, polisacáridos complejos, carbón activado y hierro, entre otros (Monteiro *et al.*, 1997; Akane *et al.*, 1994; Morata, 1998; Wang *et al.*, 1992; Thunberg *et al.*, 2000).

Los medios de cultivo que directamente se han acoplado a una técnica molecular son escasos, generalmente se prefiere realizar una extracción previa de DNA con purificación del mismo mediante diversas metodologías con la finalidad de eliminar todo aquel compuesto que pudiera ser inhibitorio de la reacción de PCR.

Los estudios actuales relacionados al acoplamiento directo del medio de preenriquecimiento de *Campylobacter* a una técnica molecular emplean la metodología PCR en tiempo real. Tal es el caso de Pitkänen *et al.*, en el 2009, donde utilizaron el sistema llamado Portable Microbe Enrichment Unit (PMEU) para el enriquecimiento en condiciones microaerofílicas y lo compararon con el método estándar ISO 17995, con el caldo Bolton y Preston como enriquecimiento así como la aplicación de PCR tiempo real para la identificación de este patógeno. Con esto se desarrolló un método útil para el enriquecimiento de *Campylobacter* principalmente para muestras de agua, ya que fue posible reducir el tiempo de incubación (a 5h) para ser detectado por PCR (Pitkänen *et al.*, 2009), sin embargo una desventaja que pudiera presentar este sistema es la manipulación de la muestra dado que es un aparato asociado a jeringas y bombas, además que únicamente ha sido probado para la búsqueda de *Campylobacter* a partir de agua.

#### 4.6 *Campylobacter* en alimentos

En el 2009, un total de 17 468 casos de infecciones transmitidas por alimentos se confirmaron. El número de infecciones y la incidencia por 100 000 habitantes por patógeno fue: *Salmonella* (7,039; 15.19%), *Campylobacter* (6033; 13.02%), *Shigella* (1849; 3.99%) entre los principales (CDC, 2009).

Debido a *Campylobacter* tiene muchos reservorios en el medio ambiente, los productos alimenticios (especialmente las aves de corral, carne de res y cerdo) están en riesgo de contaminación durante el proceso. Afortunadamente, la mayoría de los casos de la enfermedad son esporádicos y los brotes relativamente raros. Ya que el organismo es poco probable que crezca en los alimentos, a menos que estén en una temperatura de abuso, la mayoría de los brotes son causados por contaminación cruzada o cocción insuficiente.

Datos sobre leche cruda han mostrado que *Campylobacter* se puede encontrar aproximadamente en 0.5 a 12% de las muestras (Oliver *et al.*, 2005), sin embargo, este patógeno es fácilmente destruido por la pasteurización de productos lácteos. Otros productos también pueden ser contaminados con *Campylobacter* si se expone a carne cruda o productos de aves de corral y los jugos en la cocina, o si hay contaminación por heces de animales en los campos donde las frutas y hortalizas se cultivan.

Zhao *et al.*, (2001) estudiaron la prevalencia de *E. coli*, *Salmonella* spp y *Campylobacter* spp en carne de pollo, pavo, cerdo y res encontrando a este último microorganismo en 70, 14, 1.7 y 0.5% de las muestras, respectivamente. De las cepas identificadas como *Campylobacter* el 53.6% correspondió a *C. jejuni* y el 41.3% a *C. coli*, en tanto que el 5.1% restante perteneció a otras especies de este género.

Un estudio realizado en el periodo 2000-2001 que se basó en la búsqueda de *C. jejuni* y *C. coli* en bovinos, cerdos, carne de res, cerdo y pollo, *Campylobacter* spp se aisló en un 53.9% de bovinos y 63.5% de cerdos. La carne de pollo tuvo un 81.3% de

contaminación con esta bacteria, mientras que bajas proporciones se encontraron en carne de cerdo (10.3%) y res (1.3%) (Pezzotti *et al.*, 2003).

En el mismo año (2001) en Taipei, Shih determinó la prevalencia de *Campylobacter* en muestras de pollo en punto de venta ya sea mercados o supermercados. Se logró aislar a *C. jejuni* y *C. coli* en el 68% de las muestras de pollo completo, 100% en muestras de diversas partes del pollo (alas, pechugas) y en el 100% de las muestras de órganos (hígado y mollejas) (Shih, 2000).

Kramer *et al.*, en el 2000 analizaron un total de 489 muestras de carne de las cuales 198 eran de pollo (alas y pechuga). Encontraron a este microorganismo en un 83.3% de muestras positivas para *C. jejuni* y *C. coli* de pollo seguida por cordero (72.9%) e hígado de cerdo (71.7%). *C. jejuni* predominó en las muestras de pollo (77.3%), cordero (75%) e hígado (49%), en tanto que *C. coli* predominó en hígado de cerdo (42.2%) (Kramer *et al.*, 2000).

En países como Nueva Zelanda, la prevalencia de *C. jejuni* y *C. coli* en pollo crudo fue de 89.1 y 9.1% respectivamente en cerdo aun en cuentas bajas (<0.3NMP/g) sin diferencia en la estacionalidad de los aislados (Wong *et al.*, 2007).

Se ha analizado la ocurrencia de *Campylobacter* en alimentos listos para consumo en Canadá, donde también se analizaron muestras de carnes crudas como pollo, cerdo y res. Con respecto a las muestras de pollo se aisló a *Campylobacter* en el 9.7% de las muestras siendo esto una tasa de aislamiento baja. Para el caso de las muestras de res y cerdo no se logró ningún aislamiento. Aunque para Canadá también se había reportado un índice bajo de aislamiento de este patógeno (23%) (Medeiros *et al.*, 2008).

Y después de muchos años de estudios basados en la prevalencia de estos patógenos, los años recientes no son la excepción. En octubre del 2009, la agencia de estándar para alimentos (Food Standards Agency) en el Reino Unido (UK) publicó un

reporte donde indicó la prevalencia de *Campylobacter* spp en carne de pollo en punto de venta de 65.2% en 927 muestras analizadas (Moore and Matsuda, 2010).

Recientemente en el 2010, se analizaron muestras de carne de pollo crudo así como cerdo y heces de humanos para investigar la presencia de *C. jejuni* y *C. coli*. En las muestras de pollo se encontró a ambas especies, el 83% correspondió a *C. jejuni* y el 73% a *C. coli*. En el caso de las muestras de cerdo, el 12% tenía *C. jejuni* y el 10% a *C. coli* (Kim *et al.*, 2010).

En el mismo año, Sammarco *et al.*, realizaron un estudio donde analizaron la prevalencia y caracterización molecular de cepas de *Campylobacter* aislados de diferentes matrices cárnicas usando la técnica de enriquecimiento convencional y la filtración por membrana. Se determinó la presencia de *Campylobacter* spp en 80 muestras (22.7%) de las cuales 14.1% correspondió a carne de bovino, 5.7% de cerdo y 51.9% de carne de pollo. La recuperación por la técnica de filtración por membrana fue menor que el cultivo selectivo (Sammarco *et al.*, 2010).

#### **4.7 *Campylobacter* en México**

Son escasos los reportes respecto a la incidencia de este microorganismo en alimentos, como es el caso del estudio realizado por Quiñones *et al.*, (2000) en el que se analizaron un total de 100 muestras de tacos de pollo asado encontrando la prevalencia de este patógeno en el 27% de las muestras. De todos los aislados, el 19% correspondió a *C. jejuni* y el 40% a *C. coli*. Los autores concluyeron que la presencia de *Campylobacter* en estas muestras de producto terminado se debió a contaminación cruzada con el pollo crudo ya que se empleaba la misma tabla de picar (Quiñones-Ramírez *et al.*, 2000).

Recientemente se reportó que los investigadores del Departamento de Salud Pública de la Universidad de Guadalajara, realizaron una búsqueda de *C. jejuni/coli* en carne cruda de pollo en Guadalajara y Zapopan, Jalisco, México (2007). Los resultados

mostraron que la carne cruda de pollo, independientemente del punto de venta (42 mercados, 19 supermercados, 25 pollerías y 12 carnicerías), presentaba una tasa alta de contaminación con las especies de *Campylobacter*. Del total, 70 (71.4%) estuvieron contaminadas con *C. jejuni* y *C. coli*. Estos autores destacaron que dicho resultado es mayor con respecto al registrado por el doctor Castillo, en un estudio similar en la ciudad de Guadalajara en 1993 ya que en aquel entonces la frecuencia fue del 33% (Carrillo, 2009).

En el año 2010, Ordaz *et al.*, analizaron un total de 410 muestras de pollo procedente de mercados y supermercados de Mérida, Yucatán, aislando a *Campylobacter* spp en el 83.4%. Después de determinar el perfil de resistencia a antimicrobianos de las cepas aisladas, los autores concluyeron que la tasa de incidencia y el nivel de resistencia representan un peligro para la salud del consumidor (Ordaz *et al.*, 2010).

La presencia de *Campylobacter* en aves de corral también se ha investigado, ya que en el año 2008 se realizó un estudio donde se muestrearon 30 aves de corral con la finalidad de buscar a *Salmonella* y *Campylobacter*, donde, con respecto a este último patógeno, de las 30 aves, en nueve de ellas se aisló *C. jejuni* y en dos *C. coli*. De acuerdo con estos resultados preliminares, es probable que estas bacterias vivan como comensales en el tracto intestinal del pollo de engorda en las parvadas comerciales en México, ello indica la utilidad, en el futuro inmediato, de realizar estudios que involucren segmentos representativos de la avicultura nacional (Gutiérrez-Castillo *et al.*, 2008).

#### **4.8 Resistencia a antibióticos**

Los agentes antimicrobianos se definen como sustancias que inhiben o matan a los microorganismos. Pueden ser sintéticos o semisintéticos o antibióticos que son sustancias producidas por otros microorganismos (Hannula, 2010).

Las principales clases de antimicrobianos se presentan a continuación, de acuerdo a su modo de acción y su estructura química (Tabla 2) (Prescott, 2004).

Tabla 2. Principales antimicrobianos y su blanco de acción.

<b>CLASE ANTIBACTERIAL</b>	<b>EJEMPLO</b>	<b>BLANCO DE ACCIÓN</b>
<i>Inhibidores de la pared celular</i>		
<b>Beta-lactámicos</b>	Penicilina: penicilina, ampicilina, amoxicilina Cefalosporinas: cefalexina Carbapenems: meropenem Monobactams: aztreonam	Transpeptidasa
<i>Inhibidores de la síntesis de proteínas</i>		
<b>Aminoglucósidos</b>	Gentamicina, estreptomycin, kanamicina	Subunidad ribosomal 30S
<b>Lincosamidas</b>	Lincomicina, clindamicina	Subunidad ribosomal 50S
<b>Tetraciclinas</b>	Tetraciclina, doxiciclina	Subunidad ribosomal 30S
<b>Macrólidos</b>	Eritromicina, tilosina	Subunidad ribosomal 50S
<b>Fenólicos</b>	Cloramfenicol	Subunidad ribosomal 50S
<i>Inhibidores de ácidos nucleicos</i>		
<b>Sulfonamidas</b>	Trimetroprim, bactrim	Pteorato sintetasa
<b>Nitroimidazoles</b>	Metronidazol	Nucleótidos/DNasaI
<b>Quinolonas</b>	Ciprofloxacina, ácido nalidíxico	Topoisomerasa tipo II
<i>Inhibidores de la síntesis de RNA</i>		
<b>Rifamicina</b>	Rifampicina	RNA polimerasa

Fuente: Prescott, 2004

La campylobacteriosis es a menudo una enfermedad autolimitante, sin embargo en ciertos casos el uso de antimicrobianos se justifica cuando la enfermedad afecta a personas ancianas, cuando tienen una enfermedad subsecuente o cuando los síntomas se prolongan por varios días (Allos, 2001). En estos casos el antimicrobiano de elección es

la eritromicina, seguido de ciprofloxacina y otros menos frecuentes incluyen la tetraciclina y los aminoglucósidos (Blaser and Engberg, 2008; Murray *et al.*, 2009). Sin embargo ya se ha reportado la existencia de cepas resistentes a estos antibióticos (Uzunovic-Kamberovic, 2003).

Los antimicrobianos se utilizan tanto en la agricultura como en la medicina veterinaria, como aditivos para piensos, y como biocidas (en el cultivo y la producción de fruta). El mayor uso agrícola de los antimicrobianos es en la producción de aves de corral, cerdos y ganado vacuno (Silbergeld *et al.*, 2008). La resistencia a antibióticos por microorganismos patógenos, inicialmente se presentó como un problema en hospitales, ocurriendo sobre todo en países subdesarrollados, sin embargo, actualmente este problema afecta a todo el mundo.

Aunado a lo anterior, la FDA estima que el uso de agentes antimicrobianos, usados en la alimentación de animales destinados al consumo humano, es mayor de 100 millones de libras por año. Se ha estimado que del total de antibióticos producidos en Estados Unidos, del 36 al 70% se utilizan en la alimentación animal o en el tratamiento profiláctico para prevenir enfermedades de los animales (CDC, 2010).

La resistencia a los antimicrobianos entre bacterias patógenas transmitidas por los alimentos no es infrecuente y, a menudo está asociada con el uso de agentes antimicrobianos en animales productores de alimentos (Stevenson *et al.*, 2002). El CDC informó que estos antibióticos aplicados a los piensos de animales destinados al consumo y el uso de antibióticos en los seres humanos sin necesidad deben ser reducidos. Los países europeos han establecido normativas para lograr una reducción del uso de antibióticos en la alimentación animal, lo cual ha redundado en una notable reducción de microorganismos resistentes a los antibióticos en los seres humanos (Angulo *et al.*, 2004).

El incremento en la proporción de infecciones causadas por cepas de *Campylobacter* resistentes a antibióticos hace que el manejo clínico de las enfermedades

provocadas por estos microorganismos sea más difícil. Se sabe que la resistencia a antibióticos puede prolongar la enfermedad y sobre todo, complicar el tratamiento de los pacientes con bacteriemia. En los países industrializados, la aparición de cepas de *C. jejuni* resistentes a fluoroquinolonas ilustra la necesidad de hacer un uso más racional de los antibióticos en la producción de animales de abasto.

Después de que a principios de los años 90 se aprobase en Europa el uso de fluoroquinolonas como suplemento alimenticio en producción animal, el número de cepas de *C. jejuni* resistentes que se aíslan en seres humanos ha ido en aumento. Además, el incremento en la proporción de infecciones causadas por cepas resistentes a antibióticos hace que el manejo clínico de los casos de campylobacteriosis sea más difícil.

Actualmente existen reportes enfocados en la resistencia de *Campylobacter* a antimicrobianos, tal es el caso de un estudio realizado por Pezzotti *et al.*, (2003) donde probaron la resistencia a antibióticos de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas de diversas fuentes (pollos y cerdos vivos, así como su carne) y fueron comparadas con aislados de humanos. Los resultados indicaron que *C. coli* fue más resistente a quinolonas que *C. jejuni*, siendo además, resistente a estreptomycinina y tetraciclina.

Para el caso de *C. coli* se han realizado otras investigaciones, como por ejemplo la realizada por Delsol *et al.* (2004) donde se sometió a cerdos a un tratamiento de enrofloxacin por varios días y posteriormente se determinó el patrón de resistencia a antibióticos de *C. coli* nativa. Sus resultados indicaron que antes del tratamiento ninguna cepa fue resistente a quinolonas, sin embargo, cepas de *C. coli* resistentes se aislaron de los cerdos 35 días después del tratamiento. Este estudio aportó evidencia de que un simple tratamiento con enrofloxacin contribuyó directamente en la inducción de resistencia a fluoroquinolonas.

Siguiendo con estos estudios, se ha encontrado que cepas de *Campylobacter* son generalmente más resistentes a tetraciclinas, quinolonas y macrólidos y generalmente

susceptible a aminoglucósidos tales como la gentamicina, la cual es comúnmente usada en la producción del alimento de animales y como medicina humana (Alfredson *et al.*, 2007; GE *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2004).

#### **4.8.1 Mecanismo de resistencia**

##### **4.8.1.1 Fluoroquinolonas**

La familia de las fluoroquinolonas contiene antibióticos de amplio espectro, donde el ácido nalidíxico, el cual no contiene fluor, es el compuesto más representativo. El uso de las quinolonas en animales se ha estimado ser de 50 toneladas en países desarrollados mientras que las variedades usadas en animales alcanzan las 70 toneladas. El blanco de este grupo de antibióticos son dos enzimas microbianas, la DNA girasa y la DNA topoisomerasa IV. Dichas enzimas son topoisomerasas bacterianas tipo II asociadas a la transcripción, replicación, condensación del cromosoma y segregación (Aarestrup and Engberg, 2001).

Se ha demostrado resistencia mediada por un plásmido que contiene al gen *qnr* (quinolona resistencia) que codifica a la proteína Qnr la cual se une a la DNA girasa y la topoisomerasa IV (Smith *et al.*, 2010), o bien debida a una mutación en la región determinante de resistencia a quinolona (QRDR) del gen *gyrA*, además de poseer una bomba efflux CmeABC la cual contribuye a la multiresistencia a antibióticos en *Campylobacter* (Smith *et al.*, 2010).

##### **4.8.1.2 Macrólidos**

La resistencia a macrólidos predomina en *C. coli*, en tanto que en *C. jejuni* no excede del 10% e involucra dos mecanismos llamados modificación y bomba efflux. La mutación en el RNAr 23S bloquea la interacción de los macrólidos a la subunidad ribosomal 50S y ello confiere resistencia a macrólidos (Jensen and Aarestrup, 2001; Vacher *et al.*, 2003; Gibreel *et al.*, 2005; Mamelli *et al.*, 2005). Mutaciones en estas posiciones probablemente bloquean la unión de los macrólidos a su sitio en la subunidad ribosomal 23S (Pfister *et al.*, 2004).

Se ha reportado tanto resistencia a macrólidos y fluoroquinolonas como co-resistencia (resistencia a ambos antibióticos) y multiresistencia (resistencia a antibióticos adicionales como tetraciclina, gentamicina y cefotaxima). Aunque las especies de *Campylobacter* son naturalmente sensibles a fluoroquinolonas y macrólidos (Engberg *et al.*, 2001). La resistencia a macrólidos es más prevalente en *Campylobacter* aislados de animales ya que se han relacionado con su uso como promotores del crecimiento, especialmente en cerdos (Gibreel and Taylor, 2006).

#### **4.8.1.3 Tetraciclina**

Algunos autores han reportado que la resistencia a tetraciclina de *Campylobacter* puede ser mediada por un plásmido únicamente transferible entre especies de *Campylobacter* (Taylor and Courvalin, 1988). El nivel alto de resistencia a tetraciclina se ha asociado principalmente con el gen *tet(O)* el cual puede ser transmitido por plásmidos, dicho gen sintetiza una proteína de protección ribosomal Tet(O) que se une al ribosoma bacteriano y desplaza a la tetraciclina (Connel *et al.*, 2003; Trieber *et al.*, 1988; Taylor *et al.*, 1983). La bomba efflux CmeABC también ha sido implicada como resistencia intrínseca o adquirida a tetraciclina de este patógeno (Lin *et al.*, 2002; Pumbwe and Piddock, 2002; Gibreel *et al.*, 2007).

#### **4.8.1.4 Otros antibióticos**

La resistencia a aminoglucósidos es mediada por modificación enzimática que provoca una disminución de la afinidad de estos antibióticos del RNAr al sitio A (Llano-Sotelo *et al.*, 2002). Estas enzimas se llaman aminoglucósido acetiltransferasas, aminoglucósidos adeniltransferasas y aminoglucósido fosfotransferasas, esta última es la más comúnmente encontrada en *C. jejuni* y *C. coli* (Taylor *et al.*, 1988; Tenover *et al.*, 1992). Mientras que *Campylobacter* spp es inherentemente resistente a muchos  $\beta$ -lactámicos, aún permanecen susceptibles a amoxicilina y ampicilina (Tajada *et al.*, 1996). Aislados de *C. jejuni* y *C. coli* son capaces de producir  $\beta$ -lactamasas las cuales hidrolizan el anillo lactámico (Sykes and Matthew, 1976; Tajada *et al.*, 1996).

#### 4.8.2 Resistencia a antibióticos de cepas de *Campylobacter* aisladas de alimentos

En el 2000, Sáenz *et al.* encontraron que los aislados de *Campylobacter* spp provenientes de pollo para asar y cerdo, presentaban una muy alta resistencia a la ciprofloxacina (99%), mientras que los aislados de humanos presentaron menor grado de resistencia (72%); además se observó resistencia cruzada con ácido nalidíxico. Cuando se comparó la resistencia de los aislados de cerdos a otros antibióticos, se encontraron niveles variables de resistencia como a la eritromicina del 81.1%, a la ampicilina del 65.7%, a la gentamicina del 22.2%, y a la amikacina del 21.6 %. La resistencia de los aislados humanos fue menor (34.5, 29.3, 8.6 y 0 % respectivamente) (Sáenz *et al.*, 2000).

En el mismo año, Kramer *et al.*, analizaron un total de 489 muestras de carne de las cuales 198 eran de pollo (alas y pechuga). Encontraron que *C. jejuni* predominó en las muestras de pollo (77.3%), cordero (75%) e hígado de buey (49%), en tanto que *C. coli* predominó en hígado de cerdo (42.2%). A dichas cepas se les determinó su perfil de resistencia a antimicrobianos frente a ampicilina, cloramfenicol, eritromicina, gentamicina, kanamicina, neomicina, ácido nalidíxico y tetraciclina. Con respecto a los aislados de pollo de *C. jejuni* se encontró un alto nivel de multirresistencia (12.9%) mostrando mayor resistencia a ampicilina (60.8%) y tetraciclina (35.6%). Para el caso de *C. coli* aislado de pollo se encontró que el 71.4% de los aislados fueron resistentes al menos a un antibiótico. Para este caso la mayor resistencia se presentó para ampicilina (57.1%) seguido de tetraciclina (35.7%) y 14.3% a ácido nalidíxico (Kramer *et al.*, 2000).

En un estudio realizado por Hong *et al.*, en el 2007 se evaluó la prevalencia de *Campylobacter* en muestras de cárnicos en Korea. De los aislados, la mayor resistencia fue para doxicilina (97.5%) seguido de ciprofloxacina (95.9%), ácido nalidíxico (94.6%) tetraciclina (94.6%), enrofloxacina (84.2%) y eritromicina (13.6%). El 93.4% de los aislados mostraron multirresistencia a 4 o más antibióticos. Con respecto a las cepas de

*C. jejuni* y *C. coli*, se encontró que la segunda fue más resistente que la primera (Hong, *et al.*, 2007).

Recientemente en el 2010, se analizaron muestras de carne de pollo crudo así como cerdo y heces de humanos para investigar la presencia de *C. jejuni* y *C. coli*. Al realizar la susceptibilidad a antimicrobianos de los aislados se determinó una alta tasa de resistencia a tetraciclina (92.2%), ácido nalidíxico (75.6%), ciprofloxacina (65%), azitromicina (41.5%), ampicilina (33.3%) y estreptomina (26.1%) (Kim *et al.*, 2010).

El mismo año, Sammarco *et al.* 2010 realizaron un estudio donde analizaron la prevalencia y caracterización molecular de *Campylobacter* aislados de diferentes matrices cárnicas. Se determinó la presencia de *Campylobacter* spp en 80 muestras (22.7%) de las cuales 14.1% fue de carne de bovino, 5.7% de cerdo y 51.9% de carne de pollo. Entre los aislados de *Campylobacter* de la carne de pollo, el 86.5% fue resistente a múltiples antibióticos. La resistencia a la ciprofloxacina (51.3%) y enrofloxacin (52.7%) fue menor que al ácido nalidíxico (71.6%). Las cepas de *C. coli* mostraron alta resistencia cruzada a quinolonas y fluoroquinolonas así como a la tetraciclina (Sammarco *et al.*, 2010).

Por todo lo anterior, en esta investigación nos propusimos desarrollar un medio de cultivo que no requiriera incubación microaerofílica, que además de ser empleado para muestras a partir de alimentos, también fuera posible acoplarlo a métodos moleculares como la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para que finalmente disminuyera el tiempo de obtención de resultados.

De la misma manera, debido a que no se conoce en México el grado de resistencia de cepas de *Campylobacter* aisladas de alimentos, en el presente trabajo pretendimos determinar su esquema de resistencia a antimicrobianos con lo que se pudiera establecer un tratamiento eficaz para las infecciones producidas por *C. jejuni* y/o *C. coli* en nuestra región.

## V. JUSTIFICACIÓN

*C. jejuni* y *C. coli* son considerados microorganismos fastidiosos debido a los requerimientos para su crecimiento, especialmente la necesidad de una atmósfera microaerofílica, quizá por esta razón en México no existe un número significativo de datos epidemiológicos confiables que soporten la presencia y la importancia clínica de especies de *Campylobacter*, e incluso nuestra normativa no la contempla como un punto de control para los alimentos que la población consume.

Con conocimiento de lo anterior la propuesta de esta investigación radicó en el desarrollo de un medio de cultivo que no requiriera incubación microaerofílica, que pueda ser empleado para muestras de alimentos, principalmente carne de cerdo y pollo, e inclusive ser acoplado a métodos moleculares relativamente comunes como la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para que finalmente pudiera disminuirse la complejidad y el tiempo de obtención de resultados tomando con ello acciones adecuadas para que conlleven a la eliminación de estos patógenos en diversas muestras ambientales y disminuir el peligro hacia el consumidor.

Además, se realizó un estudio epidemiológico sobre la incidencia de *C. jejuni* y *C. coli* tanto en carne de cerdo, pollo (tanto crudo como cocido) y posteriormente se determinaron los perfiles de resistencia a antimicrobianos de dichas cepas. Los reportes de estos patógenos presentes en nuestra región aún son escasos lo que esto contribuye a determinar el riesgo potencial que representan estos microorganismos al estar presentes en alimentos.

Tomando a consideración que en nuestro país el consumo de productos derivados del cerdo y pollo es elevado, resulta considerablemente importante conocer la incidencia de este microorganismo, el establecer un sistema de identificación a nivel laboratorio que facilite su identificación y acelere la toma de decisiones en lo que a este microorganismo involucre. Consideramos que este estudio también tiene implicación directa en la determinación del grado de resistencia a antibióticos de la cepa o cepas de

*C. jejuni* y/o *C. coli* responsables de enfermedades así como la posible fuente o vehículo de transmisión.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas que se usaron como controles en este estudio fueron: *Campylobacter jejuni* NADC 5653 (aislado de pollo vivo) la cual fue donada por la Dra. Irene V. Wesley del Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Agricultura de EE. UU, en Ames Iowa. Así como, las cepas de *C. jejuni* 50sp, 57sp, 173ip, 180ip, 193ip y 238ip (las dos primeras aisladas de personas sanas y las restantes de casos clínicos diarreicos), donadas por el Dr. Guillermo Ruíz Palacios del Depto. de Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición de la Cd. de México.

Para el caso de *C. coli* se usaron los aislados nativos 1, 19 (ambas de hisopados cloacales de pollo), 49 (carne de pollo cruda), 75 y 81 (ambas de hisopado cloacal de cerdo vivo y pavo vivo respectivamente), las cuatro primeras aisladas en Salinas Victoria y la última en Gral. Mariano Escobedo, N.L

Todas las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* fueron confirmadas por pruebas bioquímicas convencionales y mediante la técnica de PCR según el protocolo descrito por Cloak y Fratamico (2002).

Asimismo, se usó la cepa de *Escherichia coli* ATCC 43894 donada por Lynn MacLandsborough del Departamento de Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Massachusetts, Amherst, de EE.UU.

### 6.2 Mantenimiento y activación de las cepas

Todas las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* se mantuvieron como cultivo de reserva en caldo infusión cerebro corazón suplementado con 0.6% de extracto de levadura

(ICC+EL, Difco) y 20% de glicerol a -80°C. Para su activación, se tomó una alícuota de 50µl de dicho cultivo y se inoculó en 5ml de caldo ICC+EL y se incubó por 48h a 42°C en microaerofilia (10% CO<sub>2</sub>). Posteriormente, se sembró una asada de este cultivo en placas con agar Brucella suplementado con 5% de sangre hemolizada (ABS, Difco), las cuales se incubaron en microaerofilia a 42°C por 48h.

Para el caso de *E. coli*, la cepa se mantuvo a 4°C en agar ICC (Difco) en pico de flauta y cada tres meses se realizaron resiembras. Para la activación de este microorganismo, se tomó una asada del cultivo anterior y se estrió en placas con agar ICC. Las placas se incubaron a 37°C por 24h.

### **6.3 Desarrollo de un medio de cultivo aeróbico**

#### **6.3.1 Caldos de enriquecimiento**

Se realizó un medio de cultivo libre de sangre y libre de carbón activado (M-BFEB) basados en la composición del medio libre de sangre (BFEB) propuesto por Tran (1998) y se comparó contra otros tres medios usados como controles conocidos como Preston, Bolton y BFEB.

La composición de dichos medios se observa en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición de los caldos de enriquecimiento.

PRESTON		BOLTON*		BFEB**		M-BFEB	
Componente (Marca) <sup>1</sup>	g/L	Componente (Marca)	g/L	Componente (Marca)	g/L	Componente (Marca)	g/L
Extracto de carne (D)	10	Peptona de Carne (D)	10	Extracto de carne (O)	10	Extracto de carne (O)	10
Peptona (D)	5	Hidrolizado de lactoalbúmina (SA)	5	Peptona (D)	10	Peptona (D)	10
NaCl (JTB)	5	Extracto de levadura (D)	5	NaCl (JTB)	5	NaCl (JTB)	5
		NaCl (JTB)	5	Hidrolizado de caseína (SA)	6	Hidrolizado de caseína (SA)	6
		Hemina (F)	0.01	Extracto de levadura (D)	6	Extracto de levadura (D)	6
		Piruvato de sodio (SA)	0.5	Sulfato ferroso heptahidratado (JTB)	0.5	Sulfato ferroso heptahidratado (JTB)	0.5
		Ácido $\alpha$ -cetoglutárico (SA)	1	Metabisulfito de sodio (JTB)	0.75	Metabisulfito de sodio (JTB)	0.75
		Metabisulfito de sodio (SA)	0.5	Piruvato de sodio (SA)	0.75	Piruvato de sodio (SA)	0.75
		Carbonato de sodio (JTB)	0.6	Carbonato de sodio (JTB)	1	Carbonato de sodio (JTB)	1
				Ácido $\alpha$ -cetoglutárico (SA)	1	Ácido $\alpha$ -cetoglutárico (SA)	1
				Carbón activado (SA)	4		
<b>Suplementos</b>							
Sangre hemolizada	50ml	Sangre hemolizada	50ml	Cicloheximida (SA)	0.1	Cicloheximida (SA)	0.1
Cicloheximida (SA)	0.1	Cicloheximida (SA)	0.05	Trimetoprim lactato (SA)	0.0114	Trimetoprim lactato (SA)	0.0114
Rifampicina (SA)	0.01	Trimetoprim lactato (SA)	0.02	Vancomicina (SA)	0.01	Vancomicina (SA)	0.01
Trimetoprim lactato (SA)	0.01	Vancomicina (SA)	0.02	Cefoperazona de sodio (SA)	0.032	Cefoperazona de sodio (SA)	0.032
Polimixina B (SA)	5000U	Cefoperazona de sodio (SA)	0.02				

\* Fórmula Bolton, medio M28a de la FDA, Bacteriological Analytical Manual.

\*\* Medio libre de sangre (BFEB) desarrollado por Tran.

Marca: D: Difco, BD, Sparks, MD. JTB: J. T. Baker, Phillipsburg, NJ. SA: Sigma Aldrich, St Louis, MO. F: Fluka, Chemie AG, Buchs Switzerland. O: Oxoid, Cambridge, UK.

Para la preparación de los caldos de enriquecimiento se pesaron los ingredientes (Tabla 3), se disolvieron en agua destilada y se esterilizaron a 121°C por 15 min. Después de esterilizados se agregaron los suplementos (sangre hemolizada y/o antibióticos correspondientes).

### **6.3.2 Límite de detección y sensibilidad en la recuperación de *C. jejuni* y *C. coli***

Las cepas activadas de *C. jejuni* (NADC 5653, 50sp, 57sp, 173ip, 180ip, 193ip y 238ip) y *C. coli* (1, 19, 49, 75 y 81) se estriaron en placas con agar ABS y se incubaron a 42°C por 48 h en microaerofilia. Pasado el tiempo de incubación, se tomaron algunas colonias con hisopos estériles y se homogenizaron con solución salina fisiológica estéril [0.85% NaCl (J.T. Baker) p/v]. Los cultivos se ajustaron al tubo No 0.5 del Nefelómetro de McFarland a 600nm (aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml). Una vez ajustado el cultivo, se realizaron diluciones decimales seriadas en solución salina fisiológica estéril hasta alcanzar 1 UFC/ml. Para verificar las cuentas de cada dilución, se tomó una alícuota de 1ml y se sembró por extensión en superficie en placas con agar ABS las cuales se incubaron por 48h a 42°C en microaerofilia.

Un mililitro de cada dilución se inoculó en 10ml de cada uno de los caldos de enriquecimiento (Preston, Bolton, BFEB y M-BFEB). Los tubos se incubaron a 42°C en microaerofilia en el caso del medio Preston y Bolton y en aerobiosis para el medio BFEB y M-BFEB. A las 24 y 48h de incubación se tomó una alícuota de 1ml y se realizó la técnica de PCR que después se explica. Además, se tomaron 100µl y se plaquearon en placas con agar ABS que posteriormente se incubaron por 24 y 48h a 42°C en microaerofilia. Pasado el tiempo de incubación, se determinó la presencia o ausencia de colonias de *Campylobacter* a partir de cada dilución.

### **6.3.3 Ensayo de PCR**

a) Extracción de DNA: un mililitro de cada cultivo de enriquecimiento se centrifugó por 8 min a  $9000 \times g$  (Microcentrífuga Eppendorf modelo 5415C). El precipitado se resuspendió en 1ml de solución salina fisiológica estéril y se lavó dos veces en las mismas condiciones. El precipitado final fue resuspendido en 100µl de agua

miliQ y se calentó en baño de agua (98-100°C por 20 min). Después de esto, se centrifugó por última ocasión y 5µl del sobrenadante se usaron como templado para la amplificación.

La PCR múltiple para identificar a *C. jejuni* y/o *C. coli* se realizó mediante la metodología propuesta por Cloak y Fratamico (2002). En la cual, la reacción de amplificación constó de un volumen final de 50µl, conteniendo 5µl del DNA templado, Tris-HCl 10mM pH 8.4, KCl 50mM, 200µM de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos trifosfatados (BIOLINE, México), 0.40µM de cada oligonucleótido (Tabla 4) y 1.25U de *Taq* DNA polimerasa (BIOLINE, México). El protocolo de amplificación se llevó a cabo en un termociclador ThermoHybaid (Modelo HBPX110) donde las condiciones fueron: paso inicial de desnaturalización de 94°C por 4 min, seguido de 30 ciclos que comprendieron 94°C por 1 min, 52°C por 1 min y 72°C por 1min, además, un ciclo final de extensión de 72°C por 5min.

Tabla 4. Oligonucleótidos usados para la confirmación de *C. jejuni/coli*.

ESPECIE IDENTIFICADA	OLIGONUCLEÓTIDO (Gen blanco)	SECUENCIA 5'-3'	TAMAÑO DE PRODUCTO (pb)
<i>C. jejuni/coli</i>	cadF2B cadR1B ( <i>cadF</i> )	TTGAAGGTAATTTAGATATG CTAATACCTAAAGTTGAAAC	400
<i>C. coli</i>	COL1 COL2 ( <i>ceuE</i> )	ATGAAAAAATATTTAGTTTTTGCA ATTTTATTATTTGTAGCAGCG	894
<i>C. jejuni</i>	C-1 C-4 (indefinido)	CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT GGATAAGCACTAGCTAGCTGAT	159

Los productos de la amplificación se corrieron en un gel de agarosa al 2% a 100V y se visualizaron al ser teñidos con bromuro de etidio (50µg/ml). Los geles fueron fotografiados usando un Gel Logic 200, Imaging System, Kodak.

### **6.3.4 Influencia de la flora competidora para la recuperación de *C. jejuni* y *C. coli* en los medios de enriquecimiento**

Se evaluó la capacidad de cada medio de enriquecimiento para recuperar a *C. jejuni* y *C. coli* en presencia de *E. coli*. Para esto, la cepa activada de *E. coli* ATCC 43894 se estrió en placas con agar ICC y se incubaron a 37°C por 24h en aerobiosis. Pasado el tiempo de incubación, se tomaron colonias con hisopos estériles y se homogenizaron con solución salina fisiológica estéril. Los cultivos se ajustaron al tubo No 0.5 del Nefelómetro de McFarland a 600nm (aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml). Después de esto, se realizaron diluciones decimales seriadas en solución salina fisiológica estéril hasta alcanzar 1 UFC/ml. Para verificar las cuentas de cada dilución, se tomó una alícuota de 1ml y se sembró por extensión en superficie en placas con agar ICC las cuales se incubaron por 24h a 37°C en aerobiosis. Finalmente se realizaron los conteos en UFC/ml.

Antes del ensayo del co-cultivo (es decir, mezclas de células de *C. jejuni* o *C. coli* con *E. coli*) *C. jejuni* y/o *C. coli*-*E. coli* se determinó la capacidad de ésta última para desarrollarse en cada uno de los medios utilizados para el enriquecimiento de las cepas de *Campylobacter*. Para ello se inoculó un cultivo activado de *E. coli* (1% v/v) en 10ml de cada uno de los medios. El medio Preston y Bolton se incubaron en microaerofilia en tanto que el medio BFEB y M-BFEB en aerobiosis, todos a 42°C por 48h. Pasada la incubación, se tomó una alícuota de cada tubo (100µl) y se estrió en placas con agar ABS las cuales se incubaron en microaerofilia por el mismo tiempo y temperatura. Después de esto se observó la presencia o ausencia de crecimiento de *E. coli*.

Una vez determinado que los medios de enriquecimiento sí soportaron el crecimiento de *E. coli* se realizó un co-cultivo con cepas de *C. jejuni* y/o *C. coli*. Para este caso, se prepararon diluciones decimales desde  $1 \times 10^8$  hasta 1 UFC/ml para cada cepa, empleando para este ensayo *C. jejuni* NADC 5653 y *C. coli* 19. Se inocularon tubos con 10ml de cada caldo de enriquecimiento con 500µl de cada dilución bacteriana tanto de *C. jejuni*, *C. coli* y *E. coli*. Se realizaron inóculos a igual concentración, es decir

proporción 1:1 de *C. jejuni* o *C. coli* y *E. coli*, así como, concentraciones diferentes tal como se explica en la Tabla 5.

Tabla 5. Inóculo de cepas de *C. jejuni*, *C. coli* y *E. coli* a fin de comparar la influencia de la flora competidora en la recuperación de cepas de *Campylobacter*.

<b>TRATAMIENTO</b>	<b><i>C. jejuni</i> NADC 5653 (UFC/ml)</b>	<b><i>C. coli</i> 19 (UFC/ml)</b>	<b><i>E. coli</i> ATCC 43894 (UFC/ml)</b>
1	10	--	10
2	1x 10 <sup>2</sup>	--	1x 10 <sup>2</sup>
3	1x 10 <sup>3</sup>	--	1x 10 <sup>3</sup>
4	1x 10 <sup>4</sup>	--	1x 10 <sup>4</sup>
5	1x 10 <sup>5</sup>	--	1x 10 <sup>5</sup>
6	1x 10 <sup>6</sup>	--	1x 10 <sup>6</sup>
7	1x 10 <sup>7</sup>	--	1x 10 <sup>7</sup>
8	1x 10 <sup>8</sup>	--	1x 10 <sup>8</sup>
9	--	1	1
10	--	10	10
11	--	1x 10 <sup>2</sup>	1x 10 <sup>2</sup>
12	--	1x 10 <sup>3</sup>	1x 10 <sup>3</sup>
13	--	1x 10 <sup>4</sup>	1x 10 <sup>4</sup>
14	--	1x 10 <sup>5</sup>	1x 10 <sup>5</sup>
15	--	1x 10 <sup>6</sup>	1x 10 <sup>6</sup>
16	--	1x 10 <sup>7</sup>	1x 10 <sup>7</sup>
17	--	1x 10 <sup>8</sup>	1x 10 <sup>8</sup>
18	10	--	1x 10 <sup>8</sup>
19	10	--	1x 10 <sup>7</sup>
20	1x 10 <sup>3</sup>	--	1x 10 <sup>6</sup>
21	1x 10 <sup>4</sup>	--	1x 10 <sup>5</sup>
22	1x 10 <sup>5</sup>	--	1x 10 <sup>4</sup>
23	1x 10 <sup>6</sup>	--	1x 10 <sup>3</sup>
24	1x 10 <sup>7</sup>	--	1x 10 <sup>2</sup>
25	1x 10 <sup>8</sup>	--	10
26	--	10	1x 10 <sup>7</sup>
27	--	10	1x 10 <sup>6</sup>
28	--	1x 10 <sup>2</sup>	1x 10 <sup>5</sup>
29	--	1x 10 <sup>3</sup>	1x 10 <sup>4</sup>
30	--	1x 10 <sup>4</sup>	1x 10 <sup>3</sup>
31	--	1x 10 <sup>5</sup>	1x 10 <sup>2</sup>
32	--	1x 10 <sup>6</sup>	10
33	--	1x 10 <sup>7</sup>	10

Los caldos se incubaron en microaerofilia para el caso de Preston y Bolton y en aerobiosis para BFEB y M-BFEB, todos por 48h a 42°C. Después de ese tiempo, se tomó una alícuota de 100µl de cada tubo y se estriaron en agar Campy-Cefex (agar Brucella [Difco] 44g/L, sulfato ferroso heptahidratado [J.T. Baker] 0.5g/L, bisulfito de sodio [Sigma] 0.2g/L, piruvato de sodio [Sigma] 0.5g/L, cefoperazona de sodio [Fluka] 33mg/L, Cicloheximida [Sigma] 200mg/L y 50ml de sangre hemolizada). Las placas se incubaron por 48h a 42°C bajo microaerofilia. Finalizada la incubación, se determinó el crecimiento de las colonias de *Campylobacter*, la cuales, en dicho agar son rosadas, pequeñas, planas y con bordes definidos, en tanto que las colonias de *E. coli* son rizoides, gris-verdosas, grandes e irregulares.

### **6.3.5 Recuperación de *C. jejuni/coli* inoculada artificialmente en piel de pollo**

La tasa de recuperación de *C. jejuni* y *C. coli* inoculada artificialmente en piel de pollo se realizó de la siguiente manera: se adquirieron muestras de piel de pollo ya sea de muslo o pechuga en supermercados de Monterrey N. L, México.

Las muestras predominantemente se encontraban congeladas y para determinar si naturalmente estaban contaminadas con *Campylobacter* spp se procedió según la metodología publicada por el BAM capítulo 7 con algunas modificaciones. Para esto, se pesaron 25g de muestra y se enriquecieron en 100ml de caldo Bolton, el cual se incubó a 37°C por 4h en aerobiosis y posteriormente 44h más a 42°C en microaerofilia. Pasado el tiempo de incubación, se tomó una alícuota de 100µl y se estrío en placas con agar Campy-Cefex. Después de una incubación de 48h a 42°C en microaerofilia, se determinó la presencia o ausencia de *Campylobacter* spp. En el caso donde se encontró la presencia de *Campylobacter* en muestra sin inocular, todo el ensayo posterior se desechó.

Simultáneamente, se realizaron diluciones decimales seriadas de *C. jejuni* NADC 5653 y *C. coli* 19 y fueron mezcladas en proporción 1:1 a diferentes concentraciones (10 a  $1 \times 10^6$  UFC/ml). Se tomó una alícuota de 250µl de cada dilución y se inoculó en 6.25g de piel de pollo. Este procedimiento se realizó en no más de 60 min y posteriormente se

agregaron 25ml de cada caldo de enriquecimiento (Preston, Bolton, BFEB y M-BFEB) en bolsas de 4 onzas Whirl-Pak (Nasco, Ft. Atkins, WI). Los cultivos se incubaron a 42°C por 24 y 48h en microaerofilia para los dos primeros y en aerobiosis para los últimos. Después de la incubación, se tomó 1ml de cada cultivo y se realizó la técnica de PCR previamente descrita. Además, se tomó una alícuota de 100µl que se estrió en placas de agar Campy-Cefex y se incubaron a 42°C por 48h en microaerofilia. Finalmente, se determinó la presencia o ausencia de *Campylobacter* spp en la muestra. Como control negativo, se procesó una muestra no inoculada.

### **6.3.6 Recuperación de *C. jejuni* y *C. coli* inoculada artificialmente en carne de cerdo**

Para este caso se usaron las cepas de *C. jejuni* NADC 5653 y *C. coli* 19 y la metodología de inoculación descrita por Tran (1998) en donde a 49ml de medio de enriquecimiento (Preston, Bolton, BFEB y M-BFEB) se agregó 1ml de cada dilución de las cepas previamente realizadas en solución salina fisiológica estéril ( $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^0$ ,  $10^1$  y  $10^2$  UFC/ml) y 5g del alimento que comprendió carne de cerdo tipo bistec, costilla, milanesa o chuleta. En esta ocasión se seleccionó un espacio de cabeza (espacio de aire desde la superficie del cultivo hasta la tapa del tubo) de 17%.

Los cultivos se incubaron en microaerofilia para el caldo Preston y Bolton y en aerobiosis para los restantes a 42°C por 24 y 48h. Cumplido el tiempo de incubación se tomó una alícuota de 100µl y se estrió en agar Campy-Cefex el cual se incubó a 42°C por 48h en microaerofilia. Finalmente, se determinó la recuperación de *C. jejuni* y *C. coli* en la carne de cerdo inoculada artificialmente por detección de presencia o ausencia de las cepas.

## **6.4 Prevalencia de *Campylobacter* spp en muestras alimentos**

### **6.4.1 Obtención de las muestras de carne de pollo**

Se analizaron un total de 204 muestras de pollo crudo consistiendo de alitas con piel y hueso obtenidas en el periodo octubre del 2006 a septiembre de 2008.

La colecta de las 204 muestras fueron: 95 en octubre de 2006 a febrero de 2007; 24 en el periodo agosto-septiembre 2007; 68 en junio-julio 2008 y 17 en septiembre de 2008. Todas fueron adquiridas en cinco municipios del área metropolitana de Monterrey Nuevo León (San Nicolás, Escobedo, Guadalupe, Monterrey y Apodaca). El muestreo fue aleatorio obteniéndose de supermercados y mercados ambulantes, sin tomar en cuenta la marca comercial.

Se analizaron también 50 muestras de pollo cocido, entre diciembre del 2006 y marzo del 2007 (Tabla 6). Las muestras analizadas consistieron de alimentos variados, los cuales incluían, pollo asado, frito y rostizado. El muestreo se realizó aleatorio, de la misma manera que en el caso del pollo crudo.

#### **6.4.2 Obtención de las muestras de carne cerdo**

Se analizaron 150 y 49 muestras de carne de cerdo crudo y cocido respectivamente. Las muestras se adquirieron de igual manera en supermercados y mercados ambulantes de Monterrey N. L. y municipios de su área metropolitana. Este muestreo se realizó entre diciembre 2006 y marzo 2007 (Tabla 6).

Todas las muestras fueron colectadas en su empaque original y transportadas a temperatura ambiente al laboratorio para su procesamiento inmediato.

Tabla 6. Relación de muestras analizadas.

	<b>PRODUCTO CÁRNICO EN DONDE SE BUSCÓ PRESENCIA DE <i>Campylobacter</i></b>			
	<b>Carne de cerdo cruda</b>	<b>Carne de cerdo cocida</b>	<b>Carne de pollo cruda</b>	<b>Carne de pollo cocida</b>
<b>Número de muestras</b>	150	49	204	50
<b>Tipo de muestras</b>	Bistec con hueso	En salsa, asado, chicharrón, tacos mañaneros, gorditas, carnitas	Todo tipo, con piel	Pollo asado, frito y rostizado (con piel)
<b>Municipios</b>	San Nicolás, Apodaca, Monterrey, Escobedo, Guadalupe	San Nicolás, Apodaca, Monterrey, Escobedo, Guadalupe	San Nicolás, Apodaca, Monterrey, Escobedo, Guadalupe	San Nicolás, Apodaca, Monterrey, Escobedo, Guadalupe
<b>Fecha de muestreo</b>	Diciembre 2006-marzo 2007	Diciembre 2006-marzo 2007	Octubre 2006-Febrero 2007 Agosto-septiembre 2007 Junio-julio 2008 Septiembre 2008	Marzo 2007

#### 6.4.3 Procesamiento de las muestras de alimentos

Para la búsqueda de *C. jejuni* y *C. coli* en las muestras de alimentos se siguió este procedimiento (BAM, capítulo 7):

Se pesaron tres veces 25g de la muestra (en el caso de pollo, principalmente piel) y se colocaron en bolsas estériles Whirl-Pak (Nasco, Ft. Atkins, WI), posteriormente se agregaron a cada muestra 100ml de caldo de enriquecimiento ya fuera Bolton, BFEB o M-BFEB. El caldo Bolton se incubó 4h a 37°C en aerobiosis y posteriormente 44h más en microaerofilia a 42°C. Para el caso de los cultivos de BFEB y M-BFEB se incubaron a la misma temperatura por 48 h siempre en aerobiosis.

Pasado el tiempo de incubación se tomaron 100µl de cada cultivo y se estriaron en placas con agar Campy-Cefex las cuales se incubaron por 48h a 42°C de nuevo en microaerofilia. Se seleccionaron las colonias características de *Campylobacter* en dicho agar, se sembraron en agar ABS cuyas placas se incubaron bajo las mismas condiciones que el Campy-Cefex. Al mismo tiempo se tomó una alícuota de 1ml de cada cultivo al que se le realizó directamente la técnica de PCR mencionada anteriormente.

A las colonias presuntivas de *Campylobacter* se les realizaron pruebas bioquímicas convencionales para determinar la especie, las cuales consistieron en Tinción Gram con fuscina básica 0.5% como contraste (Gram negativa), observación de la movilidad en fresco bajo un microscopio de contraste de fases (movilidad tipo “sacacorcho”), reacción positiva a la oxidasa y a la catalasa, no fermentación de carbohidratos en agar triple azúcar-hierro (TSI) e hidrólisis del hipurato al 1%, positiva para *C. jejuni* y negativa para *C. coli*. Como prueba confirmatoria de *C. jejuni* o *C. coli*, las cepas aisladas se sometieron a la técnica de PCR.

Una vez identificados y confirmados, todos los aislados de *C. jejuni* y *C. coli* se sembraron en caldo ICC+EL y se incubaron 48h a 42°C en microaerofilia. Después, se tomó 1ml y se colocó en crioviales estériles con glicerol (20% v/v, Sigma) los cuales se mantuvieron a -80°C hasta su uso posterior.

#### **6.4.4 Calidad microbiológica de las muestras de alimentos**

A las muestras de carne de pollo y cerdo tanto cruda como cocida, además de la búsqueda de *C. jejuni* y *C. coli*, se les determinó la calidad microbiológica, para lo cual se realizó la cuenta de bacterias mesofílicas aerobias, mohos y levaduras, bacterias coliformes totales y bacterias coliformes fecales según la metodología reportada por la Normativa Oficial Mexicana, siendo éstas las NOM-092-SSA1-1994: Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa, así como la NOM-111-SSA1-1994: Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos, NOM-113-SSA1-1994: Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa y la metodología reportada por el BAM Capítulo 4 para coliformes fecales respectivamente.

## 6.5 Determinación del perfil de resistencia a antimicrobianos de las cepas aisladas

Para la determinación del perfil de resistencia a antimicrobianos se seleccionaron los antibióticos más comúnmente usados para el tratamiento de la campylobacteriosis: azitromicina (AZM, 15µg), ácido nalidíxico (NA, 30µg), eritromicina (E, 15µg), tetraciclina (TE, 30µg), gentamicina (CN, 10µg), ciprofloxacina (CIP, 5µg) y ampicilina (25µg) (Oxoid, Cambridge, UK). Se utilizó la metodología de Kirby-Bauer (1966) que a continuación se describe.

Todos los aislados nativos de *C. jejuni* y *C. coli* (*C. jejuni* NADC 5653 y *C. coli* 19 se usaron con controles) se sembraron en agar Mueller Hinton (Difco) con 5% de sangre hemolizada (MHS) y se incubaron por 48h a 37°C en microaerofilia. De los cultivos desarrollados en las placas, se tomaron colonias con hisopos estériles y se homogenizaron con solución salina fisiológica estéril. Se ajustaron al tubo No 0.5 del Nefelómetro de McFarland a 600nm (aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml). Después de esto, se realizaron diluciones decimales seriadas en solución salina fisiológica estéril hasta alcanzar 10 UFC/ml. Para verificar las cuentas de cada dilución, se tomó una alícuota de 1ml y se sembró por extensión en superficie en placas con agar ICC las cuales se incubaron por 48h a 37°C en microaerofilia. Finalmente se realizaron los conteos.

De la dilución  $1 \times 10^6$  UFC/ml se tomó una alícuota de 100µl y se sembró por extensión en placas de agar MHS con ayuda de un asa de Digraskly y se dejó reposar a temperatura ambiente por un máximo 10min. Posterior a eso, se colocaron sensidiscos de los antibióticos anteriormente referidos con la ayuda de unas pinzas estériles. Una vez colocados se incubaron por 48h a 37°C en microaerofilia. Pasado el tiempo de incubación se determinó si había inhibición o no en el crecimiento de *C. jejuni* y *C. coli*, y en caso de presentarlo, se midieron los halos de inhibición.

## **6.6 Análisis estadístico**

Todos los ensayos se realizaron por triplicado a excepción del procesamiento de las muestras. Los resultados de los caldos de enriquecimiento se compararon por ANOVA multivariado usando el programa Statistica version 9.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK) y Statgraphics (Centurion XVI, Stat Point Technologies Inc., Warrenton, VA) con una diferencia estadísticamente significativa cuando  $P < 0.05$ .

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Desarrollo de un medio de cultivo aeróbico

Se realizaron un total de seis formulaciones diferentes todas basadas en los medios previamente reportados para el desarrollo de *Campylobacter*. Se probaron formulaciones con inclusión de 0.15% de agar bacteriológico, inclusión o no de carbón activado, incubados en aerobiosis o 10% CO<sub>2</sub>.

De todas ellas, solo una arrojó los mejores resultados en la recuperación de *C. jejuni* y *C. coli* por lo que se decidió trabajar con ésta para los demás ensayos de este proyecto.

Dicha formulación resultó ser una modificación al caldo de enriquecimiento propuesto por Tran en 1998, el cual se incuba en aerobiosis y no posee sangre hemolizada, sin embargo sí posee carbón activado el cual se ha reportado que puede interferir en la técnica de PCR.

Por lo cual nuestra formulación denominada M-BFEB no posee ni carbón activado ni sangre hemolizada y se puede incubar en condiciones aeróbicas durante el enriquecimiento de la muestra (Tabla 3, Fig. 2).



1

2

3

Fig. 2. Apariencia final de los caldos de enriquecimiento. 1: Bolton o Preston, 2: BFEB, 3: M-BFEB.

### 7.1.1 Límite de detección y sensibilidad en la recuperación de *C. jejuni* y *C. coli*

Con dicha formulación se determinó el nivel de recuperación de siete cepas de *C. jejuni* (NADC 5653, 50sp, 57sp, 173ip, 180ip, 193ip y 238ip) y cinco cepas de *C. coli* (1, 19, 49, 75 y 81) comparándolo con los caldos Preston, Bolton y BFEB. La recuperación se determinó mediante microbiología convencional como la técnica de PCR directa.

El análisis estadístico de ANOVA multifactorial indicó que usando tanto los medios Bolton, BFEB y M-BFEB se obtenía un nivel de recuperación similar ( $P \geq 0.05$ ) para todas las cepas probadas ya sea por microbiología convencional o por PCR. Sin embargo, el medio Preston fue el menos sensible y por lo tanto estadísticamente diferente a los otros tres medios ( $P < 0.05$ ) detectando a *Campylobacter* solo cuando se inocularon en dicho medio concentraciones  $\geq 1 \times 10^3$  UFC/ml, a excepción de la cepa *C. coli* 81 la cual fue detectada usando un inóculo de 18 UFC/ml por ambos métodos (convencional y PCR; Tabla 7).

Con respecto a todas las cepas, se determinó que el medio BFEB y M-BFEB fueron igualmente sensibles en la detección de *Campylobacter* desde inóculos de 100 UFC/ml. De los cuatro medios comparados, se observó que el caldo Bolton fue el mejor en la recuperación de las cepas teniendo un mejor nivel de sensibilidad, detectando desde 1UFC/ml por ambos métodos, sin embargo estadísticamente fue similar a BFEB y M-BFEB.

Cuando comparamos la recuperación de las diferentes cepas de *C. jejuni* y *C. coli*, se determinó que el medio M-BFEB tuvo una mejor recuperación de las cepas *C. jejuni* NADC 5653, 180ip y 238ip por ambos métodos. La cepa que arrojó una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) fue la cepa *C. coli* 19. Sin embargo hubo cepas (*C. jejuni* la 50sp, 57sp y 173ip y de *C. coli* 1) que no fueron recuperadas ni cuando se encontraban en muy altas cuentas ( $10^6$  UFC/ml) mediante la técnica de PCR a partir de los caldos Preston y/o Bolton (Tabla 7).

Comparando los métodos de detección ya sea microbiológico convencional (siembra tradicional) o técnica de PCR no hubo diferencia significativa entre dichos métodos, indicando que en forma global la técnica de PCR es igualmente sensible que la técnica de siembra en agar, aunque hubo cepas que no se detectaron a ningún nivel de inóculo usando la técnica de PCR influenciado esto quizá por la composición de los medios (Tabla 7). Nuestros resultados indicaron que el medio BFEB y M-BFEB son efectivos para detectar por PCR las cepas de *Campylobacter*, además de que a pesar de que el medio BFEB contenía carbón activado, éste no interfirió en la detección de este patógeno.

También se comparó el periodo de enriquecimiento y/o crecimiento en agar, ya sea 24 o 48h de ambos, encontrando que a 24h puede detectarse a *C. jejuni* y *C. coli* tanto por microbiología tradicional en agar ABS como por PCR. Sin embargo, las colonias de *Campylobacter* a las 24h de crecimiento en dicho agar son más pequeñas y difíciles de distinguir. A las 48h de incubación las colonias ya presentaban su crecimiento característico (grisáceas, medianas y con bordes regulares).

Tabla 7. Nivel de detección de *Campylobacter* con respecto al inóculo detectado después del 48h de enriquecimiento en los caldos, mediante metodología tradicional y PCR.

CEPA		MÍNIMO NIVEL DE INÓCULO RECUPERADO DE <i>Campylobacter</i> EN EL CALDO DE ENRIQUECIMIENTO (UFC/ml)							
		Preston		Bolton		BFEB		M-BFEB	
		Trad	PCR	Trad	PCR	Trad	PCR	Trad	PCR
<i>C. jejuni</i>	NADC 5653	4x10 <sup>3</sup>	4x10 <sup>5</sup>	4	4	4	4x10 <sup>3</sup>	4	4
	50sp	1x10 <sup>5</sup>	ND*	140	ND	140	14	14	14
	57 sp	1x10 <sup>5</sup>	ND	2	ND	2	2	2	2
	180 ip	100	1000	1	100	100	100	10	10
	173 ip	1x10 <sup>4</sup>	ND	1	1	12	12	12	12
	193 ip	500	1X10 <sup>7</sup>	9	500	9	9	9	9
	238 ip	420	4X10 <sup>4</sup>	4	4	420	420	4	4
<i>C. coli</i>	1	1x10 <sup>7</sup>	ND	10	ND	10	10	10	10
	19	6 x10 <sup>4</sup>	6x10 <sup>7</sup>	6	6	6	60	6	60
	49	1x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>7</sup>	5	5	5	5	5	5
	75	3x10 <sup>4</sup>	2x10 <sup>4</sup>	3	3	3	3	3	3
	81	18	18	2	2	2	2	2	2

\*ND: No detectado

Aunado a lo anterior pudimos observar que la técnica de PCR no se vio afectada con la presencia de compuestos como sangre hemolizada y carbón activado en los caldos de enriquecimiento, los cuales, se han asociado a la inhibición de dicha técnica. Sin embargo, el tratamiento de la muestra y la técnica de extracción del DNA fueron más fáciles con el medio M-BFEB (Fig. 3).

Tamaño de  
banda (pb)

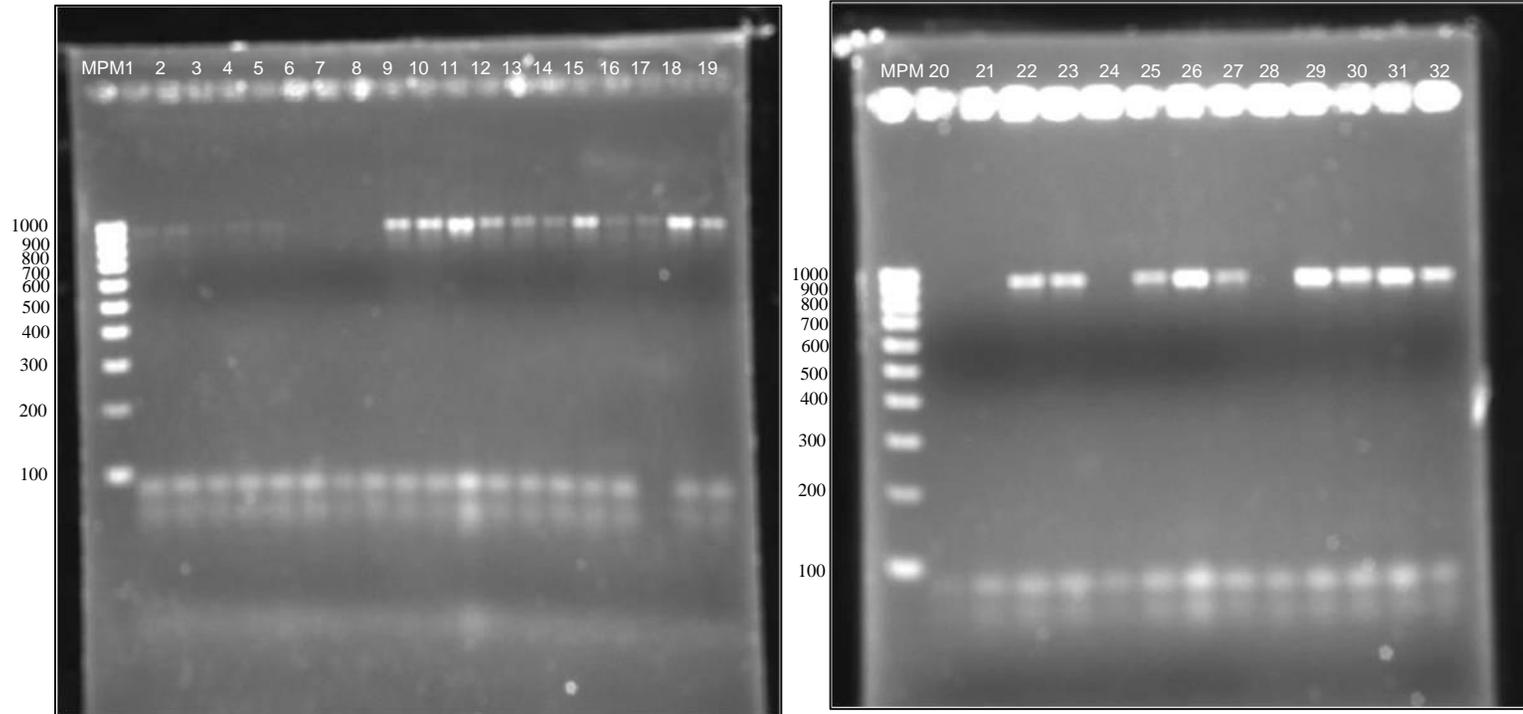


Fig. 3. Detección de *C. coli* 75 inoculada a diferentes concentraciones (de 10 a  $1 \times 10^8$  UFC/ml) en los caldos de enriquecimiento. Línea MPM: Marcador peso molecular (HyperLadder IV, BIOLINE); línea 1-8: caldo Preston; línea 9-16: caldo Bolton; línea 17-24: caldo BFEB; línea 25-32: caldo M-BFEB (línea 29 no inoculada). *C. coli*: 894pb.

### **7.1.2 Influencia de la flora competidora para la recuperación de *C. jejuni* y *C. coli* en los medios de enriquecimiento**

Se evaluó la capacidad de recuperar a *C. jejuni* NADC 5653 y *C. coli* 19 en presencia de diferentes concentraciones de flora competidora, en este caso se usó la cepa de *E. coli* ATCC 43894. Para ello, primero se verificó que *E. coli* tuviera la capacidad de crecer en todos los caldos de enriquecimiento probados, observándose que sí lo puede realizar solo cuando se encontraba en concentraciones mayores a  $10^5$  UFC/ml. Las colonias en el agar ABS fueron fácilmente distinguibles de las de *Campylobacter*.

La metodología anterior se realizó también con la cepa de *E. coli* ATCC 25922 sin embargo, ésta no tuvo la capacidad de crecer en los medios de enriquecimiento razón por la cual, se continuó el trabajo únicamente con la cepa *E. coli* ATCC 43894.

Se realizaron diferentes niveles de co-cultivo de *C. jejuni* NADC 5653 o *C. coli* 19 con *E. coli* ATCC 43894 como se especifica en la tabla 7 teniendo un total de 33 tratamientos de estos.

Con respecto a los tratamientos en proporción 1:1 de *C. jejuni*-*E. coli* se determinó que *E. coli* solo se recuperó en altas concentraciones ( $\geq 1 \times 10^5$  UFC/ml), sin embargo *C. jejuni* se recuperó aun cuando se inocularon concentraciones bajas al menos para el medio Preston a diferencia de los resultados encontrados cuando se inoculó únicamente a *C. jejuni*. Fue posible recuperar ambas cepas cuando fueron inoculadas en  $1 \times 10^6$  UFC/ml (tratamientos 1 a 8, Tabla 8).

Para el caso del co-cultivo con *C. coli*-*E. coli* (tratamientos 9-17) se obtuvieron mejores resultados dado que se pudo recuperar a *C. coli* desde 10 UFC/ml de inóculo para los medios BFEB y M-BFEB. En esta ocasión el medio Preston no permitió el desarrollo adecuado de *C. coli* a menos que el inóculo fuera de  $1 \times 10^7$  UFC/ml (Tabla 8)

Tabla 8. Recuperación de *C. jejuni* y *C. coli* en competencia con *E. coli* a las 48h de incubación de los caldos y 48h de incubación en agar Brucella-sangre a 42°C.

TRATAMIENTO	<b>BOLTON</b>		<b>PRESTON</b>		<b>BFEB</b>		<b>M-BFEB</b>	
	<i>E. coli</i>	<i>C. coli</i> o <i>C. jejuni</i>						
1	ND	ND	0/6(0)	3/6 (50)	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)
2	ND	ND	0/6(0)	3/6(50)	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)
3	ND	ND	0/6(0)	3/6(50)	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)
4	ND	ND	0/6(0)	3/6(50)	0/6(0)	2/6(33.3)	0/6(0)	0/6(0)
5	ND	ND	0/6(0)	3/6(50)	3/6(50)	2/6(33.3)	1/6(16.6)	0/6(0)
6	ND	ND	0/6(0)	3/6(50)	3/6(50)	2/6(33.3)	1/6(16.6)	2/6 (33.3)
7	ND	ND	1/6(16.6)	3/6(50)	3/6(50)	2/6(33.3)	1/6(16.6)	2/6 (33.3)
8	ND	ND	1/6(16.6)	3/6(50)	3/6(50)	2/6(33.3)	1/6(16.6)	2/6 (33.3)
9	ND	ND	0/6(0)	0/6 (0)	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)	0/6 (0)
10	ND	ND	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)	2/6(33.3)	0/6(0)	2/6 (33.3)
11	ND	ND	0/6(0)	0/6 (0)	0/6(0)	2/6(33.3)	0/6(0)	2/6 (33.3)
12	ND	ND	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)	2/6(33.3)	0/6(0)	2/6 (33.3)
13	ND	ND	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)	2/6(33.3)	0/6(0)	2/6 (33.3)
14	ND	ND	0/6(0)	0/6(0)	1/6(16.6)	2/6(33.3)	1/6(16.6)	2/6(33.3)
15	ND	ND	0/6(0)	2/6(33.3)	1/6(16.6)	2/6(33.3)	1/6(16.6)	2/6(33.3)
16	ND	ND	2/6(33.3)	2/6(33.3)	1/6(16.6)	2/6(33.3)	1/6(16.6)	2/6(33.3)
17	ND	ND	2/6(33.3)	2/6(33.3)	1/6(16.6)	2/6(33.3)	1/6(16.6)	2/6 (33.3)
18	2/2(100)	2/2(100)	4/6(66.6)	0/6(0)	4/6(66.6)	4/6(66.6)	4/6(66.6)	4/6(66.6)
19	2/2(100)	2/2(100)	4/6(66.6)	2/6(33.3)	4/6(66.6)	4/6(66.6)	4/6(66.6)	4/6(66.6)
20	0/2(0)	2/2(100)	2/6(33.3)	6/6(100)	2/6(33.3)	4/6(66.6)	2/6(33.3)	6/6(100)
21	0/2(0)	2/2(100)	0/5(0)	8/8(100)	0/8(0)	8/8(100)	0/8(0)	4/8(50)
22	2/2(100)	2/2(100)	0/6(0)	6/6(100)	2/6(33.3)	6/6(100)	2/6(33.3)	6/6(100)
23	0/2(0)	2/2(100)	0/6(0)	6/6(100)	0/6(0)	6/6(100)	0/6(0)	6/6(100)
24	0/2(0)	2/2(100)	0/6(0)	6/6(100)	0/6(0)	6/6(100)	0/6(0)	6/6(100)
25	0/2(0)	2/2(100)	0/6(0)	4/6(66.6)	0/6(0)	6/6(100)	0/6(0)	6/6(100)
26	2/2(100)	2/2(100)	2/6(33.3)	2/6(33.3)	4/6(66.6)	4/6(66.6)	4/6(66.6)	6/6(100)
27	2/2(100)	2/2(100)	2/6(33.3)	2/6(33.3)	0/6(0)	6/6(100)	0/6(0)	6/6(100)
28	0/2(0)	2/2(100)	0/6(0)	2/6(33.3)	0/6(0)	6/6(100)	0/6(0)	6/6(100)
29	0/2(0)	2/2(100)	0/6(0)	4/6(66.6)	2/6(33.3)	6/6(100)	2/6(33.3)	6/6(100)
30	0/2(0)	2/2(100)	0/6(0)	4/6(66.6)	2/6(33.3)	6/6(100)	0/6(0)	6/6(100)
31	0/2(0)	2/2(100)	2/6(33.3)	4/6(66.6)	0/6(0)	6/6(100)	0/6(0)	6/6(100)
32	0/2(0)	2/2(100)	2/6(33.3)	4/6(66.6)	0/4(0)	4/4(100)	2/6(33.3)	6/6(100)
33	0/2 (0)	2/2(100)	2/6(33.3)	4/6(66.6)	0/4(0)	4/4(100)	2/6(33.3)	6/6(100)

ND: No determinado

Con respecto a los resultados obtenidos en co-cultivo con proporciones diferentes de ambas cepas, encontramos que tanto *C. coli* como *C. jejuni* en presencia de *E. coli*, se detectaron a niveles bajos de inóculo (10 UFC/ml) para el caso de los medios BFEB y M-BFEB aún en presencia de altas concentraciones de *E. coli* ( $10^7$ - $10^8$  UFC/ml). Para este ensayo se comparó además el caldo Bolton en donde se encontró el mismo comportamiento que para los medios anteriores, es decir que ambas cepas de *Campylobacter* se detectaron cuando se inocularon desde niveles de 10UFC/ml aun con concentraciones de *E. coli* de  $10^8$  UFC/ml (Tabla 8).

Para el caso del caldo Preston, *C. jejuni* se detectó cuando se inoculó en concentraciones de  $10^3$  UFC/ml en presencia de  $\leq 10^6$  UFC/ml de *E. coli*. Por lo anterior, el medio Preston resultó ser el menos sensible para la detección del *C. coli* en presencia de *E. coli* ya que no se obtuvo una tasa de recuperación del 100% aún cuando se inocularon altas concentraciones de *Campylobacter* y bajas de *E. coli* (Tabla 8).

### **7.1.3 Recuperación de *C. jejuni* y *C. coli* inoculada artificialmente en piel de pollo**

Se inoculó una mezcla de *C. jejuni* NADC 5653 y *C. coli* 19 en muestras de piel de pollo en concentraciones desde 10 hasta  $1 \times 10^6$  UFC/ml de cada cepa. Se evaluó la recuperación de ambas cepas ya sea por el método tradicional o PCR directamente de los caldos de enriquecimiento. Se encontró que mediante la siembra en agar Campy-Cefex se logró la recuperación de *Campylobacter* spp desde la dilución más baja (10UFC/ml) en los cuatro medio probados (Tabla 9).

En tanto que por PCR, con respecto al medio Preston, *C. jejuni* se detectó en el 100% de los casos cuando se encontraba a concentraciones  $\geq 10^3$  UFC/ml y para *C. coli* a partir de  $10^4$  UFC/ml. En tanto que el caldo Bolton, permitió la detección de *C. jejuni* desde 10 UFC/ml de inóculo y para *C. coli* los resultados fueron muy inconstantes detectándose solo en el 100% de los casos cuando se inoculó  $10^4$  UFC/ml. Para el medio BFEB, *C. jejuni* fue detectada en el 100% de los casos cuando la inoculación fue de  $10^6$  UFC/ml, sin embargo, *C. coli* pudo detectarse desde un nivel de inóculo de 10 UFC/ml.

Finalmente el que mejores resultados arrojó fue el medio M-BFEB ya que éste permitió la detección (100%) de ambas cepas desde un bajo inóculo (10 UFC/ml) (Tabla 9).

El análisis de ANOVA multifactorial indicó que el medio M-BFEB fue diferente significativamente ( $P < 0.05$ ) con respecto a los otros tres medios siendo el que mejores resultados presentó para su uso directo por PCR.

Tabla 9. Recuperación de *C. jejuni* y *C. coli* inoculada artificialmente en piel de pollo en mezclas a diferentes concentraciones (10 a  $10^6$  UFC/ml). Detección a las 48 h de enriquecimiento mediante el método tradicional (siembra en agar Campy-Cefex) y por PCR.

INÓCULO (UFC/ml)	PRESTON		BOLTON		BFEB		M-BFEB	
	Trad	PCR	Trad	PCR	Trad	PCR	Trad	PCR
<b>10</b>	+	Cj <sup>1</sup> (1/4) Cc <sup>2</sup> (2/4)	+	Cj (4/4) Cc (1/4)	+	Cj (2/4) Cc (4/4)	+	Cj (4/4) Cc (4/4)
<b>10<sup>2</sup></b>	+	Cj (3/4) Cc (4/4)	+	Cj (4/4) Cc (0/4)	+	Cj (2/4) Cc (4/4)	+	Cj (4/4) Cc (4/4)
<b>10<sup>3</sup></b>	+	Cj (4/4) Cc (3/4)	+	Cj (4/4) Cc (2/4)	+	Cj (2/4) Cc (4/4)	+	Cj (4/4) Cc (4/4)
<b>10<sup>4</sup></b>	+	Cj (4/4) Cc (4/4)	+	Cj (2/2) Cc (2/2)	+	Cj (3/4) Cc (4/4)	+	Cj (4/4) Cc (4/4)
<b>10<sup>5</sup></b>	+	Cj (4/4) Cc (4/4)	+	Cj (4/4) Cc (3/4)	+	Cj (2/4) Cc (3/4)	+	Cj (4/4) Cc (4/4)
<b>10<sup>6</sup></b>	+	Cj (4/4) Cc (4/4)	+	Cj (4/4) Cc (3/4)	+	Cj(4/4) Cc (4/4)	+	Cj (4/4) Cc (4/4)

Cj: *C. jejuni*; Cc: *C. coli*; (No. ensayos positivos/No. ensayos realizados)

En el caso de la identificación de *C. jejuni* y *C. coli* inoculada en la piel de pollo mediante la técnica de PCR, solo se observó inhibición de la misma para algunos casos, principalmente después del enriquecimiento con el medio Bolton (Fig. 4).

Tamaño de  
banda (pb)

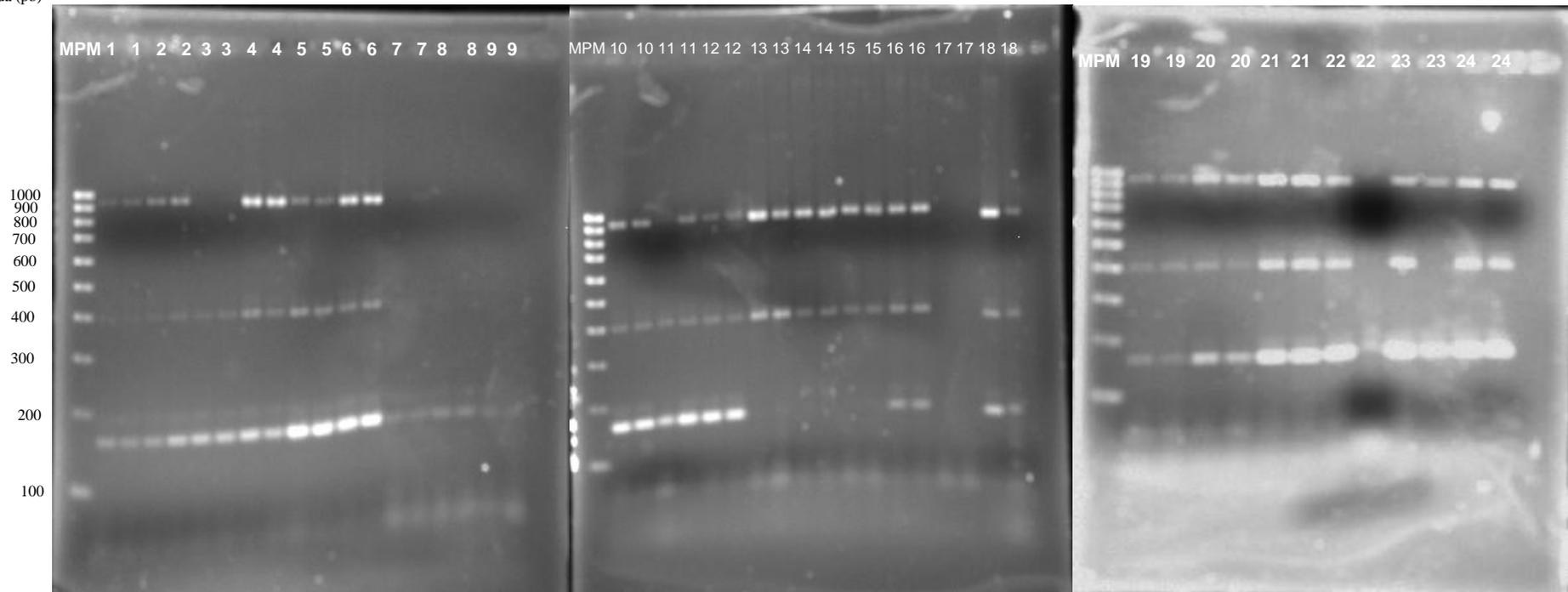


Fig. 4. Identificación de la mezcla de *C. jejuni* y *C. coli* inoculada artificialmente en piel de pollo mediante la técnica de PCR directamente a partir de los caldos de enriquecimiento. Línea MPM: Marcador Peso molecular (HyperLadder IV, BIOLINE); línea 1-6: Caldo Preston ( $10$  a  $10^6$  UFC/ml); línea 7-12: Caldo Bolton ( $10$  a  $10^6$  UFC/ml); línea 13-18: Caldo BFEB ( $10$  a  $10^6$  UFC/ml); línea 19-24: Caldo M-BFEB ( $10$  a  $10^6$  UFC/ml). *C. coli*: 894pb, *C. jejuni*: 159pb, *C. jejuni/coli*: 400pb.

#### 7.1.4 Recuperación de *C. jejuni* y *C. coli* inoculada artificialmente en carne de cerdo

Para este caso se empleó la metodología de inoculación descrita por Tran en 1998. Se inoculó desde < 1UFC/ml por separado cada cepa de *Campylobacter* en la carne de cerdo y se determinó el nivel de recuperación utilizando la metodología tradicional por siembra en agar Campy-Cefex.

Se enriqueció en los cuatro medios probados y se encontró que para el caso de la cepa de *C. jejuni*, el medio Preston permitió la recuperación de las cepas aún y cuando el inóculo fue tan bajo como 10 UFC/ml, en tanto que para los otros tres medios (Bolton, BFEB y M-BFEB) se pudo detectar al microorganismo cuando se encontraba desde 1 UFC/ml (Tabla 10).

Cuando estudiamos *C. coli* encontramos que el medio Preston pudo detectar al microorganismo sólo cuando se encontraban como mínimo 100 UFC/ml, seguido del medio BFEB el cual detectaba desde 10 UFC/ml. El medio Bolton y el M-BFEB fueron los más sensibles ya que pudieron detectar a la bacteria cuando se encontraba presente desde 1 UFC/ml (Tabla 10).

Tabla 10. Nivel de detección de *Campylobacter* inoculada artificialmente en la carne de cerdo utilizando diferentes medios de enriquecimiento incubados por 48 h y seguido de siembra en agar Campy-cefex por 48h a 42°C.

CEPA	MÍNIMO NIVEL DE INÓCULO RECUPERADO DE <i>Campylobacter</i> EN EL CALDO DE ENRIQUECIMIENTO (UFC/ml)			
	Preston	Bolton	BFEB	M-BFEB
<i>C. jejuni</i> NADC 5653	10	<1	1	1
<i>C. coli</i> 19	100	< 1	10	1

## 7.2 Prevalencia de *Campylobacter* spp en muestras alimentos

Estos ensayos se analizaron siguiendo dos metodologías diferentes: por método tradicional basado en el BAM capítulo 7 y por PCR directamente a partir del caldo de enriquecimiento (Bolton, BFEB y M-BFEB)

### 7.2.1 Carne de pollo

Se analizaron un total de 204 muestras en periodos estacionales (verano 24 en el 2007 [agosto-septiembre] y 85 en el 2008 [junio-julio y septiembre] e invierno, 95 del 2007 [octubre 2006-febrero 2007]).

Según el método tradicional, de las 204 muestras analizadas, *Campylobacter* estuvo presente en total usando todos los medios de enriquecimiento en el 9.8% (20) de las muestras, de las cuales 6 correspondieron a *C. jejuni*, representando esto el 30% de los 20 aislados y el 2.9% de las muestras originales. Para el caso de *C. coli* se encontró en 14 muestras, siendo esto el 70% de los 20 aislados y el 6.86% del total analizado.

Cuando utilizamos el caldo Bolton como enriquecimiento, se encontró a *Campylobacter* en 14 muestras (70% del total de aislados y 6.86% del total de muestras), de las cuales 9 se identificaron como *C. coli* y 5 como *C. jejuni*. El caldo M-BFEB permitió detectar el microorganismo en 5 muestras (25% de los 20 aislados y 2.45% de las 204 muestras), de las cuales 4 fueron *C. coli* y solo una fue *C. jejuni*. El medio BFEB fue el que menos muestras positivas detectó ya que solo se obtuvo 1 muestra positiva que fue identificada como *C. coli* (5% de todos los aislados y 0.49% de todas las muestras) (Tabla 11 y Fig. 5).

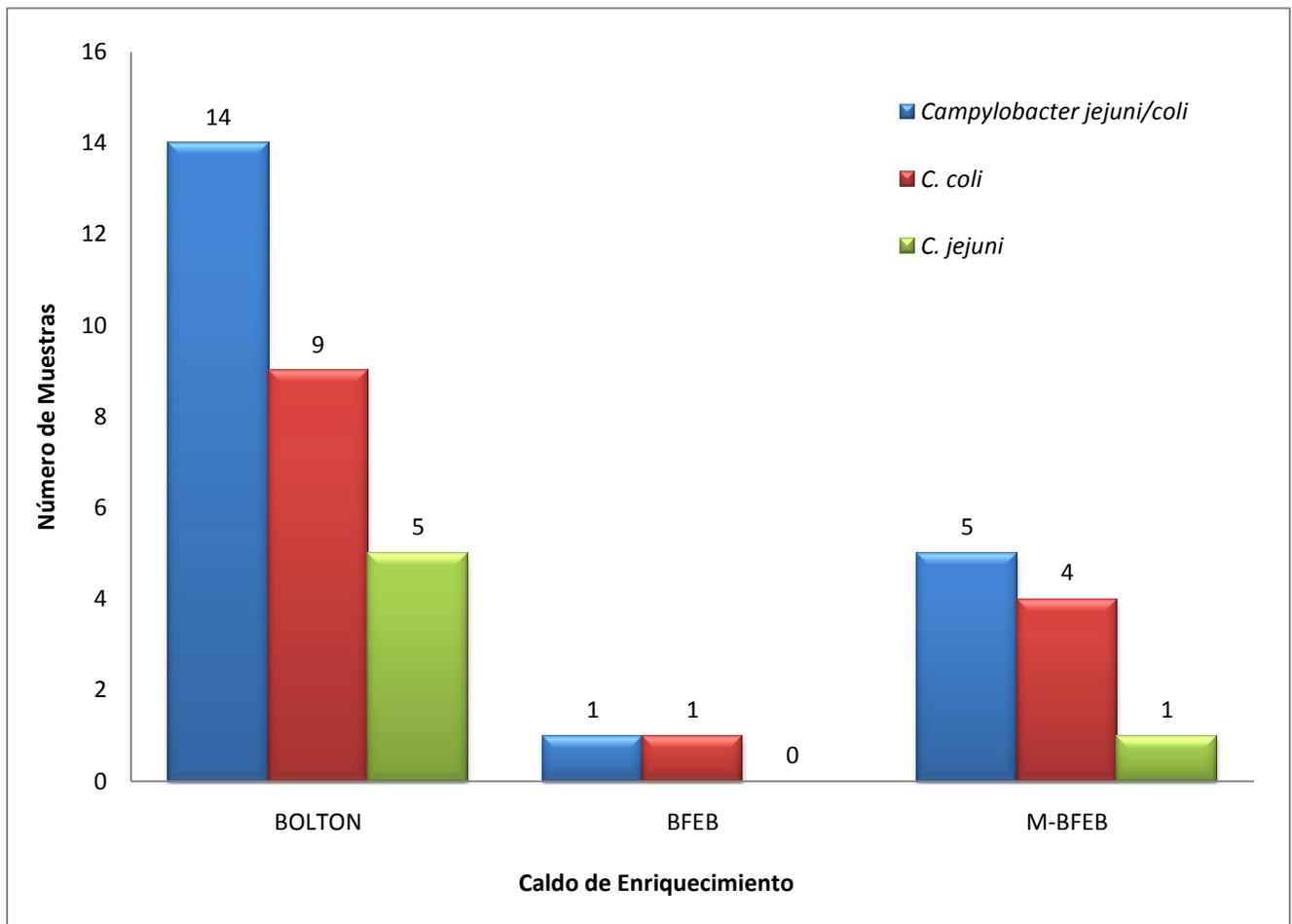


Fig. 5. Número de muestras positivas de *C. jejuni* y/o *C. coli* a partir de los caldos de enriquecimiento siguiendo posteriormente la metodología tradicional.

Cuando empleamos la metodología de PCR directamente a partir del caldo de enriquecimiento los resultados que se obtuvieron fueron muy diferentes a los anteriores. De las 204 muestras analizadas por todos los caldos de enriquecimiento se obtuvieron 85 muestras positivas para *C. jejuni* o *C. coli* representando esto el 41.6%. De éstos, 69 fueron identificados como *C. jejuni* (81.7% del total de positivos y 33.8% de todas las muestras) y 16 identificados como *C. coli* (18.8% del total de positivos y 7.84% del total de muestras).

Cuando analizamos la efectividad de los medios de enriquecimiento probados encontramos que usando el caldo Bolton, 33 muestras fueron positivas para *Campylobacter* representando esto el 38.8% del total de positivas y 16.17% de las muestras analizadas. De éstas, 24 se identificaron como *C. jejuni* y 9 como *C. coli*. Para el caso de medio BFEB, 28 muestras fueron positivas para *Campylobacter* (32.9% del total de positivas y 13.7% del total analizado) correspondiendo 23 a *C. jejuni* y 5 a *C. coli*. Finalmente, usando el medio M-BFEB como enriquecimiento encontramos a *Campylobacter* en 24 muestras (28.2% de las positivas y 11.76% de todas las muestras analizadas) de las cuales, 22 fueron *C. jejuni* y 2 *C. coli* (Tabla 11 y Fig. 6).

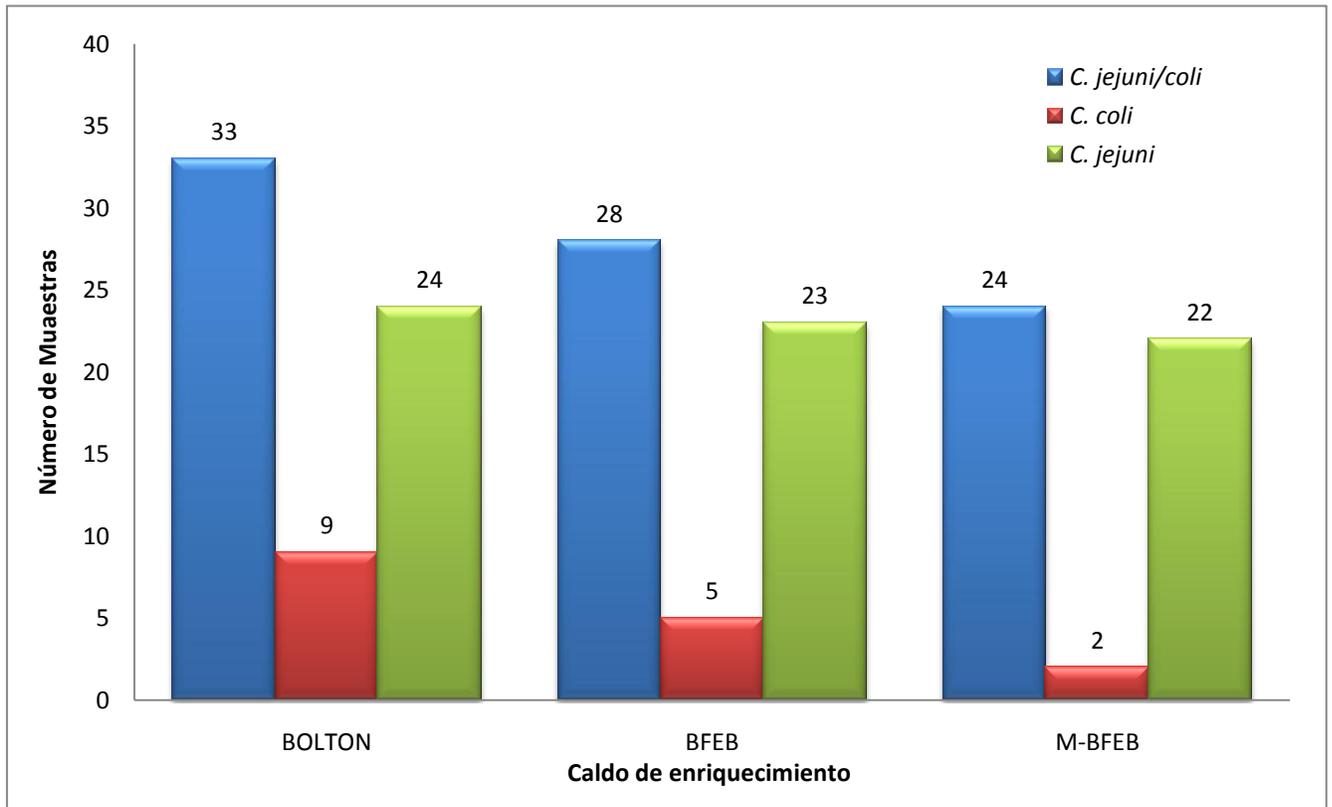


Fig. 6. Número de muestras positivas de *C. jejuni* y/o *C. coli* a partir de diferentes caldos de enriquecimiento siguiendo para su análisis la técnica de PCR.

Tabla 11. Aislados de *C. jejuni* y *C. coli* a partir de muestras de carne de pollo crudo empleando tres medios de enriquecimiento y siguiendo la metodología convencional y directo a PCR.

METODOLOGÍA	MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO	AISLADOS <i>C. jejuni</i> (%)	AISLADOS <i>C. coli</i> (%)	TOTAL AISLADOS <i>C. jejuni/coli</i> (%)
<b>Método tradicional</b>	Bolton	5	9	14 (70)
	BFEB	0	1	1 (5)
	M-BFEB	1	4	5 (25)
	<b>Total</b>	6 (30)	14 (70)	20 (9% de 204)
<b>PCR directo de caldo de enriquecimiento</b>	Bolton	24	9	33 (38.8)
	BFEB	23	5	28 (32.9)
	M-BFEB	22	2	24(28.5)
	<b>Total</b>	69 (81.7)	16 (18.8)	85 (41.6% de 204)

Todos los aislados obtenidos por microbiología convencional se confirmaron por la técnica de PCR reportada previamente. Una cuestión interesante que observamos es que las cepas positivas provenían de diferente muestra y diferente medio de enriquecimiento, no encontrando concordancia entre los resultados positivos obtenidos, sin embargo. *C. coli* fue la especie más abundante. Con respecto a la estación del año analizada no hubo diferencia entre las muestras positivas durante el invierno y verano ya que en ambas estaciones se encontraron 10 muestras positivas. El municipio que hubo más muestras positivas fue San Nicolás de los Garza con 11 muestras, seguido de Apodaca con 4, Escobedo con 3 y finalmente 2 de Monterrey (Tabla 12).

Tabla 12. Relación de las muestras positivas de pollo para *Campylobacter*, analizadas mediante 3 diferentes medios de enriquecimiento.

				CALDO DE ENRIQUECIMIENTO			ESPECIE IDENTIFICADA
Municipio	Tipo de muestra	Clave de muestra	Fecha de muestreo	Bolton	BFEB	M-BFEB	
Monterrey	Pollo completo	009	24/10/06	+	-	-	<i>C. jejuni</i>
Apodaca	Muslo	034	09/11/06	+	-	-	<i>C. jejuni</i>
Apodaca	Pechuga	054	12/12/06	+	-	-	<i>C. coli</i>
Monterrey	Pierna y muslo	060	15/01/07	+	-	-	<i>C. jejuni</i>
Escobedo	Pierna y muslo	062	16/01/07	-	-	+	<i>C. coli</i>
Escobedo	Pechuga	066	16/01/07	-	-	+	<i>C. coli</i>
Escobedo	Pechuga	074	16/01/07	-	-	+	<i>C. coli</i>
SNG	Alas	27PF	14/01/08	-	-	+	<i>C. jejuni</i>
SNG	Alas	30PF	14/01/08	+	-	-	<i>C. coli</i>
Apodaca	Pollo completo	BCO48h	28/01/08	+	-	-	<i>C. coli</i>
SNG	Piel	31PV	Julio/08	+	-	-	<i>C. jejuni</i>
SNG	Piel	35PV	Julio/08	+	-	-	<i>C. jejuni</i>
SNG	Alas	61PV	Julio/08	-	+	-	<i>C. coli</i>
SNG	Alas	67PV	Julio/08	+	-	-	<i>C. coli</i>
SNG	Alas	68PV	Julio/08	+	-	-	<i>C. coli</i>
SNG	Pierna y muslo	01pf	01/09/08	-	-	+	<i>C. coli</i>
SNG	Alas	04pf	01/09/08	+	-	-	<i>C. coli</i>
SNG	Alas	07pf	02/09/08	+	-	-	<i>C. coli</i>
Apodaca	Alas	12pf	08/09/08	+	-	-	<i>C. coli</i>
SNG	Alas	17pf	09/09/08	+	-	-	<i>C. coli</i>

SNG: San Nicolás de los Garza, +: muestra positiva; -: muestra negativa.

Tamaño de  
banda (pb)

Tamaño de  
banda (pb)

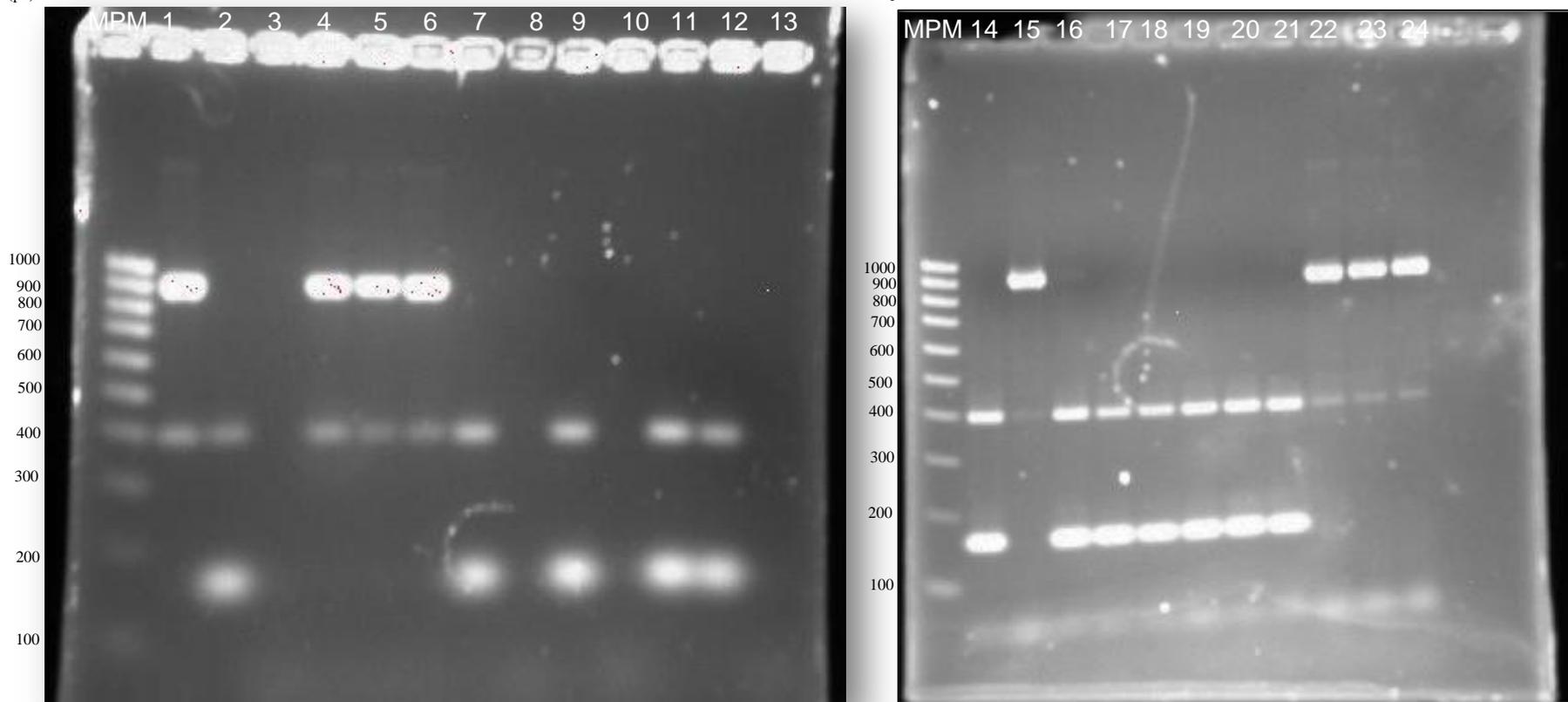


Fig. 7. Confirmación de los aislados de *Campylobacter* a partir de las muestras de pollo. Línea MPM: Marcador Peso molecular (HyperLadder IV, BIOLINE); línea 1 y 15: Cepa control *C. coli* 19; línea 2 y 14: cepa control *C. jejuni* NADC 5653; línea 3: Muestra 014T; línea 4: Muestra 062F; línea 5: Muestra M424; línea 6: Muestra 054B; línea 7: Muestra 034B; línea 8: Muestra 002B; línea 9: Muestra 060B; línea 10: Muestra 031CF; línea 11: Muestra 009B; línea 12: Muestra 074F; línea 13: Muestra 07CF; línea 16: Muestra 27PFF; línea 17: Muestra 009B; línea 18: Muestra BCO48h; línea 19: Muestra 31PVB; línea 20 y 21: Muestra 35PVB; línea 22: Muestra 61PVT; línea 23: Muestra 67PVB; línea 24: Muestra 68PVB. *C. coli*: 894pb, *C. jejuni*: 159pb, *C. jejuni/coli*: 400pb.

### **7.2.2 Carne de cerdo**

Se analizaron 199 muestras de carne de cerdo (150 crudas y 49 cocidas) para la presencia de *Campylobacter* utilizando Bolton, BFEB y M-BFEB como medios de enriquecimiento y posteriormente siguiendo la técnica tradicional o directo a PCR, sin embargo no encontramos ninguna muestra positiva por todos los sistemas probados.

### **7.3 Calidad microbiológica de las muestras de alimentos**

Además de la búsqueda de *C. jejuni* y *C. coli* en las muestras de alimentos se determinó la calidad microbiológica de las mismas mediante la cuenta de bacterias mesofílicas aerobias, bacterias coliformes totales y fecales así como mohos y levaduras en base a la normativa mexicana vigente, con excepción de la determinación de coliformes fecales la cual se realizó usando la metodología del BAM.

#### **7.3.1 Carne pollo cruda**

Para el caso de las muestras de carne de pollo crudo únicamente se les determinó la calidad microbiológica a 95 de ellas, en las que se encontró que en base a la cuenta de bacterias mesofílicas aerobias el 46.8% de las muestras tenían valores  $>1 \times 10^5$  UFC/g. Asimismo, en el caso de la cuenta de bacterias coliformes totales se encontraron solo el 5.31% de las muestras con valores  $<10$  UFC/g y 9.57% con valores  $> 1 \times 10^5$  UFC/g. Para el caso de la determinación de coliformes fecales, se encontró el 9.52% de muestras con cuentas de  $<10$  UFC/g y 1.19% con  $>1 \times 10^5$  UFC/g. En cuanto a las cuentas de mohos y levaduras se encontraron en su mayoría entre  $<10$  y 100 UFC/g para los primeros, en tanto que para los segundos, la mayor proporción osciló entre  $<100$  y  $1 \times 10^4$  UFC/g (Tabla 13).

Tabla 13. Número de muestras positivas de carne de pollo cruda para diferentes parámetros.

RANGOS (UFC/g)	NÚMERO DE MUESTRAS POSITIVAS				
	Mesófilos aerobios (%)	Coliformes totales (%)	Coliformes fecales (%)	Mohos (%)	Levaduras (%)
< 10	0 (0)	5 (5.3)	8 (9.5)	34 (36.2)	11 (11.7)
11-100	0 (0)	10 (10.6)	20 (23.8)	34 (36.2)	22 (23.4)
101-10 <sup>3</sup>	5 (5.3)	27 (28.7)	38 (45.2)	18 (19.1)	26 (27.7)
1001-10 <sup>4</sup>	22 (23.4)	29 (30.9)	14 (16.7)	4 (4.3)	25 (26.6)
10001-10 <sup>5</sup>	20 (21.3)	14 (14.9)	3 (3.6)	4 (4.3)	10 (10.6)
> 10 <sup>5</sup>	47 (50)	9 (9.6)	1 (1.2)	0 (0)	0 (0)

### 7.3.2 Carne pollo cocida

En cuanto a la calidad microbiológica de la carne de pollo cocida, se determinó para las 50 muestras analizadas, las cuales incluían muestras de ensalada, pollo asado, rostizado, empanizado y frito. La normativa oficial mexicana indicaba hasta noviembre (NOM-093-SSA1-1994) del año pasado que para productos cocidos y preparados a base de carne de ave el límite permisible para mesófilos aerobios era de  $1.5 \times 10^5$  UFC/g encontramos que 10 muestras rebasaron de este rango, la cuenta de mohos y levaduras fue baja, tomando en cuenta que el valor máximo para ambos fue de 1000 UFC/g (Tabla 14). Sin embargo, a partir de 26 de noviembre de 2010 quedó derogada dicha normativa y actualmente no se establece límite permisibles para estos productos.

Tabla 14. Número de muestras positivas de carne de pollo cocida para diferentes parámetros.

RANGOS (UFC/g)	NÚMERO DE MUESTRAS POSITIVAS				
	Mesófilos aerobios (%)	Coliformes totales (%)	Coliformes fecales (%)	Mohos (%)	Levaduras (%)
< 10	3 (1.5)	39 (19.5)	42 (21)	48 (24)	46 (23)
11-100	12 (6)	4 (2)	2 (1)	1 (0.5)	2 (1)
101-10 <sup>3</sup>	12 (6)	3 (1.5)	2 (1)	1 (0.5)	2 (1)
1001-10 <sup>4</sup>	9 (4.5)	3 (1.5)	2 (1)	0 (0)	0 (0)
10001-10 <sup>5</sup>	4 (2)	0 (0)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)
> 10 <sup>5</sup>	10 (5)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)

### 7.3.3 Carne de cerdo cruda

Del análisis de 150 muestras de diferentes cortes de carne de cerdo cruda se determinó que más del 95% de las muestras presentaron valores menores a 10<sup>4</sup> UFC/g de mesófilos aerobios totales y el 4.7% mostró cuentas elevadas (>10<sup>5</sup> UFC/g). El 75% de las muestras contenían <10<sup>3</sup> UFC/g de microorganismos coliformes totales, en tanto el 90% de las muestras presentaron <10<sup>3</sup> UFC/g de microorganismos coliformes fecales. La mayoría de las muestras (52.7%) contenían cuentas menores a 10UFC/g de mohos y levaduras (Tabla 15).

Tabla 15. Número de muestras positivas de carne de cerdo cruda para diferentes parámetros.

RANGOS (UFC/g)	NÚMERO DE MUESTRAS POSITIVAS			
	Mesófilos aerobios (%)	Coliformes totales (%)	Coliformes fecales (%)	Mohos y levaduras (%)
< 10	5 (3.3%)	54 (36%)	96 (64%)	79 (52.7%)
11-100	59 (39.3%)	56 (37.3%)	40 (26.7%)	49 (32.7%)
101-10 <sup>3</sup>	62 (41.3%)	28 (18.7%)	13 (8.7%)	16 (10.7%)
1001-10 <sup>4</sup>	17 (11.3%)	8 (5.3%)	1 (0%)	1 (0%)
> 10 <sup>5</sup>	7 (4.7%)	4 (2.7%)	0 (0%)	5 (3.3%)

### 7.3.4 Carne de cerdo cocida

Se analizaron 50 muestras de carne de cerdo cocida, y encontramos que el 5% de éstas no cumplía con la normativa vigente hasta noviembre del 2010 (NOM-093-SSA1-1994) en cuanto a los mesófilos aerobios ( $1.5 \times 10^5$  UFC/g) y para el caso de los coliformes totales y fecales la mayoría de las muestras (19.5 y 21% respectivamente) tuvieron cuentas menores a los 10 UFC/g, sin embargo, hubo muestras que presentaron cuentas altas tanto de coliformes totales como fecales. Para mohos y levaduras, todas las muestras presentaron valores menores a 1000 UFC/g para ambas determinaciones (Tabla 16). Sin embargo, actualmente no existe normativa mexicana que indique los límites permisibles para ello.

Tabla 16. Número de muestras positivas de carne de cerdo cocida para diferentes parámetros.

RANGOS (UFC/g)	NÚMERO DE MUESTRAS POSITIVAS				
	Mesófilos aerobios (%)	Coliformes totales (%)	Coliformes fecales (%)	Mohos (%)	Levaduras (%)
< 10	3 (1.5)	39 (19.5)	42 (21)	48 (24)	46 (23)
11-100	12 (6)	4 (2)	2 (1)	1 (0.5)	2 (1)
101-10 <sup>3</sup>	12 (6)	3 (1.5)	2 (1)	1 (0.5)	2 (1)
1001-10 <sup>4</sup>	9 (4.5)	3 (1)	2 (1)	0 (0)	0 (0)
10001-10 <sup>5</sup>	4 (2)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)
> 10 <sup>5</sup>	10 (5)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0)	0 (0)

### 7.4 Determinación del perfil de resistencia a antimicrobianos de las cepas aisladas

A los aislados se les determinó su perfil de resistencia a siete antimicrobianos comúnmente reportados para el tratamiento de infecciones con *Campylobacter* siendo éstos: azitromicina (AZM, 15µg), ácido nalidíxico (NA, 30µg), eritromicina (E, 15µg), tetraciclina (TE, 30µg), gentamicina (CN, 10µg), ciprofloxacina (CIP, 5µg) y ampicilina (25µg). Se utilizaron las cepas *C. jejuni* NADC 5653 y *C. coli* 19 como controles.

Para determinar la sensibilidad (S), sensibilidad intermedia (I) y/o resistencia (R) de las cepas frente a los antimicrobianos usando la técnica de difusión en disco, nos basamos en lo reportado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (Tabla 17).

Tabla 17. Zonas de inhibición mostrada por cepas de *Campylobacter* aislados a partir de carne de pollo cruda a diferentes antibióticos mediante la técnica de difusión en disco de acuerdo a National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

AGENTE ANTIMICROBIANO	CONCENTRACIÓN DE ANTIBIÓTICO ANALIZADA (µg/ml)	PUNTOS DE CORTE, ZONA DE INHIBICIÓN (cm)		
		Sensible	Intermedia	Resistente
Ácido nalidíxico	30	≥1.9	1.4-1.8	≤1.3
Eritromicina	15	≥2.3	1.4-2.2	≤1.3
Tetraciclina	30	≥1.9	1.5-1.8	≤1.4
Gentamicina	10	≥1.9	1.3-1.4	≤1.2
Ciprofloxacina	5	≥2.1	1.6-2.0	≤1.5
Ampicilina	NR	NR	NR	≤1.1*
Azitromicina	NR	NR	NR	

NR. No Reportado.

\*According to the performance standards for antimicrobial susceptibility tests, NCCLS, July 1975.

Con respecto a lo anterior se muestra la medida en centímetros de la zona de inhibición mediante la técnica de difusión en disco para los aislados de *C. jejuni* y *C. coli* y las cepas usadas como control (Tabla 18).

Tabla 18. Zonas de inhibición y patrón de sensibilidad a los antimicrobianos probados a concentraciones definidas sobre los aislados de *Campylobacter* usando la metodología de difusión en disco.

CEPA	Especie identificada	Inóculo (UFC/ml)	Antimicrobiano (concentración probada)						
			Zona de inhibición en cm ± desviación estándar						
			AZITROMICINA (15µg)	ÁCIDO NALIDÍXICO (30µg)	ERITROMICINA (15µg)	TETRACICLINA (30µg)	GENTAMICINA (10µg)	CIPROFLOXACINA (5µg)	AMPICILINA (25µg)
19	<i>C. coli</i>	1.64 X 10 <sup>5</sup>	4.8 ±0.3 (S)	3.5±0.5 (S)	3.6±0.3 (S)	4.9±0.4 (S)	3.5±0.3 (S)	4.8±0.5 (S)	2.3±1.1 (S)
NADC 5653	<i>C. jejuni</i>	2.75 X 10 <sup>5</sup>	5.6 ±0.2 (S)	3.3±0.3 (S)	4.7±0.3 (S)	6.3±0.8 (S)	3.8±0.3 (S)	5.3±0.1 (S)	3.5±0.3 (S)
054B	<i>C. coli</i>	6.40 X 10 <sup>5</sup>	NI (R)	NI (R)	NI (R)	NI (R)	3.9±0.2 (S)	NI (R)	3.6±0.5 (S)
009B	<i>C. jejuni</i>	1.56 X 10 <sup>6</sup>	5.0 ±0.5 (S)	NI (R)	4.0±0.2 (S)	5.7±0.2 (S)	3.5±0.1 (S)	NI (R)	3.6±0.1 (S)
062F	<i>C. coli</i>	3.98 X 10 <sup>5</sup>	5.0 ±0.0 (S)	2.9±0.1 (S)	4.1±0.4 (S)	5.3±0.3 (S)	3.8±0.1 (S)	4.9±0.4 (S)	3.1±1.5 (S)
074F	<i>C. coli</i>	1.43 X 10 <sup>6</sup>	5.1 ±0.6 (S)	3.5±0.1 (S)	4.0±0.4 (S)	5.9±0.5 (S)	3.8±0.2 (S)	5.4±0.7 (S)	3.3±0.6 (S)
034B	<i>C. jejuni</i>	1.93 X 10 <sup>5</sup>	6.4 ±0.5 (S)	3.8±0.1 (S)	4.4±0.4 (S)	NI (R)	4.3±0.3 (S)	5.3±0.3 (S)	4.1±0.4 (S)
066F	<i>C. coli</i>	2.26 X 10 <sup>5</sup>	4.7 ±0.1 (S)	3.6±0.5 (S)	4.3±0.3 (S)	5.2±0.8 (S)	3.7±0.2 (S)	5.2±0.4 (S)	3.4±0.4 (S)
060B	<i>C. jejuni</i>	6.22 X 10 <sup>5</sup>	5.9 ±0.6 (S)	3.6±0.2 (S)	5.0±0.3 (S)	6.3±0.8 (S)	3.3±0.4 (S)	5.2±0.4 (S)	3.9±0.9 (S)
27PFF	<i>C. jejuni</i>	2.96 X 10 <sup>5</sup>	5.1 ±0.3 (S)	NI (R)	4.2±0.2 (S)	5.7±0.4 (S)	3.8±0.3 (S)	NI (R)	2.8±0.6 (S)
30PFB	<i>C. coli</i>	3.18 X 10 <sup>5</sup>	NI (R)	NI (R)	NI (R)	NI (R)	4.4±0.7 (S)	NI (R)	3.3±0.9 (S)
BCO48H	<i>C. coli</i>	4.43 X 10 <sup>5</sup>	4.7 ±0.2 (S)	NI (R)	4.1±0.1 (S)	5.5±0.4 (S)	3.7±1.6 (S)	1.9±0.5 (S)	4.9±0.3 (S)
M424	<i>C. coli</i>	7.37 X 10 <sup>5</sup>	5.1± 1.2 (S)	3.8±0.7 (S)	4.6±0.6 (S)	5.8±0.9 (S)	3.5±0.3 (S)	5.6±0.3 (S)	3.4±0.7 (S)
31PVB	<i>C. jejuni</i>	2.00 X 10 <sup>5</sup>	5.5 ±0.5 (S)	3.5±0.5 (S)	4.5±0.1 (S)	NI (R)	4.3±0.3 (S)	5.2±0.2 (S)	4.4±0.1 (S)
35PVB	<i>C. jejuni</i>	1.40 X 10 <sup>5</sup>	5.5 ±0.4 (S)	4.0±0.1 (S)	4.8±0.2 (S)	1±0.14 (R)	4.1±0.1 (S)	5.5±0.72 (S)	4.7±0.6 (S)
61PVT	<i>C. coli</i>	2.28 X 10 <sup>5</sup>	NI (R)	NI (R)	NI (R)	1±0 (R)	4.1±0.1 (S)	NI (R)	1.88±0.2 (S)
67PVB	<i>C. coli</i>	3.60 X 10 <sup>5</sup>	4.9 ±0.4 (S)	NI (R)	4.8±0.3 (S)	NI (R)	4.7±0.4 (S)	NI (R)	3.63±0.1 (S)
68PVB	<i>C. coli</i>	8.93 X 10 <sup>4</sup>	5.1± 0.5 (S)	NI (R)	3.9±0.4 (S)	NI (R)	3.8±0.4 (S)	NI (R)	3.78±0.4 (S)
01pfF	<i>C. coli</i>	2.30 X 10 <sup>5</sup>	4.7± 0.2 (S)	NI (R)	3.7±0.1 (S)	NI (R)	3.6±0.1 (S)	NI (R)	3.33±0.1 (S)
04pfB	<i>C. coli</i>	6.75 X 10 <sup>4</sup>	5.7± 0.1 (S)	NI (R)	4.0±0.2 (S)	1±0.23 (R)	4.0±0.1 (S)	NI (R)	1.2±0.08 (R)
07pfB	<i>C. coli</i>	2.95 X 10 <sup>5</sup>	5.3± 0.3 (S)	NI (R)	4.0±0.5 (S)	1±0.05 (R)	3.9±0.5 (S)	NI (R)	1.18±0.2 (R)
12pfB	<i>C. coli</i>	4.60 X 10 <sup>5</sup>	NI (R)	NI (R)	NI (R)	1±0 (R)	NI (R)	1±0 (R)	4.13±0.2 (S)
17pfB	<i>C. coli</i>	2.88 X 10 <sup>5</sup>	5.0 ±0.1 (S)	NI (R)	4.1±0.4 (S)	1±0.12 (R)	3.5±0.1 (S)	0.9±0.14 (R)	2.93±0.2 (S)

NI: no inhibición; (R) resistente; (S) sensible.

Con respecto a la sensibilidad de las cepas analizadas, se determinó que el 56% (13) de los aislados fueron resistentes ya sea al ácido nalidíxico o a la tetraciclina. El 52% de las cepas fue resistente a la ciprofloxacina en tanto que la menor resistencia (4.3%) se obtuvo frente a la ampicilina y la gentamicina, con lo cual el patrón de resistencia de los aislados fue:

Ácido nalidíxico = tetraciclina > ciprofloxacina > azitromicina = eritromicina > gentamicina = ampicilina (Fig. 8)

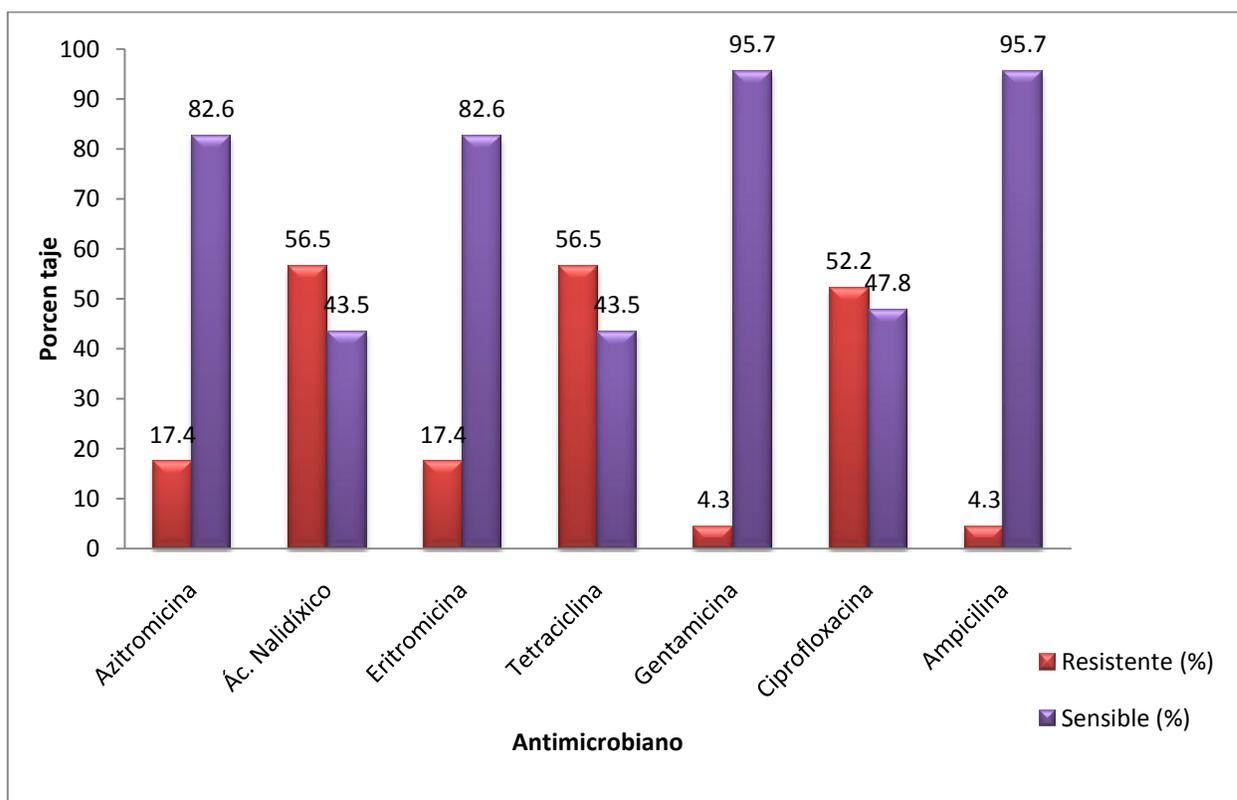


Fig. 8. Patrón de resistencia y sensibilidad de los aislados probados contra los antimicrobianos.

En cuanto a las cepas multirresistentes encontramos que 2 (9%) de los aislados fue resistente a dos antimicrobianos, 6 (26%) presentaron resistencia a 3 antimicrobianos, 3 aislados fueron resistentes a 5 antimicrobianos y solo 1 aislado (4%) fue resistente a 4 antimicrobianos siendo este de mayor importancia. Ninguno de los aislados fue resistente a todos los antimicrobianos probados (Tabla 19).

Tabla 19. Perfil de resistencia a uno o más antimicrobianos de los aislados de *Campylobacter*.

<b>CANTIDAD DE ANTIMICROBIANOS</b>	<b>SENSIBLE No AISLADOS (%)</b>	<b>RESISTENTE No AISLADOS(%)</b>	<b>No AISLADOS</b>
<b>0</b>	16(70)	7(30)	23
<b>1</b>	19 (83)	4 (17)	23
<b>2</b>	21(87)	2 (9)	23
<b>3</b>	17 (78)	6(26)	23
<b>4</b>	23 (100)	0(0)	23
<b>5</b>	20 (87)	3(13)	23
<b>6</b>	22 (96)	1(4)	23
<b>7</b>	23 (100)	0(0)	23

Sin embargo, encontramos que la cepa 12pfB de *C. coli* fue la más resistente a la mayoría de los antimicrobianos analizados (6 de los 7 probados) la cual provenía de carne de pollo cruda adquirida en un mercado, del periodo de septiembre de 2008. Las cepas sensibles a todos los antimicrobianos fueron las dos cepas usadas como control (*C. coli* 19, *C. jejuni* NADC 5653), los aislados de pollo pertenecientes a *C. coli* (062F, 074F, 066F), un aislado confirmado como *C. jejuni* (060B) y una cepa aislada de salchicha inoculada (M424).

## VIII. DISCUSIÓN

Para diseñar un medio de cultivo que se pudiera incubar bajo condiciones aeróbicas y a la par acoplarlo a una reacción de biología molecular como la PCR se realizaron un total de seis formulaciones diferentes basadas en los medios previamente reportados para el desarrollo de *Campylobacter*, a los que se hicieron modificaciones tales como inclusión de 0.15% de agar bacteriológico, inclusión o no de carbón activado, incubación en aerobiosis o 10% CO<sub>2</sub>.

De todas ellas, solo una arrojó los mejores resultados en la recuperación de *C. jejuni* y *C. coli* en condiciones aeróbicas por lo que se decidió trabajar con ésta para los demás ensayos de este proyecto.

Los medios de enriquecimiento primarios para los microorganismos no deben ser excesivamente inhibitorios, sin embargo, para las etapas de aislamiento sí permite un cierto grado de inhibición. Los medios usados para el aislamiento de *Campylobacter* spp utilizan un rango amplio de antibióticos para su efecto selectivo ya que, además, es necesario su uso para controlar a los microorganismos competidores en ambientes muy contaminados como en muestras de heces.

Entre los medios más comúnmente utilizados para el enriquecimiento de *Campylobacter* spp, podemos mencionar a los formulados por Skirrow, Tran, Butzler *et al.*, Blazer *et al.*, y Bolton y Robertson. En la actualidad no existe un único medio que sea enteramente satisfactorio para el aislamiento de este microorganismo, por lo que a parte de los medios de aislamiento también se han desarrollado de pre-enriquecimiento lo que ha permitido alcanzar una proporción alta de recuperación del microorganismo (Karmali *et al.*, 1986).

El aislamiento tradicional de especies de *Campylobacter* requiere caldos de enriquecimiento, siembra en agar selectivo y una incubación en atmósfera microaerófila, además, para el caso de las especies termotolerantes (como *C. jejuni* y *C. coli*) una temperatura de incubación de 42°C. Ello conlleva a identificar las especies de *Campylobacter* en al menos 5 días, por lo que se hace evidente la necesidad de desarrollar un método rápido para la detección y/o identificación de estos microorganismos.

Teniendo como base el antecedente de que para el caso del aislamiento de *Campylobacter* a partir de alimentos, numerosos medios selectivos conteniendo una amplia variedad de antibióticos y otros suplementos se han desarrollado a lo largo del tiempo y algunos se encuentran disponibles, utilizamos como base el medio libre de sangre (BFEB) formulado por Tran en 1998 llamándolo M-BFEB (BFEB modificado), al cual le eliminamos el carbón activado presente en el BFEB ya que se ha reportado que este compuesto inhibe la PCR.

El medio Preston y Bolton a los cuales se les ha incorporado sangre o requieren incubación en condiciones microaeróbicas son ampliamente utilizados (Baylis *et al.*, 2000; Fravalo *et al.*, 2009; Moran *et al.*, 2009.; Tangvatcharin *et al.*, 2005). El caldo Bolton es recomendado por la FDA, la Organización de Estándares Internacionales (ISO por sus siglas en inglés) y el Comité Nórdico de Análisis de Alimentos, mientras que el medio Preston se recomienda en Australia (Kim *et al.*, 2009).

Nosotros comparamos el medio Preston, Bolton, BFEB y M-BFEB para el aislamiento tradicional de diversas cepas de *Campylobacter* (7 de *C. jejuni* y 5 de *C. coli*) en cultivo puro. Nuestros resultados indicaron que el medio más sensible fue el Bolton seguido ya sea por el BFEB o M-BFEB mientras que el caldo Preston fue el menos sensible para la recuperación de diversos niveles de inóculo de *C. jejuni* y *C. coli*. Estos resultados concuerdan con Josefsen *et al* (2004) quienes reportaron que usando el medio Preston no hubo una recuperación efectiva de cepas de *C. coli*, así como Ng *et al* (1985) quienes reportaron que algunas cepas de *C. coli* fueron inhibidas por la combinación de antibióticos usados en el medio.

Originalmente, Bolton y Robertson desarrollaron el medio Preston para aislar *Campylobacter* spp a partir de muestras ambientales en las que estos microorganismos pudieran ser superados por los microorganismos competidores. La precisión de este medio para el aislamiento de *Campylobacter* en las heces, el agua y de otros ecosistemas se ha comprobado, sin embargo, acorde con nuestros resultados, se han descrito los posibles problemas para el aislamiento de ciertas cepas de *C. coli* sensibles a polimixina B, un antibiótico presente en dicho medio.

Aunque Bolton *et al* en 1982, desarrollaron un método basado en el número más probable usando el enriquecimiento en caldo Preston siendo capaz de detectar concentraciones tan bajas como 10 UFC/100ml de *Campylobacter* en agua, en el año 2000 y 2009 Baylis *et al* y Kim *et al* respectivamente, usaron el caldo Preston para la recuperación de *Campylobacter* y lo encontraron menos sensible que el caldo Bolton para la detección de *Campylobacter* ya sea en aves, alimentos (Baylis *et al.*, 2000) y muestras de carne de cerdo (Kim *et al.*, 2009).

Con respecto al uso de medios de cultivo para la recuperación de *Campylobacter* por el método convencional únicamente, en un estudio coordinado en Dinamarca (llevado a cabo por 14 laboratorios de países europeos) se evaluó un método estándar para la detección y enumeración de este patógeno en diferentes matrices alimenticias. Se realizaron análisis cualitativos, semicuantitativos y cuantitativos en muestras de carne de pollo, lechuga y leche inoculada artificialmente con diferentes concentraciones de *C. jejuni* y *C. coli*. El análisis mostró una sensibilidad de más de 25UFC/g lo que se consideró un método adecuado para la enumeración de estos patógenos en diferentes matrices, principalmente el pollo ya que para las muestras de leche se obtuvo una subestimación de las cuentas (Rosenquist *et al.*, 2007).

En nuestro caso, el medio BFEB y el M-BFEB fueron igualmente sensibles en la detección de diferentes niveles de *C. jejuni* y *C. coli*, ya que pudieron detectar <100 UFC/ml inoculados en el caldo. Sin embargo, el medio Bolton a pesar de que tuvo un límite

de detección mejor, tomando en cuenta todas las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* fue comparable que los medios BFEB y M-BFEB. En cuanto a las cepas individuales, el medio M-BFEB tuvo una mejor tasa de recuperación en ciertas especies (*C. jejuni* NADC 5653, 180ip, and 238ip) y globalmente la cepa que mostró diferencia con respecto a las demás fue la *C. coli* 19.

Los resultados por microbiología convencional arrojaron que para nuestro caso, a pesar de que a las 24h de incubación del medio selectivo (cefex-agar) las colonias eran pequeñas, aun se podían observar, sin embargo, a las 48 h los resultados fueron más consistentes.

Por otro lado, también llevamos a cabo la recuperación de *C. jejuni* y *C. coli* de cultivos puros mediante la técnica de PCR. Actualmente el uso de métodos de detección basados en la búsqueda de DNA tal como la PCR proporciona mayor sensibilidad ya que se pueden detectar aun pocas células de *Campylobacter*. De la misma manera, usando PCR las células que se encuentran en estado viable no cultivable puede detectarse e incluso a aquellos organismos no estén viables a la hora de la toma de muestra.

Con conocimiento de lo anterior, la PCR ha sido una herramienta altamente específica y sensible para la detección de ácidos nucleicos, sin embargo, puede ser afectada por los componentes de la matriz y las condiciones de reacción.

Aunque las tecnologías como la PCR han emergido como una herramienta simple para la identificación de patógenos, agentes secuestrantes de oxígeno tales como la hemina y el carbón activado incorporados a los caldos de enriquecimiento para *Campylobacter* tienen una aplicación limitada (Thunberg *et al.*, 2000). En nuestro estudio, el carbón activado fue excluido del medio BFEB y el resultante M-BFEB fue similarmente efectivo en el aislamiento del microorganismo por metodología tradicional y quizá marginalmente más efectivo en la detección por PCR de células de *C. jejuni* y *C. coli*.

Previamente se había reportado que el carbón activado y el fierro presentes en el medio BFEB inhibían la PCR. Diversos investigadores se han enfocado en el uso de diferentes métodos para la extracción de DNA incluyendo Percoll, lavado simple y calentamiento (Thunberg *et al.*, 2000), resina chelex-100 (Hong *et al.*, 2007) o purificación de DNA usando Instagene, perlas magnéticas (Katzav *et al.*, 2008) y NucleoSpin (Mayr *et al.*, 2010). Se ha reportado que el lavado y un simple calentamiento en la preparación del templado disminuyen la interferencia del medio de cultivo (Thunberg *et al.*, 2000) por lo que los métodos de calentamiento se usan aun directamente del medio de cultivo sin causar interferencias con los resultados (Mayr *et al.*, 2010).

Para reducir la presencia de factores inhibidores en la muestra, en nuestro estudio, las células bacterianas se lavaron dos veces antes de la extracción del DNA. Así mismo se realizaron ensayos donde se utilizó un kit para la purificación del DNA (Instagene<sup>TM</sup> Matrix, Biorad) sin embargo, los resultados fueron similares a la metodología de extracción previamente descrita basada en calentamiento, por lo que se decidió continuar así, ya que era mucho más económica.

Tomando en cuenta que *Campylobacter* posee una dosis infectiva muy baja, el tamaño de muestra debe ser grande, esto hace que el aislamiento de DNA bacteriano sea difícil y laborioso. Para aumentar la sensibilidad de los sistemas de detección basados en PCR, una combinación de cultivo de enriquecimiento con PCR es recomendable (Giesendorf *et al.*, 1992). Se ha establecido que esta estrategia, además mejora la proporción de células viables no cultivables reduciendo la probabilidad de falsos positivos debido a la amplificación de DNA de células muertas (Rossen *et al.*, 1992).

La sensibilidad y el límite de detección de los métodos basados en PCR pueden ser afectados por diversos factores incluyendo la presencia de sustancias inhibitorias y la calidad del DNA (Wilson, 1997). Diluciones del medio de enriquecimiento previo a la centrifugación y lisis celular se han sugerido para las muestras con alto nivel de flora acompañante una vez que los niveles de DNA de ésta podrían interferir con el ensayo (Waage *et al.*, 1999). Las sustancias inhibitorias pueden originarse de la matriz del alimento

y pueden influir negativamente en la sensibilidad de la técnica, entre estos factores inhibitorios se incluyen agentes químicos orgánicos e inorgánicos, detergentes, antibióticos, amortiguadores, enzimas, polisacáridos, grasas y proteínas (Wilson, 1997).

Con respecto a los compuestos inhibitorios presentes directamente en el medio de cultivo, por ejemplo, la sangre o la hemina, que se usan como componentes de los medios de enriquecimiento de *Campylobacter* spp, se ha reportado que actúan neutralizando los productos tóxicos del oxígeno (Griffiths and Park 1990) y dado que estas sustancias son inhibidoras de PCR podrían ser co-extraídas del medio de enriquecimiento, para ello, algunas estrategias como el lavado de las células y la dilución del medio de enriquecimiento se han utilizado para disminuir la interferencia de estos compuestos en el ensayo (Waage *et al.*, 1999).

En cuanto al tiempo de incubación del pre-enriquecimiento, en nuestros ensayos, el enriquecimiento por 24 o 48 h dio resultados similares por PCR, mientras que la incubación de 24h mostró resultados inconsistentes tanto por el método convencional como por la PCR (Thunberg *et al.*, 2000). Estos resultados concuerdan con Thunberg *et al.*, en el 2000 donde reportaron que el cultivo de *C. jejuni* por 48h en medio BFEB solo incrementó la sensibilidad del ensayo de PCR en cultivos incubados durante 24h en BFEB y 48h en leche, champiñones, carne de cangrejo y ostras respectivamente. Sin embargo, no hubo diferencias entre los cultivos de 24 y 48h en medio BFEB.

Asimismo, Hunt y Tran en 1997 observaron que un período de 48h de enriquecimiento en caldo de Hunt era necesario para obtener resultados comparables entre un método de aislamiento en agar selectivo y PCR. De igual manera By y Price (1984) encontraron que usando el medio de enriquecimiento Preston para el aislamiento de *Campylobacter* a partir de muestras de agua, la máxima tasa de recuperación se dio a las 48h.

Recientemente Moran *et al* en 2009, probaron la recuperación de *Campylobacter* de productos de pollo ya empacados basándose en la metodología de ISO 10272-1:2006.

Conforme al tiempo de incubación, se encontró que no hubo diferencia significativa en la recuperación de estos microorganismos ya sea a 24 o 48h de enriquecimiento (Moran *et al.*, 2009).

Aunque la incubación por 48h en medio de enriquecimiento facilita la recuperación de células dañadas o estresadas (Thunberg *et al.*, 2000; Jeffrey *et al.*, 2000), en nuestro estudio, la PCR podría completarse después de 24h de incubación en el medio M-BFEB.

Indicadores fecales se han seleccionado debido a su capacidad de ser fácilmente detectados y usados como marcadores de patógenos zoonóticos presentes en el procesamiento o que provienen del animal. El indicador fecal ideal debería ser una especie simple y tener la misma tasa de multiplicación que los patógenos y debería estar presente en heces en altos números. Un indicador ideal no debe ser patógeno, y debe ser fácil, rápida y económicamente detectable y su presencia debe correlacionarse con la presencia de patógenos entéricos. Esta última condición es difícil de alcanzar cuando la prevalencia y distribución de los patógenos en la fuente animal es baja (Ghafir *et al.*, 2008). Es por ello que nosotros decidimos evaluar la recuperación de *Campylobacter* en los diferentes caldos de enriquecimiento utilizados, frente a *E. coli* como flora competidora.

Se han reportado dificultades en la detección de *Campylobacter* cuando flora competidora está presente (Jasson *et al.*, 2009). En nuestro estudio inicialmente se pretendía trabajar con una cepa de *E. coli* no patogénica (ATCC 25922), sin embargo, acorde a lo reportado en la literatura (Oxoid, 2006), esta cepa fue incapaz de desarrollarse en el caldo Bolton, razón por la cual y tomando en cuenta que una cepa patógena de *E. coli* pudiera estar presente en el alimento aun en bajas cuentas, realizamos los ensayos utilizando una cepa enterohemorrágica (ATCC 43894).

Con ello, *E. coli* se desarrolló bien en medio Bolton, BFEB y M-BFEB no así en medio Preston, lo cual ya se había reportado (Jasson *et al.*, 2009). En nuestros ensayos con medio M-BFEB, *C. coli* (inoculada a 10 UFC/ml) y *C. jejuni* (inoculada a 10 UFC/ml) se recuperaron aun en presencia de altos niveles de *E. coli*. Esto ocurrió tanto en ensayos de

inoculación 1:1, es decir, 10 UFC/ml de *C. jejuni* o *C. coli* y 10 UFC/ml de *E. coli*, así como en proporciones diferentes, 1:9 por ejemplo. Al observar las colonias que crecieron en agar Brucella, fue sencillo reconocer las colonias de *E. coli*, *C. jejuni* y *C. coli* ya que las primeras eran grandes, tipo rizoide de color verdoso en tanto que las segundas eran pequeñas y grisáceas.

Jefrey *et al* en el 2000 determinaron el límite de detección de *C. jejuni* cuando era crecido en un medio semisólido junto con células de *E. coli* y posteriormente pasado a agar Campy-FDA. Se demostró que *C. jejuni* pudo recuperarse desde 1 UFC/ml después de una incubación aeróbica (Jefrey *et al.*, 2000).

Acorde a los ensayos de co-cultivos con otras bacterias, recientemente se publicó un artículo (Hilbert *et al.*, 2010), donde al cultivar a *C. jejuni* en condiciones aeróbicas con *Pseudomonas* spp (principal bacteria deteriorante en pollo) y otros microorganismos como *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Micrococcus luteus* y *Enterococcus faecalis*, encontraron que la incubación con células de *P. mirabilis*, *C. freundii*, *M. luteus* o *E. faecalis* provocaba que *Campylobacter* pudiera sobrevivir en aerobiosis por no más de 18h. En contraste con ello, cuando *Campylobacter* se cultivó con *Pseudomonas* se mostró que pudo sobrevivir por más de 48h en aerobiosis (Hilbert *et al.*, 2010).

Al determinar el límite de detección de *Campylobacter* inoculada en carne de cerdo, utilizando los cuatro caldos de enriquecimiento seguido de siembra en agares selectivos (método convencional), encontramos que el que mejor nivel de detección tuvo fue el caldo Bolton y el M-BFEB ya que pudieron detectar desde 1 UFC/ml, seguido del BFEB (10 UFC/ml) y el que requirió un inóculo mayor para ser recuperado fue el caldo Preston (100 UFC/ml).

Con respecto a la inoculación en piel de pollo y la determinación del límite de detección de los medios de enriquecimiento seguido del método convencional, o por PCR, se inoculó una mezcla de *C. jejuni* NADC 5653 y *C. coli* 19 en muestras de piel de pollo en diferentes concentraciones (desde 10 hasta  $1 \times 10^6$  UFC/ml) de cada cepa. A partir de los

caldos de enriquecimiento se sembraron en agar Campy-Cefex y se extrajo DNA para la técnica de PCR.

Cuando después del enriquecimiento sembramos en agar Campy-Cefex se logró la recuperación de *Campylobacter* spp desde la más baja concentración (10 UFC/ml) en los cuatro medios de enriquecimiento probados. En tanto que por PCR, cuando el enriquecimiento fue en el medio Preston, *C. jejuni* se detectó en el 100% de los casos cuando se encontraba a concentraciones  $\geq 10^3$  UFC/ml y para *C. coli* a partir de  $10^4$  UFC/ml. Cuando el enriquecimiento fue el caldo Bolton, se detectó a *C. jejuni* desde 10 UFC/ml de inóculo, sin embargo para *C. coli* los resultados fueron muy inconstantes detectándose solo en el 100% de los casos cuando se inoculó  $10^4$  UFC/ml en la piel de pollo. Para el caso del enriquecimiento en el medio BFEB, *C. jejuni* fue detectada en el 100% de los casos cuando la inoculación fue de  $10^6$  UFC/ml, sin embargo, *C. coli* pudo detectarse desde un nivel de inóculo tan bajo como 10 UFC/ml. Finalmente el que mejores resultados arrojó fue nuestro medio de enriquecimiento M-BFEB ya que éste permitió la detección de ambas cepas desde el inóculo más bajo probado (10 UFC/ml) en el 100% de los casos. Estadísticamente hablando, el medio M-BFEB fue diferente en comparación a los otros tres ya que fue el que mejores resultados arrojó para su uso directo por PCR.

Es bien sabido que microorganismos patógenos como *Campylobacter* spp, prácticamente nunca se encuentran en alimentos de forma pura, es decir, siempre se acompaña de flora nativa, la cual normalmente es muy abundante. Es por ello que su aislamiento a partir de muestras de medio ambiente requiere que la flora competidora sea suprimida para lo cual generalmente se utilizan medios de enriquecimiento que poseen, para el caso de este microorganismo, al menos cinco antibióticos.

Es común que *Campylobacter* spp como otras bacterias Gram negativas, experimente un daño fisiológico como consecuencia a la exposición a un medio ambiente hostil (común en la producción de alimentos). Esto a menudo es llamado daño o estrés subletal cuya principal manifestación es la poca o nula capacidad para crecer en medios selectivos. Se ha reportado que en ocasiones esto es debido a daño en membrana externa que permite el

ingreso de antibióticos tales como rifampicina. Se ha visto que el estrés en células dañadas a menudo actuará en tándem o cascada (Humprey, 2002), es decir, las células no dañadas de *Campylobacter* suelen ser extremadamente sensibles a rifampicina, sobre todo en presencia de otras condiciones desfavorables como niveles bajos de peróxido por lo que los efectos en la población dañada son aún más extremos.

Lo anterior resulta de suma importancia ya que compuestos como el peróxido se acumulan en el medio de cultivo durante su mantenimiento, antes de su uso aún cuando los agares o caldos se encuentren en refrigeración y en oscuridad (Humprey, 2002). Es por eso que se recomienda que los medios de cultivo para bacterias fastidiosas como *Campylobacter* no tengan más de una semana de preparados antes de su uso y que se mantengan en oscuridad, además de que se recomienda que contengan sangre y/o agentes secuestrantes del peróxido u otros compuestos potencialmente peligrosos. Se sabe que antibióticos como cefoperazona, trimetoprim y anfotericina son muy bien tolerados por células dañadas de *Campylobacter* (Humprey, 2002).

La selección adecuada de los caldos de enriquecimiento es importante para el enriquecimiento rápido y eficaz de *C. jejuni*. Thunberg *et al* en el 2000 concluyeron que el caldo Hunt y el Bolton resultaron ser más eficaces para el enriquecimiento de suspensiones celulares y carne de cerdo inoculada (Thunberg *et al.*, 2000). Previamente se había reportado por Oosterom *et al* (1981) la recuperación de 100 a 1,000 células/g de *C. jejuni* en carne picada contaminada artificialmente mediante el uso de un medio de enriquecimiento compuesto de caldo de tioglicolato, sangre lisada (7%), vancomicina (40, µg/ml), trimetoprim (30 µg/ml), polimixina B (10 UI/ml) y (100 µg/ml) cicloheximida y se incubaba a 37°C durante 24 h en una atmósfera de microaerofilia. Añadiendo 1.5% de bilis de buey al caldo de enriquecimiento mejoró la sensibilidad del medio, permitiendo la recuperación de 3 a 10 células de *C. jejuni* por g de carne.

Aunque se ha demostrado que el DNA puede extraerse directamente de muestras o del medio de enriquecimiento para incrementar la sensibilidad de la PCR (Suzuki and Yamamoto 2009), Katzav *et al* 2008 reportaron un límite de detección de 700 UFC/ml en

muestra de agua de lavado de pollo. Sin embargo, con el tratamiento de pre-enriquecimiento se incrementó la sensibilidad a 1 UFC/ml. La detección de *Campylobacter* spp en muestras fecales de bovino según Inglis y Kalischuk (2003) fue a partir de  $10^2$ - $10^3$  UFC/g. Sails *et al* (2003) realizaron cultivos de enriquecimiento antes de la enumeración de esta bacteria por PCR tiempo real a partir muestras de alimento contaminadas con *C. jejuni* y se determinó un límite de detección de 12 UFC/25µl de mezcla de reacción.

La disminución en la sensibilidad observada en las matrices y el BFEB puede ser resultado de adhesión bacteriana a las partículas de alimento que reduce el número de células en el sobrenadante después de la centrifugación. En los ensayos de inoculación en piel de pollo, el carbón activado (incluido en el medio BFEB) pudo haber causado la variabilidad en la detección de *C. jejuni* por PCR, lo cual ya se había observado (Thunberg *et al.*, 2000). El uso del medio libre de carbón (M-BFEB) es efectivo, reproducible y apropiado para la detección de bajos niveles bacterianos mediante PCR (<100 UFC/ml inoculados) lo que evita la siembra en medios selectivos y la incubación microaerófila, así como el tiempo para la identificación mediante microbiología convencional.

Por consiguiente y tomando en cuenta los resultados anteriores, la comparación de los caldos de enriquecimiento debe llevarse a cabo en muestras contaminadas naturalmente, por lo cual, realizamos un análisis epidemiológico en muestras de pollo y cerdo en punto de venta que se expende en diversos municipios del área metropolitana de Nuevo León.

En el caso de la búsqueda de *C. jejuni* y *C. coli* en muestras de pollo crudo, se analizaron un total de 204 muestras en estaciones climáticas diferentes, donde las correspondientes a épocas de verano fueron: 24 del verano del 2007 (agosto-septiembre) y 85 del verano del 2008 (junio-julio y septiembre). En cuanto a la época de invierno, 95 fueron en el 2006-2007 (octubre 2006-febrero 2007).

Cuando seguimos el método tradicional (enriquecimiento en los cuatro medios y siembra en agar Campy-Cefex e incubación microaerófila), de las 204 muestras analizadas se aislaron usando todos los caldos de enriquecimiento 20 (9.8%) muestras

positivas, de las cuales 6 correspondieron a *C. jejuni*, representando esto el 30% de los 20 aislados y el 2.9% de las muestras originales. Para el caso de *C. coli* se logró su detección en 14 muestras, siendo esto el 70% de los 20 aislados y el 6.86% del total de muestras analizadas.

Encontramos que el caldo Bolton fue el que más número de muestras positivas (14) permitió detectar siendo 9 identificadas como *C. coli* y 5 como *C. jejuni*. Posteriormente, a partir del caldo M-BFEB se pudo detectar a *Campylobacter* en 5 muestras, de las cuales, en 4 se identificó a *C. coli* y solo en una a *C. jejuni*. El medio BFEB fue el que menor número de aislados permitió ya que solo se recuperó una cepa de *C. coli*.

En el presente estudio, el caldo Bolton, el cual está suplementado con sangre lisada, fue el que permitió la detección de este microorganismo en un mayor número de muestras, lo cual concuerda con muchos estudios, entre los que se encuentran el de Wonglumsom *et al* en 2001, quienes suplementaron con 7% de sangre lisada al caldo Hunt-Oxirasa, lo cual fue más efectivo que adicionar 2.5% de carbón o 6% de carne cocida al medio (estos dos últimos no tuvieron diferencias significativas). En el caso de la piel de pollo, el caldo de enriquecimiento Hunt suplementado con oxirasa y sangre lisada fue mejor para el crecimiento de *Campylobacter* que con otros suplementos cuando el medio se incubó en atmósfera normal (Wonglumsom *et al.*, 2001).

Nuestros datos epidemiológicos en carne de pollo cruda indican que solo el 9.8% de las muestras fueron positivas para *C. jejuni* y *C. coli* predominando los aislados de *C. coli*. Esto difiere de los demás estudios epidemiológicos realizados a nivel mundial, ya que en la mayoría de los ensayos se logra un aislamiento de *C. jejuni* en el 70-80% de las muestras y *C. coli* solo el restante.

Diversos estudios han reportado una alta tasa de incidencia de *C. jejuni*, por ejemplo en Nueva Zelanda el 56.6% de las muestras de pollo fueron positivas (Hudson *et al.*, 1999). O en el caso de los estudios realizados en Canadá donde en 1981 la tasa de aislamientos de *Campylobacter* spp fue de 62% en muestras de pollo fresco vendidas en supermercado

(Park *et al.*, 1981) y más recientemente (2006) en Alberta, Canadá donde este microorganismo se detectó en el 62% de piernas de pollo en punto de venta (Bohaychuk *et al.*, 2006).

Así mismo, *Campylobacter* spp también se aisló de la carne de pollo en punto de venta en el 40 y 70% de muestras analizadas en Tailandia y Kenia respectivamente (Rasrinaul *et al.*, 1988; Osano and Arimi, 1999). En Italia, Pezzoti *et al* en el 2003 y Parisi *et al* en 2007 reportaron la presencia de *Campylobacter* en el 81.3 y 73% de las muestras de carne de pollo crudo respectivamente.

Nuestros datos muestran una baja incidencia (9.8%) de *C. jejuni* y *C. coli* en las muestras de carne de pollo analizadas, lo cual concuerda con diversos reportes de los últimos años. Tal es el caso del estudio realizado por Denis *et al.*, quienes determinaron una tasa de incidencia del 17.5% de *Campylobacter* de muestras de pollo obtenidas de supermercado en Francia en el 2001, del mismo modo que Medeiros *et al* en el 2008 donde lograron aislar a *C. jejuni* en el 9.7% de las muestras.

Esta baja prevalencia quizá se relacione con cambios en el proceso de sacrificio del pollo, ya que Stern *et al* en el 2001, reportaron una prevalencia de 21 a 40.9% de *Campylobacter* spp en pollos crudos provenientes de plantas procesadoras de EE UU cuando se usó agua clorada para su refrigeración, a diferencia del 80 a 90% de prevalencia cuando no se utilizó este tratamiento (Stern and Line, 1992). Estos datos sugirieron que *Campylobacter* spp estaba presente en cuentas muy bajas, aun menores que el límite de detección del método, o bien, que se encontraba en una forma que no pudo ser detectada, tal como el estado viable no cultivable (VBNC). Tomando en cuenta que la mayoría de las muestras colectadas por nosotros se encontraban en congelación, esto pudo influir en la baja incidencia. Aunque *C. jejuni* no sobrevive por periodos prolongados en los alimentos debido a la sensibilidad a la desecación, temperatura, concentración de oxígeno en el ambiente y el calor, la exposición a estas condiciones desfavorables puede provocar que la bacteria entre en estado VBNC, lo que pudiera explicar el fracaso de las técnicas de cultivo convencionales para recuperar los organismos, al menos cuando se ha analizado agua

contaminada implicada en brotes (Rollins and Colwell, 1986; Jones *et al.*, 1991), sin embargo Rollins y Colwell (1986) han reportado que la carencia de culturabilidad de *Campylobacter* en agar no necesariamente sea un indicador de que el microorganismos entró a un estado VBNC (Rollins and Colwell 1986; Stern *et al.*, 2001).

Más aún, un estudio realizado por Meldrum *et al* en el 2003 determinó que no hubo diferencias en las tasas de recuperación de *Campylobacter* entre muestras frescas y congeladas de pollo crudo en punto de venta, siendo la prevalencia de este patógeno de 73.1% (Meldrum *et al.*, 2003).

Aunado a lo anterior, la detección y cuantificación de *Campylobacter* en cualquier tipo de carne están limitadas por la capacidad de recuperar las bacterias de la superficie del producto ya que esto último está vinculado a la naturaleza de la matriz de la carne (estructura compleja con el músculo y tejido adiposo) y su flora bacteriana endógena. Estudios sobre la supervivencia de *Campylobacter* en cárnicos han puesto de manifiesto el efecto protector de la misma (Lee *et al.*, 1998; Solow *et al.*, 2003). Por ejemplo, *Campylobacter* en la piel de pollo se encuentra en las grietas y en consecuencia se recupera con dificultad (Lee *et al.*, 1998; Solow *et al.*, 2003). El éxito en la recuperación de estos microorganismos depende del método utilizado para separar las bacterias de la matriz y obtener una suspensión bacteriana.

De entre los principales factores que afectan la adherencia y sobrevivencia de *Campylobacter* se encuentran: i) estructura física de la carne (ej. grietas) (Lee *et al.*, 1998) y las características químicas (pH ácido en músculo y de neutral a básico en la piel de pollo, actividad acuosa y disponibilidad de nutrientes), ii) flora endógena que puede competir con *Campylobacter* e iii) interacción entre la matriz de la carne y la cepa de *Campylobacter* (Lee *et al.*, 1998; Solow *et al.*, 2003).

Scherer *et al* en el 2006 determinaron la prevalencia de *Campylobacter* presente en piel y músculo de piernas de pollo crudas obtenidas en punto de venta, a fin de comparar la contaminación externa e interna del producto. De las 140 muestras de piel examinadas, el

66% fueron positivas y la contaminación interna fue de solo el 27%. En cuanto a la enumeración de este patógeno en la superficie de la piel, se encontró una media de 2.4 log UFC/g de piel, en tanto que en el músculo proporcionó resultados por debajo del límite de detección del método NMP (<0.3 NMP/g). Se encontró que en muestras de piel y músculo, *C. jejuni* tuvo mayor incidencia que *C. coli*, sin embargo, *C. coli* fue el que más altas cuentas reportó en la piel de pollo (Scherer *et al.*, 2006).

Empleando la metodología de PCR directamente a partir del caldo de enriquecimiento, para determinar la prevalencia de *Campylobacter* en las muestras de pollo naturalmente contaminadas, los resultados obtenidos fueron muy diferentes a aquellos obtenidos siguiendo la metodología tradicional. De las 204 muestras analizadas, y enriquecidas en todos los caldos se obtuvieron 85 muestras positivas para *C. jejuni* y/o *C. coli* representando esto el 41.6% (*C. jejuni* 33.8 y 7.84% *C. coli*). Observamos que el medio Bolton permitió un mayor número de muestras positivas (33). En este caso se detectaron más cepas como *C. jejuni* que como *C. coli*. Sin embargo, este número fue mayor al obtenido cuando seguimos el cultivo tradicional después del enriquecimiento. Esto fue debido quizá a que la célula pudo encontrarse en estado VBNC como previamente se había reportado, o bien a la baja cantidad de células presentes en la muestra, menor al límite de detección de la siembra en placa convencional.

Con respecto al análisis de los alimentos naturalmente contaminados por enriquecimiento y la técnica de PCR, la baja concentración de *Campylobacter* presente en estos alimentos y la alta concentración de flora acompañante resultó ser un gran problema, por ello la matriz del alimento resultó ser muy importante. Se ha reportado que la detección de *Campylobacter* spp en algunos alimentos es limitada debido a la baja recuperación del patógeno de la superficie de la carne, aunado a la naturaleza de la matriz. Katzav *et al* en el 2008 realizaron un estudio para la determinación del mejor método para lograr una buena extracción del DNA a partir de marinado de pollo, en donde se sugirió realizar un paso de pre-centrifugación para excluir la mayoría de los lípidos y la grasa del marinado de pollo y la piel. Sin embargo, un punto a considerar es que *Campylobacter* puede localizarse preferiblemente en la parte de la grasa de la muestra y ésta generalmente se remueve antes

del aislamiento del DNA y muchas bacterias pueden perderse. Además, la grasa y/o proteína aun presentes en la muestra después del pre-tratamiento pudieran interferir con el aislamiento del DNA (Katzav *et al.*, 2008).

La capacidad de las células de *C. jejuni* para entrar a un estado viable no cultivable explica la diferencia significativa entre la siembra en agar y la PCR. Las células de *C. jejuni* pueden transformarse a una morfología cocoide (VBNC) durante un estado de estrés (Park, 2002; Rollins and Colwell 1986). Sin embargo hay un debate en saber si *C. jejuni* en este estado puede resucitar para entrar a un animal huésped (Jones *et al.*, 1991; Murphy *et al.*, 2006; Pearson *et al.*, 1993.) o si las células VBNC no se recuperan (Hazeleger *et al.*, 1998; Medema *et al.*, 1992; Ziprin and Harvey 2004). La capacidad de *C. jejuni* de volverse infectiva después de VBNC parece ser específica de especie y huésped (Jones *et al.*, 1991; Medema *et al.*, 1992; van de Giessen *et al.*, 1996), por lo tanto, su presencia en muestras de medioambiente debe considerarse potencialmente infectiva y deben ser consideradas en los métodos de detección.

Grigoriadis, *et al* en 1997 analizaron 1200 muestras de carne molida y encontraron que ninguna fue positiva para *Campylobacter* por cultivo, sin embargo, usando la técnica de PCR directa para su detección, se obtuvo que el 46% de los empaques tuvieron o fueron positivos (Grigoriadis *et al.*, 1997).

En un estudio realizado por Sails *et al* en el 2003 se detectaron nueve muestras de mariscos y leche cruda que estaban contaminadas con *C. jejuni* cuando fueron analizadas por PCR tiempo real, sin embargo, ninguna fue positiva cuando la detección fue por siembra convencional. La técnica molecular detectó posibles estados VBNC, células muertas o dañadas y el sembrado selectivo sub-estimó concentraciones de *C. jejuni* comparado con PCR en tiempo real, por lo que esta técnica se recomienda para la detección y cuantificación de *C. jejuni* de muestras medioambientales (Sails *et al.*, 2003).

De igual manera, Devane *et al* en el 2005, reportaron que el análisis usando un método de enriquecimiento y luego siembra difirió de aquel en donde se hizo PCR directo

de la muestra. Ellos reportaron que con el primer método se pudieron aislar 616 cepas de *C. jejuni* provenientes de diferentes matrices (agua de río, agua de lavado de pollo, carne de res, cerdo e hígado de cabra, heces de animales y humanos) en tanto que con la PCR tiempo real se identificaron 637. Ellos concluyen que esto pudo deberse quizá a que se perdió viabilidad en algunos cultivos debido al retraso en la obtención de los resultados y a la siembra en agar. O quizá, es posible que la célula se encontrara en estado VBNC y esto fuera detectado por PCR y que por ende fueran incapaces de crecer en agar (Devane *et al.*, 2005). Una posible forma de asegurarse de la presencia de células de *Campylobacter* aun en estado VBNC es realizar cuentas viables directas con naranja de acridina en muestras positivas por PCR y negativas por cultivo convencional (Rollins and Colwell, 1986).

En todos nuestros ensayos para detección de *C. jejuni* y *C. coli* a partir de muestras de pollo y cerdo no se observó interferencia por componentes del medio de cultivo. Sin embargo, el medio M-BFEB fue más fácil de tratar para la extracción del DNA que los otros medios de enriquecimiento.

Aunque muchos investigadores han reportado estacionalidad en el aislamiento de *Campylobacter*, incluyendo Meldrum *et al* en el 2006, quienes determinaron que la tasa máxima de este patógeno se produjo en junio, mientras que en 2003 había dos picos (junio y diciembre) y en 2004 hubo un pico principal en agosto y una más pequeña en abril, en nuestro estudio no se observó dicha estacionalidad, siendo igualmente prevalente este microorganismo en invierno y en verano.

Considerando los riesgos potenciales en humanos, animales o medio ambiente para adquirir alguna enfermedad, el desarrollo y uso de un método seguro y rápido para identificar y/o cuantificar *C. jejuni* es requerido. Las técnicas más comunes para la detección de *Campylobacter* involucran determinación por medio del número más probable o cultivo posterior a un medio selectivo de enriquecimiento por varios días (Nogva *et al.*, 2000).

Es bien sabido que el pollo es un reservorio y un vehículo importante de especies de *Campylobacter*. La producción de carne de pollo en nuestro país, en 2008 fue de 2,581,540 toneladas, lo que representó un incremento del 1.54% respecto a la producción de 2007 y ha tenido un crecimiento promedio anual de 4.56% desde el año 2000, siendo los principales estados productores de pollo en canal Veracruz (287,813 toneladas) con 11.15% del total de producción nacional, seguido de Jalisco (266,042 toneladas), Durango (239,794 toneladas), Aguascalientes (217,619 toneladas), Querétaro (207,619 ton), Puebla (164,406 ton), Guanajuato (162,946 ton), Sinaloa (130,061 ton), Chiapas (126,171 ton), Yucatán (117,331 ton) y el resto de los estados suman una producción total de 661,712 toneladas (Monografía Pollo, 2009).

Desde el año 2004, México ha mantenido un crecimiento paulatino en su consumo de carne de pollo. El crecimiento promedio anual de éste para el período 2004–2008 fue de 3.73%. El consumo de pollo es principalmente abastecido por la producción nacional en un 86%, mientras que el resto (13.80%) por importaciones.

A nivel mundial, los principales productores de pollo son los Estados Unidos de América con una producción de 16 millones de toneladas (21.54%), seguido de China con 10.86 millones de toneladas (14.61%), Brasil con 8.67 millones de toneladas, México, quien ocupa el cuarto lugar, con 2.5 millones de toneladas y por último, la India con 2.2 millones de toneladas (Monografía Pollo, 2009).

Para el caso de la carne de cerdo, los efectos negativos de la crisis económica y de la influenza (A)H1/N1 propiciaron que las proyecciones de producción estimadas por la SAGARPA para 2008 y 2009 no hayan sido como se esperaba. Aunado a esto, el bajo índice de confianza del consumidor, la disminución en el poder adquisitivo, la dificultad para generar empleos, el aumento en los precios, el incremento en la producción de carne de pollo y de las importaciones, así como los cambios en los hábitos de consumo, han propiciado que la recuperación del sector porcino fuera lenta; sin embargo, analizando el comportamiento de la producción para los dos primeros meses del año 2010, se tuvo que ésta pasó de 91,153 ton en enero a 92,504 en febrero (Rodríguez y del Moral, 2010).

Cuando analizamos la prevalencia de *Campylobacter* spp en muestras de carne de cerdo crudo, cerdo cocido y pollo cocido no se logró aislar ninguna cepa de *C. jejuni* ni *C. coli*, debido quizá a una buena cocción del producto, lo que pudiera permitir la eliminación de este tipo de microorganismos ya que se ha reportado que la carne de pollo para eliminar a *Campylobacter* debe cocinarse a 77°C-82°C (temperatura interna del alimento) por 15 segundos, en tanto que para la carne de cerdo es de 71°C por 15s (Anónimo, 2001).

Al mismo tiempo se analizó la calidad microbiológica (presencia de microorganismos indicadores) de las muestras analizadas en este estudio. En el pollo crudo se encontró que en base a la cuenta de bacterias mesófilas aerobias el 46.8% de las muestras tenían valores  $>1 \times 10^5$  UFC/g, lo cual resulta un valor de relevancia, ya que aunque no hay límites máximos sanitarios en nuestra normativa este valor resulta ser extremadamente alto. El 1.19% de las muestras tenían valores  $>1 \times 10^5$  UFC/g en tanto que las cuentas de mohos y levaduras oscilaron entre 10 y  $1 \times 10^4$  UFC/g.

Los resultados del análisis de las muestras de alimento que contenían pollo cocido, (ensalada, pollo asado, rostizado, empanizado y frito), arrojaron que 10 muestras (5%) sobrepasaron los valores de 150 000 UFC/g, que hasta hace poco era considerado en nuestra normativa como no permisible para el consumo, la cuenta de mohos y levaduras tuvo como valor máximo 1000 UFC/g.

Del análisis de 150 muestras de diferentes cortes de carne de cerdo cruda, más del 95% presentaron valores  $< 10^4$  UFC/g de mesófilos aerobios totales y solo el 4.7% obtuvo cuentas elevadas ( $>10^5$  UFC/g). El 75% de las muestras contenían  $<10^3$  UFC/g de microorganismos coliformes totales, en tanto el 90% de las muestras presentaron  $<10^3$  UFC/g de microorganismos coliformes fecales.

Finalmente, el análisis de las 50 muestras de carne de cerdo cocido mostró que el 5% de éstas presentaba cuentas muy elevadas ( $>150,000$  UFC/g) de organismos mesófilos aerobios y para el caso de los coliformes totales y fecales la mayoría de las muestras (19.5 y

21% respectivamente) tuvieron cuentas menores a los 10UFC/g, sin embargo, hubo muestras que presentaron cuentas muy altas tanto de coliformes totales como fecales lo cual pudiera representar un riesgo para la salud del consumidor ya que es un alimento listo para comer. Todas las muestras presentaron valores menores a 1000 UFC/g de mohos y levaduras.

Por otro lado, a los aislados de *C. jejuni* y *C. coli* obtenidos de las muestras de alimentos, se les determinó su perfil de resistencia a antimicrobianos, para lo cual se probaron siete de ellos que generalmente se usan como tratamiento en las infecciones causadas por este patógeno.

Las pruebas de susceptibilidad de *Campylobacter* no están estandarizadas. Varios métodos se pueden encontrar en la literatura, tal como realizar la dilución del antimicrobiano y utilizar agar Mueller-Hinton suplementado con 5% de caballo o sangre de carnero, y seguido de una incubación de 16 a 18 horas en condiciones de microaerobiosis. Diferentes métodos de difusión (discos, pastillas, y tiras de E-test) se han utilizado y en algunos casos es equiparable con los resultados obtenidos por los métodos de dilución en tubo. Debido a la carencia de un método internacionalmente aceptado para este tipo de microorganismos se puede utilizar cualquiera. En nuestro estudio utilizamos la técnica de difusión en disco en agar mediante la técnica de Kirby-Bauer, y encontramos que el 56% de los aislados fueron resistentes ya sea al ácido nalidíxico o a la tetraciclina. El 52% de las cepas fue resistente a la ciprofloxacina en tanto que la menor resistencia (4.3%) se obtuvo frente a la ampicilina y la gentamicina. Con lo cual el patrón de resistencia de los aislados fue: ácido nalidíxico = tetraciclina > ciprofloxacina > azitromicina = eritromicina > gentamicina = ampicilina.

Según la literatura, las especies de *Campylobacter* son a menudo resistentes a la penicilina, ampicilina y cefalosporinas como resultados del alarmante incremento en la resistencia a fluoroquinolonas en las pasadas décadas en muchos países (Gupta *et al.*, 2004). Este incremento en la resistencia a fluoroquinolonas coincide con el uso de fluoroquinolonas (sarafloxacina y enrofloxacina) en producción avícola y en medicina

veterinaria en general. En el caso del ácido nalidíxico, éste forma parte de las quinolonas por lo que nuestros resultados concuerdan con los reportados. Se debe tomar en cuenta que la susceptibilidad al ácido nalidíxico se ha considerado una prueba importante para distinguir tradicionalmente entre especies de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari* quizá por esta razón fue el antimicrobiano al que mayor resistencia se presentó.

En nuestro ensayo encontramos también resistencia a ciprofloxacina (52.2%) por parte de las cepas, lo cual concuerda con un estudio realizado con Hakanen *et al* en el 2003, donde de 376 cepas, el 46% fue resistente a este antibiótico. Además, entre otros antimicrobianos la resistencia también se presentó a tetraciclina y ampicilina con el 46 y 17% respectivamente. De las cepas resistentes a ciprofloxacina, el 68 % fue resistente a tetraciclina y el 35% a ampicilina, encontrándose con ello cepas multirresistentes.

En México, también hemos observado un rápido aumento de la resistencia a las fluoroquinolonas de *C. jejuni*, esto se observó gracias a una técnica de análisis de amplificación de mutación (MAMA-PCR) sin realizar la secuenciación de DNA. De 56 aislados de *Campylobacter*, 46 (81%) fueron resistentes a uno o más fluoroquinolonas. La mutación *gyrA* se observó en el 40 (84%) de los 46 aislados analizados, confirmando con ello que la mayor incidencia de resistencia de los aislados en nuestra población se debe a una mutación del gen *gyrA* (Tuz-Dzib *et al.*, 2000). La resistencia a fluoroquinolonas por parte de *C. jejuni* se debe a una mutación puntual simple en los genes que codifican las subunidades de la DNA girasa (*gyrA*) y ocasionalmente de la subunidad de topoisomerasa IV *parC*. En países europeos y Estados Unidos se ha visto un incremento en la resistencia a fluoroquinolonas relacionado esto al uso de este antibiótico en medicina veterinaria (Engberg *et al.*, 2001; Nachamkin *et al.*, 2002; Alterkruse *et al.*, 1999).

Con respecto a la resistencia a eritromicina (macrólidos) se ha reportado una alza en la misma, para el caso de la tasa de resistencia a este antimicrobiano en España y Taiwan para *C. jejuni* fue 17% (Li *et al.*, 1998; Sáenz *et al.*, 2000). En otro estudio, la resistencia a la azitromicina fue del 6% en Tailandia, sin embargo las cepas resistentes a este antimicrobiano también fueron resistentes a fluoroquinolonas (Isenbarger *et al.*, 2002). La

resistencia a macrólidos por parte de *Campylobacter* difiere entre países y especies (Gibreel and Taylor, 2006). Esta resistencia predomina en *C. coli*, en tanto que en *C. jejuni* no excede del 10%.

La resistencia a macrólidos en *C. jejuni* y *C. coli* está dado por dos mecanismos llamados modificación y efflux. La mutación en el RNAr 23S bloquea la interacción de los macrólidos a la subunidad ribosomal 50S, y por ello se confiere resistencia a macrólidos. Específicamente, mutaciones en la posición 2074 y 2075 se han asociado con un alto nivel de resistencia en *C. jejuni* y *C. coli* (Jensen and Aarestrup, 2001; Vacher *et al.*, 2003; Gibreel *et al.*, 2005; Mamelli *et al.*, 2005). Mutaciones en estas posiciones probablemente bloqueen la unión de los macrólidos a su sitio en la subunidad ribosomal 23S (Pfister *et al.*, 2004).

En nuestro estudio la principal resistencia se encontró para tetraciclina y ácido nalidíxico por igual. Algunos autores han reportado que la resistencia a tetraciclina de *Campylobacter* puede ser mediada por plásmidos (Taylor *et al.*, 1980). Se ha descubierto una proteína de protección ribosomal Tet(O) [producto del gen *tet(O)*] que se une al ribosoma bacteriano y desplaza como consecuencia a la tetraciclina (Connel *et al.*, 2003; Trieber *et al.*, 1988). Dicho plásmido puede ser únicamente transferible entre especies de *Campylobacter* (Taylor and Courvalin, 1988).

La bomba efflux CmeABC también ha sido implicada como resistencia intrínseca o adquirida a tetraciclina de *Campylobacter* (Lin *et al.*, 2002; Pumbwe and Piddock, 2002; Gibreel *et al.*, 2007).

En nuestro trabajo, una cepa de *C. coli* (12pfB) fue la más resistente a antimicrobianos sensible solamente a ampicilina. Esto concuerda con Thakur *et al* en el 2009, quienes reportaron que *C. coli* mostraba resistencia a múltiples antimicrobianos tales como fluoroquinolonas y macrólidos más frecuentemente que *C. jejuni*. De los aislados de *Campylobacter* en diversos alimentos así como de humanos, se encontró una alta frecuencia de resistencia a antimicrobianos para ciprofloxacina y eritromicina. El 65% de

los aislados de humano fue resistente a eritromicina y en el caso de los aislados de carne de pavo en punto de venta, las cepas de *C. coli* mostraron mayor resistencia a ciprofloxacina (82%) y eritromicina (46%). Esto es de mayor interés si consideramos que las fluoroquinolonas y los macrólidos son los agentes antimicrobianos de elección para tratar una *Campylobacteriosis* severa en humanos (Butzler, 2004; Yates, 2005).

*C. coli* se ha reportado ser más frecuentemente resistente a eritromicina que *C. jejuni*, en donde se reporta una tasa actual de resistencia entre 0 y 50%. La resistencia de *C. coli* a las fluoroquinolonas ha ido en incremento y actualmente se estima que es de 30.8% en EUA (Fitzgerald *et al.*, 2008).

Tomando en consideración, los resultados de resistencia de las cepas analizadas, pudiéramos considerar como riesgoso para la salud humana una vez que dichas cepas se encuentren en los alimentos o como responsables de infecciones en humanos.

En base a todo lo anterior, se acepta la hipótesis de este trabajo que versó en la posibilidad de desarrollar un método rápido para la búsqueda e identificación de *Campylobacter jejuni* y *C. coli* a partir de alimentos para un análisis posterior de susceptibilidad a antimicrobianos.

El medio formulado (M-BFEB) demostró ser capaz de permitir un enriquecimiento de *C. jejuni* y *C. coli* a partir de muestras de alimentos incubado bajo condiciones aeróbicas y permitió su acoplamiento a la técnica de PCR disminuyendo el tiempo requerido para identificar presuntivamente a este microorganismo. Según la incidencia de *C. jejuni* y *C. coli* en muestras de pollo, el riesgo de *campylobacteriosis* pudiera reducirse a través de una cocción apropiada. Nuestro trabajo proporciona información útil para el desarrollo o re-evaluación de nuevos métodos de detección para mejorar la detección del microorganismo.

## IX. CONCLUSIONES

- Se formuló el medio M-BFEB que puede incubarse en aerobiosis y no posee sangre hemolisada ni carbón activado.
- Los medios Bolton, BFEB y M-BFEB permitieron una recuperación similar ( $P \geq 0.05$ ) para todas las cepas probadas en cultivo puro ya sea por microbiología convencional como por PCR. El medio Preston fue el menos sensible ( $P < 0.05$ ).
- El medio M-BFEB tuvo una mejor recuperación de las cepas *C. jejuni* NADC 5653, 180ip y 238ip por ambos métodos.
- Un enriquecimiento de 24h en todos los caldos probados permitió detectar a *C. jejuni* y *C. coli* por siembra en agar y por PCR.
- *C. jejuni* se recuperó en un medio donde estaba creciendo junto con *E. coli* (co-cultivo a las mismas concentraciones), incluso cuando la cantidad de bacterias fue muy elevada ( $1 \times 10^6$  UFC/ml *C. jejuni-E. coli*)
- *C. coli* se recuperó desde 10 UFC/ml en un medio donde estaba creciendo junto con *E. coli* a la misma concentración.
- *C. jejuni* y *C. coli* se recuperaron desde 10 UFC/ml creciendo a altas concentraciones de *E. coli* ( $10^7$ - $10^8$  UFC/ml) en los medios BFEB y M-BFEB.
- Una mezcla de *C. jejuni* NADC 5653 y *C. coli* 19 inoculadas en piel de pollo y sembradas en los enriquecimientos fue recuperada a partir de una concentración de 10UFC/ml en el medio M-BFEB.
- El medio M-BFEB fue diferente significativamente ( $P < 0.05$ ) con respecto a los otros tres medios siendo el que mejores resultados presentó para su uso directo por PCR.
- El medio M-BFEB permitió recuperar a *C. jejuni* y *C. coli* de cerdo en a partir de 1 UFC/ml.
- *C. jejuni* y *C. coli* se detectaron por método convencional en 9.8% de pollo crudo. De 20 muestras positivas 6 fueron *C. jejuni* y 14 *C. coli* a partir del caldo Bolton (14), M-BFEB (5) y BFEB (1).
- *C. jejuni* y *C. coli* por PCR en pollo crudo fue de 41.6% (33.8% *C. jejuni* y 7.84% *C. coli*). De las muestras, 33 fueron positivas por Bolton (24 *C. jejuni* y 9 *C. coli*), 28 por el

medio BFEB (23 *C. jejuni* y 5 *C. coli*) y 24 por medio del M-BFEB (22 *C. jejuni* y 2 *C. coli*).

- No se encontró a *Campylobacter* en ninguna muestra de cerdo (150 cerdo crudo y 49 cerdo cocido) por método convencional ni por PCR.
- El 56% (13) de los aislados fueron resistentes ya sea al ácido nalidíxico o a la tetraciclina, el 52% a la ciprofloxacina y la menor resistencia (4.3%) se obtuvo frente a la ampicilina y gentamicina.
- El patrón de resistencia de los aislados fue: Ácido nalidíxico = tetraciclina > ciprofloxacina > azitromicina = eritromicina > gentamicina = ampicilina.

## X. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en la presente investigación derivan en algunas recomendaciones, tomando en cuenta que se logró el aislamiento de 20 cepas de *C. jejuni* y/o *C. coli* a partir de muestras de pollo procedentes de diversos sitios, resulta de interés determinar su perfil genético con la finalidad de conocer la variabilidad genética de los aislados de este patógeno que circulan en nuestra región y establecer con ello una posible relación al provenir de muestras y periodos diferentes.

Además, debido a que algunos aislados presentaron multirresistencia a los antimicrobianos se recomienda realizar un análisis genético a fin de determinar el mecanismo de resistencia que posee investigando probablemente las mutaciones puntuales en ciertos genes responsables de ello. O bien, determinar si estos aislados presentan algún plásmido que confiera resistencia a estos antimicrobianos o la detección de bombas efflux con la misma finalidad.

Asimismo, una vez desarrollado el método rápido para la búsqueda de *C. jejuni* y *C. coli* basado en PCR, esta metodología podría ser una base importante para implementarla en algún laboratorio ya que no resulta de alto costo al minimizar la utilización de incubadora o un sistema de generación de CO<sub>2</sub>. Inclusive podría de ser utilidad a nivel de campo para determinar la incidencia de dichos patógenos en aves de corral o animales de granja que pueden ser vehículos de transmisión de estas bacterias, lo que permitirá tomar medidas adecuadas y a tiempo para controlarlas.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Aarestrup FM, Engberg J. 2001. Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. *Veterinary Research* 32:311–321.
2. Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K. 1994. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *Forensic Science* 39:362-372.
3. Alfredson DA, Korolik V. 2007. Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiology Letters*. 277:123–132
4. Allos BM 2001. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends *Clinical Infections Disease* 32:1201–1206.
5. Altekruze SF, Stern NJ, Fields PI, Swerdlow DL. 1999. *Campylobacter jejuni*-An emerging foodborne pathogen. *Emerging Infectious Diseases* 5:28-35
6. Angulo FJ, Baker NL, Olsen SJ, Anderson A, Barrett TJ. (2004). Antimicrobial Use in Agriculture: Controlling the Transfer of Antimicrobial Resistance to Humans. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*. 15(2):78-85.
7. Anónimo, 2001. *Campylobacter*. Prepared for the Ministry of Health by ESR Ltd., Issued May 2001. Disponible en: <http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/Campylobacter.pdf>. Accesado 20 dic 2010.
8. Avrain L, Vernozy-Rozand C, and Kempf I. 2004. Evidence for natural horizontal transfer of *tetO* gene between *Campylobacter jejuni* strains in chickens. *Journal of Applied Microbiology*. 97:134-140.
9. Axelsson-Olsson D, Waldenström J, Broman T, Olsen B, and Holmberg M. 2005. Protozoan *Acanthamoeba polyphaga* as a Potential Reservoir for *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:987–992.
10. Baillon ML, van Vliet AH, Ketley JM, Constantinidou C, Penn CW. 1999. An iron-regulated alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) confers aerotolerance and oxidative stress resistance to the microaerophilic pathogen *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology*. 181:4798–4804.

11. Baserisalehi M, Bahador N and Kapadnis BP. 2004. A novel method for isolation of *Campylobacter* spp. from environmental samples, involving sample processing and blood and antibiotic free medium. *Journal of Applied Microbiology*. 97:853-860.
12. Bauer, A. W., W. M. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45: 493-496.
13. Baylis CL, MacPhee S, Martin KW, Humphrey TJ, and Betts RP. 2000. Comparison of three enrichment media for the isolation of *Campylobacter* spp. from foods. *Journal of Applied Microbiology*. 89:884–891
14. Blaser M. and Engberg J. 2008. Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections, p. 99-121. In I. Nachamkin, C. M. Szymanski, and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 3rd ed. ASM Press, Washington, DC
15. Blaser MJ, Hardesty HL, Powers B, Wang WL. 1980. Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in biological milieus. *Journal of Clinical Microbiology*. 11:309–313.
16. Blaser, M.J. 2000. *Campylobacter jejuni* and related species. 5<sup>th</sup> ed. New York.
17. Boer P, Wagenaar JA, Achterberg RP, Putten JP, Schouls LM, and Duim B. 2002. Generation of *Campylobacter jejuni* genetic diversity in vivo. *Molecular Microbiology*. 44:351-359.
18. Bohaychuk VM, Gensler GE, King RK, Manninen KI, Sorensen O, Wu JT, Stiles ME, and McMullen LM. 2006. Occurrence of pathogens in raw and ready-to-eat meat and poultry products collected from the retail marketplace in Edmonton, Alberta, Canada. *Journal of Food Protection*. 69:2176–2182
19. Bolton F. 2000. Methods for isolation of *Campylobacter* from humans, food and water. In: The increasing incidence of human campylobacteriosis. Report and Proceedings of a WHO Consultation of Experts, Copenhagen, Denmark 21-25 November 2000, Pp 87-93.
20. Bolton FJ, Robertson L. 1982. A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. *Journal of Clinical Pathology*. 35:462–467.

21. Bolton FJ, Coates D, Hutchinson DN. 1984. The ability of *Campylobacter* supplements to neutralize photochemically induced toxicity and hydrogen peroxide. *Journal of Applied Bacteriology*. 56:151-157.
22. Briscoe DM, McMenamin JB, O'Donohoe NV. 1987. Prognosis in Guillain-Barre syndrome. *Archives of Diseases in Childhood*. 62:733-735
23. Butzler 2004. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clinical Microbiology Infectious* 10:868-876.
24. By CD. Ribeiro and Price TH. 1984. The use of Preston enrichment broth for the isolation of thermophilic campylobacters from water, *Journal of Hygiene Cambridge*. 92:45-51.
25. Carrillo E. 2009. El pollo y la "bacteria fastidiosa". *La gaceta*, lunes 12 de enero de 2009, Disponible en [http://www.gaceta.udg.mx/Hemeroteca/paginas/556/G556\\_COT%209.pdf](http://www.gaceta.udg.mx/Hemeroteca/paginas/556/G556_COT%209.pdf), Accesado el 12 de dic 2010.
26. Catteau M. 1995. The genus *Campylobacter*. In CM Bourgeois and JY Leveau (ed.), *Microbiological Control for Foods and Agricultural Products*. VCH Publishers, Inc., New York. p. 325-334.
27. Centers for Disease Control and Prevention. 2010. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food—10 states, 2009. *Morb. Mortal. Wkly. Rep*. 59:418-422.
28. Chantarapanont W, Berrang ME and Frank JF. 2004. Direct microscopic observation of viability of *Campylobacter jejuni* on chicken skin treated with selected chemical sanitizing agents. *Journal of Food Protection*. 67:1146-1152.
29. Cloak OM, and Fratamico PM. 2002. A multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from a swine processing facility and character- characterization of isolates by pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic resistance profiles. *Journal of Food Protection*. 65:266-273.
30. Connell SR, Tracz DM, Nierhaus KH, Taylor DE. 2003. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy*. 47:3675-3681.

31. Corry JEL, Post DE, Colin P, Laisney MJ. 1995. Culture media for the isolation of campylobacters. *International Journal of Food Microbiology*. 26:43-76.
32. Delsol AA, Sunderland J, Woodward MJ, Pumbwe LJ, Piddock V, and Roe. 2004. Emergence of fluoroquinolone resistance in the native *Campylobacter coli* population of pigs exposed to enrofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53:872-874
33. Devane ML, Nicol C, Ball A, Klena JD, Scholes P, Hudson JA, Baker MG, Gilpin BJ, Garrett N, and Savill MG. 2005. The occurrence of *Campylobacter* subtypes in environmental reservoirs and potential transmission routes. *Journal of Applied Microbiology*. 98:980-990.
34. Donnison A. 2003. Isolation of Thermotolerant Campylobacter- Review & Methods for New Zealand Laboratories. Prepared for the Ministry of Health. Pg. 2-4.
35. Doyle MP, Roman DJ. 1982. Response of *Campylobacter jejuni* to sodium chloride. *Applied and Environmental Microbiology*. 43:561–565.
36. Engberg J, Aarestrup FM, Taylor DE, Gerner-Smidt P, and Nachamkin I. 2001. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerging of Infectious Disease*. 7:24–34.
37. Everest P and Ketley JM. *Campylobacter*. In: *Molecular Medical Microbiology*. 2002; (ed) Max Sussman. p. 1311-1329
38. Fauchere J L, Rosenau A, Veron M, Moyon E N, Richard S, Pfister A. 1986. Association with Hela cells of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from human feces. *Infection and Immunity*. 54:283-87
39. Fernandez H, Vergara M, Tapia F. 1985. Desiccation resistance in thermotolerant *Campylobacter* species. *Infection*. 13:197.
40. Fernandez H., Farace MI. 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, Department of Communicable Disease Surveillance and response in collaboration con CDC, USA.
41. Fitzgerald C, Whichard J, and Nachamkin I. 2008. Diagnosis and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* species, p. 227–243. In I. Nachamkin, C. M.

- Szymanski, and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
42. Food Safety Authority of Ireland. 2002. *Campylobacter* spp. Disponible en: <http://www.ndsc.ie/hpsc/AboutHPSC/AnnualReports> Accesado: 02 enero 2007.
  43. Fravallo P, Laisney PM, Gillard G., Salvat, and Chemaly M. 2009. *Campylobacter* transfer from naturally contaminated chicken thighs to cutting boards is inversely related to initial load. *Journal of Food Protection*. 72:1836–1840
  44. García-Peña FJ, Pérez CI, Pérez BD, Echeita SA. Sin año. Campylobacteriosis: aspectos clínicos y epidemiológicos. *Revista seguridad alimentaria*. Disponible en: [www.colvema.com/PDF/Campilo.pdf](http://www.colvema.com/PDF/Campilo.pdf) Accesado el 09 dic 2010.
  45. Ge B, McDermott PF, White DG, Meng J. 2005. Role of efflux pumps and topoisomerase mutations in fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 49:3347–3354
  46. Ge B, White DG, McDermott PF, Girard W, Zhao S, Hubert S, Meng J. 2003. Antimicrobial-Resistant *Campylobacter* Species from Retail Raw Meats. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:3005-3007.
  47. Ghafir Y, China B, Dierick K, De Zutter L, and Daube G. 2008. Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork, and poultry meats in Belgium. *Journal of Food Protection*. 71:35-45
  48. Gibreel A, and Taylor D. 2006. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 58:243-255
  49. Gibreel A, Kos VN, Keelan M, Trieber CA, Levesque S, Michaud S, Taylor DE. 2005. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: molecular mechanism and stability of the resistance phenotype. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49:2753-2759.
  50. Gibreel A, Wetsch NM, Taylor DE. 2007. Contribution of the CmeABC Efflux Pump to Macrolide and Tetracycline Resistance in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51: 3212-3216.
  51. Giesendorf BA, Quint WG, Henkens MH, Stegeman H, Huf FA, and Niesters HG. 1992. Rapid and sensitive detection of *Campylobacter* spp. In chicken products by

- using the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*. 58:3804–3808.
52. Goosens H., Butzler JP. 1992. Isolation and identification of *Campylobacter* spp. In: *Campylobacter jejuni: Current status and future trends*. Ed I. Nachamkin, M.J.
  53. Gouws PA, Liedemann I. 2005. Detection of *L. monocytogenes* in Food Products, *Food Technology and Biotechnology*. 43:201–205
  54. Grant CR, Michael E, Witold JR, Lucy ST. 1993. Role of flagella in adherence, internalization and translocation of *Campylobacter jejuni* in non polarized and polarized epithelial cell cultures. *Infection and Immunity*. 61:1764-71
  55. Grant KA, Park SF. 1995. Molecular characterization of katA from *Campylobacter jejuni* and generation of a catalase-deficient mutant of *Campylobacter coli* by intraspecific allelic exchange. *Microbiology*. 141:1369– 1376.
  56. Griffiths PL, Park RW. 1990. Campylobacters associated with human diarrhoeal disease. *Journal of Applied Bacteriology*. 69:281–301.
  57. Grigoriadis SG, Koidis PA, Varelzsis KP and Batzios C.A. 1997. Survival of *Campylobacter jejuni* inoculated in fresh and frozen beef hamburgers stored under various temperatures and atmospheres. *Journal of Food Protection* 60:903–907.
  58. Guerry P, Alm RA, Power ME, Logan SM, and Trust TJ. 1991. Role of Two Flagellin Genes in *Campylobacter* Motility. *Journal of Bacteriology*. 173:4757-4764.
  59. Guerry P. 2007. *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends in Microbiology*. 15: 456–461.
  60. Gupta A, Nelson JM, Barrett TJ. 2004. Antimicrobial resistance among *Campylobacter* strains, United States, 1997–2001. *Emerging Infectious Diseases*. 10:1102–1109
  61. Gutiérrez Castillo, Adriana del Carmen; Martínez P, Henri L and Calderon A. , Apodaca NL. Salmonelosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo. *Vet. Méx* [online]. 2008, vol.39, n.1, pp. 81-90. ISSN 0301-5092., Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/vetmex/v39n1/v39n1a7.pdf>. Accesado 22 dic 2010
  62. Hakanen AJ, Lehtopolku M, Siitonen A, Huovinen P and Kotilainen P. 2003. *Antimicrobial Chemotherapy*. 52:1035-1039

63. Hannula M. 2010. Mechanisms and Development of Antimicrobial Resistance in *Campylobacter* with Special Reference to Ciprofloxacin. Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, for public examination in Hall 6. Fabianinkatu 33, Helsinki, on June 4, 2010.
64. Hassane DC, Lee RB, Mendenhall MD, Pickett CL. 2001. Cytolethal distending toxin demonstrates genotoxic activity in a yeast model. *Infection and Immunity*. 69:5752–5759.
65. Hazeleger W, Arkesteijn C, Toorop B, and Beumer R. 1994. Detection of the coccoid form of *Campylobacter jejuni* in chicken products with the use of the polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology*. 24:273–281.
66. Hazeleger WC, Wouters JA, Rombouts FM and Abee T. 1998. Physiological activity of *Campylobacter jejuni* far below the minimal growth temperature. *Applied and Environmental Microbiology*. 164:3917–3922.
67. Hilbert F, Scherwitzel M, Paulsen P, and Szostak MP. 2010. Survival of *Campylobacter jejuni* under Conditions of Atmospheric Oxygen Tension with the Support of *Pseudomonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 76:5911-5917.
68. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT and Williams, ST. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore.
69. Hong J; Kim JM; Jung, Kyung W; So Hyun K; Wonki B; Hye Cheong B; Jereoyng G; Kim M; Junghee S; Yong Ho P. 2007. Prevalence and antibiotic resistance of *Campylobacter* spp isolated from chicken meat, pork, and beef in Korea, from 2001 to 2006 . *Journal of Food Protection*. 70:860–866
70. Hudson J, Nicol C, Wright J, Whyte, R. and Hasell, S.K. 1999. Seasonal variation of *Campylobacter* types from human cases, veterinary cases, raw chicken, milk and water. *Journal of Applied Microbiology* 87:115–124
71. Hughdahl M B, John T B, Michael P D. 1988. Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity*. 56:1560-66.
72. Humphrey T. 2002. *Campylobacter* spp: not quite the tender flowers we thought they were? *Microbio Today*. Disponible en:

[http://www.socgenmicrobiol.org.uk/pubs/micro\\_today/pdf/020203.pdf](http://www.socgenmicrobiol.org.uk/pubs/micro_today/pdf/020203.pdf). Accesado 10 dic 2010.

73. Humphrey TJ, Cruickshank JG. 1985. Antibiotic and deoxycholate resistance in *Campylobacter jejuni* following freezing or heating. *Journal of Applied Bacteriology*. 59:65-71.
74. Humphrey TJ. 1989. An appraisal of the efficacy of pre-enrichment for the isolation of *Campylobacter jejuni* from water and food. *Journal of Applied Bacteriology*. 66:119-126
75. Humphrey TJ. 1990. The synergistic inhibition of *Campylobacter jejuni* by rifampicin and hydrogen peroxide. *Letters in Applied Microbiology*. 10:97-100.
76. Hunt JM, and Tran TT. 1997. Detection of *Campylobacter jejuni* in enriched samples of inoculated foods by the polymerase chain reaction. Abstract of the 111th Annual Meeting, Association of Official Analytical Chemists, p. 72. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, Md
77. Inglis GD, Kalischuk LD. 2003. Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:3435–3447
78. Isenbarger DW, Hoge CW, Srijan. 2002. Comparative antibiotic resistance of diarrheal pathogens from Vietnam and Thailand, 1996–1999. *Emerging Infectious Diseases* 8, 175–80
79. Itoh R, Soothe S, Yatsuyanagi J. 1995. Specific detection of *Campylobacter jejuni* by means of polymerase chain reaction in chicken litter. *Journal of Veterinary Medical Science*. 57:1225-7.
80. Jasson V, Sampers I, Botteldoorn N, Lopez-Galvez F, Baert L, Denayer S, Rajkovic A, Habib I, De Zutter L, Debevere J, and Uyttendaele I. 2009. Characterization of *Escherichia coli* from raw poultry in Belgium and impact on the detection of *Campylobacter jejuni* using Bolton broth. *International Journal of Food Microbiology*. 135:248–253.
81. Jay JM, Loessner MJ and Golden DA. 2005. *Modern food microbiology*. 7th ed. Springer. New York. 790 p.

82. Jeffrey JS, Hunter A, and Atwill. 2000. A Field-Suitable, Semisolid Aerobic Enrichment Medium for Isolation of *Campylobacter jejuni* in Small Numbers, *Journal of Clinical Microbiology*. 38:1668–1669.
83. Jeffrey, JS, Tonooka KH and Lozano J. 2001. Prevalence of *Campylobacter* spp. from skin, crop and intestine of commercial broiler chicken carcasses at processing. *Poultry Science* 80, 1390–1392.
84. Jensen LB, Aarestrup FM. 2001. Macrolide resistance in *Campylobacter coli* of animal origin in Denmark. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45:371-372.
85. Jones DM, Sutcliffe EM, and Curry A. 1991. Recovery of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni*. *Journal of General Microbiology*. 137:2477–2482.
86. Jones K, Howard S, Wallace JS. 1999. Intermittent shedding of thermotolerant *Campylobacter* by sheep at pasture. *Journal of Applied Microbiology*. 86:531-536.
87. Jones, D.M., Sutcliffe, E.M., Rios, R., Fox, A.J., Curry, A., 1993. *Campylobacter jejuni* adapts to aerobic metabolism in the environment. *Journal of Medical Microbiology*. 38:145– 150.
88. Josefsen MH, Lubeck PS, Hansen F, and Hoorfar J. 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. *Journal of Microbiology Methods* 58:39–48
89. Karlyshev AV, Linton D, Gregson NA, Lastovica AJ, Wren BW. 2000. Genetic and biochemical evidence of a *Campylobacter jejuni* capsular polysaccharide that accounts for Penner serotype specificity. *Molecular Microbiology*. 35:529–541
90. Karmali MA, Simor AE, Roscoe M, Fleming PC, Smith SS, and Lane J. 1986. Evaluation of a blood-free, charcoal-based medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. *Journal of Clinical Microbiology*. 23:456-459
91. Katzav M, Isohanni P, Lund M, Hakkinen M, Lyhs U. 2008. PCR assay for the detection of *Campylobacter* in marinated and non-marinated poultry products. *Food Microbiology*. 25:908–914.
92. Kawasaki S, Fratamico PM, Horikoshi N, Okada Y, Takeshita K, Sameshima T, Kawamoto S. 2009. Evaluation of a Multiplex PCR System for Simultaneous

- Detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in Foods and in Food Subjected to Freezing. *Foodborne Pathogens and Disease* 6:81-89.
93. Ketley JM. 1997. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology* 143:5–21
94. Kim JM, Joonbae H; Wonki B, Cheong KO, Kim, Hyun S; Yong Ho O. 2010. Prevalence, Antibigrams, and Transferable *tet(O)* Plasmid of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolated from Raw Chicken, Pork, and Human Clinical Cases in Korea. *Journal of Food Protection* 73:1430-1437.
95. Kim SA, Lee YM, Hwang IG, Kang DH, Woo GJ, and Rhee MS. 2009. Eight enrichment broths for the isolation of *Campylobacter jejuni* from inoculated suspensions and ground pork. *Letters in Applied Microbiology*. 49:620–626
96. Kirk R, Rowe MT. 1994. A PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in water. *Letters in Applied Microbiology* 19:301–303.
97. Komagamine T., Yuki N. 2006. Ganglioside mimicry as a cause of Guillain–Barre syndrome. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*. 5:391–400
98. Koneman A. 1997. *Diagnostic Microbiology*. 5<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
99. Koong Hong Teh, 2008. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in controlled mixed-microbial populations. Thesis. Massey University, Palmerston North, New Zealand. Disponible en: [muir.massey.ac.nz/bitstream/10179/782/2/01front.pdf](http://muir.massey.ac.nz/bitstream/10179/782/2/01front.pdf). Accesado: 03 dic-2010.
100. Kramer JM. 2000. *Campylobacter* contamination of raw meat and poultry at retail sale: identification of multiple types and comparison with isolates from humans infection. *Journal of Food Protection*. 63:1654-1659
101. Lara-Tejero M, Galan JE. 2000. A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. *Science*. 290:354–357.
102. Lastovica AJ and Le Roux E. 2001. Efficient isolation of *Campylobacter upsaliensis* from stools, *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 4222–4223.
103. Lazaro B, J Carcamo, A Audicana, I Perales and A Fernandez-Astorga. 1999. Viability and DNA maintenance in nonculturable spiral *Campylobacter jejuni* cells

- after long-term exposure to low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:4677–4681.
104. Lee A, Smith SC, Coloe PJ. 1998. Survival and growth of *Campylobacter jejuni* after artificial inoculation onto chicken skin as a function of temperature and packaging conditions. *Journal of Food Protection*. 61:1609–1614
105. Li CC, Chiu CH, Wu, J. L. 1998. Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *coli* by using E-test in Taiwan. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 30:39–42;
106. Lin J, Michel LO, Zhang Q. 2002. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46:2124-2131.
107. Line JE, Garrish JK, Glassmoyer P and Kirsten E. 2002. Selective media for recovery and numeration of campylobacters. Disponible en <http://www.patentstorm.us/patents/6368847.html> Accesado el 10 dic 2010.
108. Line JE, Pearson KG. 2003. Development of a Selective Broth Medium for the Detection of Injured *Campylobacter jejuni* by Capacitance Monitoring. *Journal of Food Protection* 66:1752-1755
109. Llano-Sotelo B, Azucena EF, Kotra LP, Mobashery S, Chow CS. 2002. Aminoglycosides modified by resistance enzymes display diminished binding to the bacterial ribosomal aminoacyl-tRNA site. *Chemistry and Biology* 9:455-463.
110. M. Szymanski & M. J. Blaser. Washington D.C.: American Society for Microbiology.
111. Mamelli L, Prouzet-Mauleon V, Pages JM, Megraud F, Bolla JM. 2005. Molecular basis of macrolide resistance in *Campylobacter*: role of efflux pumps and target mutations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56:491-497.
112. Martin KW, Mason MJ, McAlpine KT, Humphrey TJ. 1996. A *Campylobacter* medium for all seasons? *In: Campylobacters, Helicobacters and related organisms* eds. Newell, D.G., Ketley, J.M. & Feldman, R.A. Plenum Press, New York, Pp 61-65.
113. Martin KW, Mattick KL, Harrison M., Humphrey TJ. 2002. Evaluation of selective media for *Campylobacter* isolation when cycloheximide is replaced with amphotericin B. *Letters in Applied Microbiology*. 34:124-129

114. Mayr AM, Lick S, Bauer J, Thärigen D, Busch U, Huber I. 2010. Rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* in food, using multiplex real-time PCR. *Journal of Food Protection*. 73:241-50.
115. Medeiros DT, Sattar SA, Farber JM, Carrillo CD. 2008. Occurrence of *Campylobacter* spp. in Raw and Ready-to-Eat Foods and in a Canadian Food Service Operation. *Journal of Food Protection*. 71: 2087–2093
116. Medema GJ, Schets FM, van de Giessen AW, and Havelaar AH. 1992. Lack of colonization of 1 day old chicks by viable non-culturable *Campylobacter jejuni*. *Journal of Applied Bacteriology*. 72:512–516.
117. Meldrum RJ, Smith RMM, and Wilson IG. 2006. Three-Year Surveillance Program Examining the Prevalence of *Campylobacter* and *Salmonella* in Whole Retail Raw Chicken. *Journal of Food Protection*. 69:928–931
118. Meldrum RJ, Tucker D, Smith RMM, and Edwards C. 2005. Survey of *Salmonella* and *Campylobacter* Contamination of Whole, Raw Poultry on Retail Sale in Wales in 2003, *Journal of Food Protection*. 68:1447–1449
119. Monografía Pollo. Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial. Mayo 2009. Disponible en: [www.financierarural.gob.mx/.../MONOGRAFIA%20POLLO%202009.pdf](http://www.financierarural.gob.mx/.../MONOGRAFIA%20POLLO%202009.pdf) Accesado 18 dic 2010.
120. Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, Bonnett J, Vidal R, Cabrita J, Mégraud F. 1997. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *Journal of Clinical Microbiology* 35:995–998.
121. Moore JE, Matsuda M. 2002. 15th international workshop on campylobacter, helicobacter and related organisms. *Emerging Infectious Disease*. 16.
122. Moran L, Kelly C. and Madden RH. 2009. Factors affecting the recovery of *Campylobacter* spp. from retail packs of raw, fresh chicken using ISO 10272-1:2006. *Letters in Applied Microbiology*. 48:628-632.
123. Moran L, Scates P, and Madden RH. 2009. Prevalence of *Campylobacter* spp. in raw retail poultry on sale in Northern Ireland. *Journal of Food Protection*. 72:1830–1835

124. Morata P, Queipo-Ortuno MI, Colmenero JD. 1998. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 36:2443-2446
125. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2009. In *Medical Microbiology*. USA: Mosby Elsevier.
126. Nachamkin I, CM Szymanski and MJ Blaser. 2008. *Campylobacter*, 3 ed. ASM Press Washington D. C.
127. Nachamkin I, Ung H, and Li M. 2002. Increasing fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni*, Pennsylvania, USA, 1982-2001. *Emerging Infectious Diseases*. 8:1501-1503.
128. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial susceptibility tests. Approved standard, ASM. NCCLS.
129. Neisser A, Bernheimer H, Berger T, Moran AP, Schwerer B. 1997. Serum antibodies against gangliosides and *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides in Miller Fisher syndrome. *Infection and Immunity*. 65:4038–4042
130. Newell DG. 2001. Animal models of *Campylobacter jejuni* colonization and disease and the lessons to be learned from similar *Helicobacter pylori* models. Symposium series Society for Applied Microbiology. 30:57S–67S
131. Ng LK, Stile ME, and Taylor E. 1985. Inhibition of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by antibiotics used in selective growth media. *Journal of Clinical Microbiology*. 22:510–514
132. Nguyen HT, Corry JE, Miles CA. 2006. Heat resistance and mechanism of heat inactivation in thermophilic campylobacters. *Applied and Environmental Microbiology*. 72:908–13.
133. Nogva HK, Bergh A, Holck A, and Rudi K. 2000. Application of the 5'-nuclease PCR assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 4029–4036.
134. Nuijten PJ, van Asten FJ, Gaastra W, and vander Zeijst BA. 1990. Structural and functional analysis of two *Campylobacter jejuni* flagellin genes. *Journal of Biological Chemistry*. 265:17798-17804

135. Oliver SP, Jayarao MB, and Almeida TA. 2005. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathogens Disease*. 2:115-29
136. On S, Jordan P. 2003. Evaluation of 11 PCR Assays for Species-Level Identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Clinical Microbiology*. 41:330-336.
137. On SL, and Holmes B. 1991. Reproducibility of tolerance tests that are useful in the identification of *Campylobacter*. *Journal of Clinical Microbiology*. 29:1785-1788.
138. Oosterom, J., M. J. G. M. VereJken, and G. B. Engels. 1981. *Campylobacter* isolation. *Veterinary Qr*. 3:104.
139. Ordaz CG, Ramírez P, Williams JJ, Echeverría P, Salazar R. 2010. Multirresistencia a los antimicrobianos en cepas de *Campylobacter* spp aisladas de carne de pollo procedente de mercados y supermercados de la ciudad de Mérida, Yucatán. *Memorias del Congreso Internacional de Inocuidad Alimentaria 2010*. Querétaro, México. 6-8 octubre.
140. Osano O, Arimi SM. 1999. Retail poultry and beef as sources of *Campylobacter jejuni*. *East African Medical Journal*. 76:141-3
141. Parisi A, Lanzilotta SG, Addante N, Normanno G, Di Modugno G, Dambrosio A, and Montagna CO. 2007. Prevalence, molecular characterization and antimicrobial resistance of thermo- thermophilic *Campylobacter* isolates from cattle, hens, broilers and broiler meat in south-eastern Italy. *Veterinary Research Communications*. 31:113–123.
142. Park CE, Stankiewicz ZK, Lovett J, and J. Hunt. 1981. Incidence of *Campylobacter jejuni* in fresh eviscerated whole market chickens. *Canadian Journal of Microbiology*. 27:841–842.
143. Park SF. 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. 74:177–188.
144. Parkhill, J. Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, Chillingworth T, Davies RM, Feltwell T, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev AV, Moule S, Pallen MJ, Penn CW, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, van

- Vliet AH, Whitehead S, Barrell BG. 2000. The genome sequence of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*. 403:665–668.
145. Pearson AD, Greenwood M, Healing TD, Rollins D, Shamat M, Donaldson J, and Colwell RR. 1993. Colonization of broiler chickens by waterborne *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:987–996.
146. Pesci EC, Cottle DL, Pickett CL. 1994. Genetic, enzymatic, and pathogenic studies of the iron superoxide dismutase of *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity*. 62:2687–2695.
147. Pezzotti G, Serafin A, Luzzi I, Mioni R, Milan M, and Perin R. 2003. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. *International Journal of Food Microbiology*. 82:281-7.
148. Pfister P, Jenni S, Poehlsaard J, Thomas A, Douthwaite S, Ban N, Bottger EC. 2004. The structural basis of macrolide-ribosome binding assessed using mutagenesis of 23S rRNA positions 2058 and 2059. *Journal of Molecular Biology* 342:1569-1581.
149. Prescott JF. 2004. Antimicrobial chemotherapy. In *Veterinary Microbiology*. Edited by Hirsh DC, Maclachlan NJ, Walker RL. Iowa USA: Blackwell Publishing. pp. 26-43
150. Pumbwe L, Piddock LJ. 2002. Identification and molecular characterization of CmeB, a *Campylobacter jejuni* multidrug efflux pump. *FEMS Microbiology Letters* 206:185-189.
151. Purdy D and Park SF. 1994. Cloning, nucleotide sequence, and characterization of a gene encoding superoxide dismutase from *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Microbiology* 140:1203–1208.
152. Purdy D, Cawthraw S, Dickinson JH, Newell DG, Park SF. 1999. Generation of a superoxide dismutase-deficient mutant of *Campylobacter coli*: evidence for the significance of SOD in *Campylobacter* survival and colonization. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:2540–2546.

153. Quiñones-Ramírez EI, Vázquez-Salinas C, Rodas-Suárez OR, Ramos-Flores MO, Rodríguez-Montaño R. Frequency of isolation of *Campylobacter* from roasted chicken samples from Mexico City. *Journal of Food Protection*. 2000. 63:117-99.
154. Rasrianaul L, Suthienkul O, Echeverria PD, Taylor DN, Seriwatana J, Bangtrakulnonth A. 1988. Foods as a source of enteropathogens causing childhood diarrhea in Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 39:97-102.
155. Ray B. 2001. *Fundamental food microbiology*. CRC Press, Boca Raton, FL.
156. Robinson DA. 1981. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *British Medical Journal*. 282:1584
157. Rodríguez-Licea G., del Moral LE. 2010. Perspectivas del sector porcícola mexicano para 2010: recuperación de los efectos de la crisis económica y de la influenza (A)H1/N1. *REVISTA TRIMESTRAL DE ANÁLISIS DE COYUNTURA ECONÓMICA*. Abril-junio 2010 Vol. III Núm. 2
158. Rollins DM and RR Colwell. 1986. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 52:531–538.
159. Rosenquist H, Bengtsson A, Hansen T. 2007. A collaborative study on a Nordic standard protocol for detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* in food (NMKL 119, 3. Ed., 2007). *International Journal of Food Microbiology*. 118:201-213.
160. Rossen L, Nørskov P, Holmstrøm K, Rasmussen OF. 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*. 17:37–45
161. Rothenberg PJ, Stern NJ, and Westhoff DC. 1984. Selected enrichment broths for recovery of *Campylobacter jejuni* from foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 48:78-80.
162. Sáenz Y, Zarazaga M, Lantero M, Gastañares MJ, Baquero F, and Torres M. 2000. Antibiotic resistance in *Campylobacter* strains isolated from animals, foods, and humans in Spain in 1997–1998. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 267–71.

- 163.Sails AD, Fox AJ, Bolton FJ, Wareing DRA, and Greenway DLA. 2003. A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:1383-1390
- 164.Sammarco ML; Giancarlo; Fanelli F, Incoronata; Guido MG; Tamburro, Manuela. 2010. Prevalence and Biomolecular Characterization of *Campylobacter* spp. Isolated from Retail Meat. *Journal of Food Protection*. 73:720-728.
- 165.Scherer K, Bartelt E, Sommerfeld C, Hildebrandt G. 2006. Quantification of *Campylobacter* on the surface and in the muscle of chicken legs at retail. *Journal of Food Protection*. 69:757-61
- 166.Shimada K, and Tsuji H. 1986. Enrichment for detection of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*. 23:887-890
- 167.Silbergeld EK, Graham J, Price LB. 2008. Industrial Food Animal Production, Antimicrobial Resistance, and Human Health. *Annual Review of Public Health* 29:151–69
- 168.Skirrow MB. 1977. *Campylobacter* enteritis: a “new” disease. *British Medical Journal*. 2, 9-11.
- 169.Smith, JL.; Fratamico M. 2010. Fluoroquinolone Resistance in *Campylobacter*. *Journal of Food Protection*.73:1141-1152.
- 170.Solow BT, Cloak OM, and Fratamico PM. 2003. Effect of temperature on viability of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on raw chicken or pork skin. *Journal of Food Protection*. 66:2023–2031
- 171.Stern NJ, and Line GE. 1992. Comparison of three methods for recovery of *Campylobacter* spp. from broiler carcasses. *Journal of Food Protection*. 55:663–666
- 172.Stern NJ, Fedorka-Cray P, Bailey JS, Cox NA, Craven SE, Hiatt KL, Musgrove ML, Ladely S, Cosby D, and Mead GC. 2001. Distribution of *Campylobacter* spp. in selected U.S. poultry production and processing operations. *Journal of Food Protection*. 64:1705–1710
- 173.Stevenson JE, White D, Torpey III DJ, Craig AS, Smith KE, Park MM, Pascucilla MA, Anderson DC, y el Grupo de Trabajo NARMS. 2002. La vigilancia mejorada resistencia a los antimicrobianos Entre Bacterias entéricas: NARMS Retail Food

- estudio. Atlanta, GA: Conferencia Internacional sobre Enfermedades Infecciosas Emergentes.
174. Suzuki H, Yamamoto S. 2009. *Campylobacter* contamination in retail poultry meats and by-products in Japan: a literature survey. *Food Control* 20:531–537
175. Sykes RB, Matthew, M. 1976. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2:115-157.
176. Tajada P, Gomez-Graces JL, Alos JI, Balas D, Cogollos R. 1996. Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* to 12 betalactam agents and combinations with beta-lactamase inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40:1924-1925.
177. Tangvatcharin P, Chantachum S, Kopaiboon P, Inttasungkha N, and Griffiths MW. 2005. Comparison of methods for the isolation of thermotolerant *Campylobacter* from poultry. *Journal of Food Protection*. 68:616–620
178. Tarja Pitkänen, Juliane Bräcker, Ilkka T. Miettinen, Anneli Heitto, Jouni Pesola, and Elias Hakalehto. 2009. Enhanced enrichment and detection of thermotolerant *Campylobacter* species from water using the Portable Microbe Enrichment Unit and real-time PCR. *Canadian Journal of Microbiology*. 55:849–858
179. Taylor DE, Courvalin P. 1988. Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter* species. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 32:1107–1112.
180. Taylor DE, Garner RS, Allan BJ. 1983. Characterization of tetracycline resistance plasmids from *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 24:930–935.
181. Taylor DE, Yan W, Ng LK, Manavathu EK, Courvalin P. 1988. Genetic characterization of kanamycin resistance in *Campylobacter coli*. *Annales de l'Institut Pasteur Microbiology* 139:665-676.
182. Tenover FC, Fennell CL, Lee L, LeBlanc DJ. 1992. Characterization of two plasmids from *Campylobacter jejuni* isolates that carry the *aphA-7* kanamycin resistance determinant. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36:712-716.

183. The OXOID MANUAL. 9th Edition 2006. Compiled by E. Y. Bridson. Published by OXOID Limited, Wade Road, Basingstoke, Hampshire RG24 8PW, England. 2-65.
184. Thunberg RL, Tran TT, and Walderhaug MO. 2000. Detection of thermophilic *Campylobacter* spp. in blood-free enriched samples of inoculated foods by the polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*. 63:299–303.
185. Tran TT. 1995. Evaluation of Oxyrase enrichment method for isolation of *Campylobacter jejuni* from inoculated foods. *Letters in Applied Microbiology*. 21:345-347
186. Tran TT. 1998. A blood-free enrichment medium for growing *Campylobacter* spp. under aerobic conditions. *Letters in Applied Microbiology*. 26:145-148
187. Trieber CA, Burkhardt N, Nierhaus KH, and Taylor DE. 1988 Ribosomal protection from tetracycline mediated by Tet(O): Tet(O) interaction with ribosomes is GTP-dependent. *Biological Chemistry*. 379:847–855.
188. Tuz-Dzib F, Reyes L, Guerrero ML, Pickering LK, Ruiz-Palacios GM. 2000. Frequency of GyrA Mutations Among Clinical Isolates of *Campylobacter jejuni* in Mexico by MAMA PCR. *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 17-20.
189. Uyttendaele M, Schukking R, van Gemen B, and Debevere J. 1995. Detection of *Campylobacter jejuni* added to foods by using a combined selective enrichment and nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Applied and Environmental Microbiology*. 61:1341–1347
190. Uzunovic-Kamberovic S. 2003. Antibiotic susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* human isolates from Bosnia and Herzegovina. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51: 1049-1051
191. Vacher S, Ménard A, Bernard E, Mégraud F. 2003. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for detection of point mutations associated with macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47:1125-1128.

192. van der Giessen A, Tilburg J, Ritmeester W, and van der Plas J. 1998. Reduction of campylobacter infections in broiler flocks by application of hygiene measures. *Epidemiology and Infection*. 121:57-66.
193. Van Vliet AHM and JM Ketley. 2001. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *Journal of Applied Microbiology*. 90:45S-56S.
194. Vandamme P. 2000. Taxonomy of the Family *Campylobacteraceae*. In: Nachamkin I, Blaser MJ (eds). *Campylobacter* 2nd Edition. ASM Press, Washington, DC, USA, Pp 3-26.
195. Waage A, Vardund T, Lund V, and Kapperud G. 1999. Detection of small numbers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* cells in environmental water, sewage, and food samples by a seminested PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:1636–1643
196. Wallace RB. 1997. *Campylobacter*. In: Foodborne microorganisms of public health significance, 5th Edition. Eds., Hocking, A.D., Arnold, G., Jenson, I., Newton, K. & Sutherland P. AIFST (NSW Branch) Food Microbiology Group, CSIRO Food Science & Technology, Trenear Printing Service Pty. Ltd, Tempe, NSW, Australia, Pp 267-284.
197. Wang JT, Wang TH, Sheu JC, Lin SM, Lin JT, Chen DS. 1992. Effects of anticoagulants and storage of blood samples on efficacy of the polymerase chain reaction assay for hepatitis C virus. *Journal of Clinical Microbiology*. 30:750-753
198. Whitehouse CA, Balbo PB, Pesci EC, Cottle DL, Mirabito PM, Pickett CL. 1998. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block. *Infection and Immunity*. 66: 1934–1940.
199. Wilson DL, Bell JA, Young VB, Wilder SR, Mansfield LS, and Linz JE. 2003. Variation of the natural transformation frequency of *Campylobacter jejuni* in liquid shake culture. *Microbiology*. 149:3603-3615.
200. Wilson IG. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:3741–3751
201. Wong TL, Hollis L, Cornelius A, Nicol C, Cook R. and Hudson JA. 2007. Prevalence, numbers and subtypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in uncooked retail meat samples. *Journal of Food Protection*. 70:566-573

202. Wonglumsom W, Vishnubhatla, Kim JM, and Fung DYC. 2001. Enrichment Media for Isolation of *Campylobacter jejuni* from Inoculated Ground Beef and Chicken Skin under Normal Atmosphere. *Journal of Food Protection*. 64: 630–634
203. Yates J. 2005 Traveler`s diarrhea. *Am. Fam Physician* 71:2095-2100
204. Young KT, Davis LM and DiRita VJ. 2007. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews, Microbiology*. Vol. 5.
205. Yu D, Kuipers JG. 2003. Role of bacteria and HLA-B27 in the pathogenesis of reactive arthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 29:21–36.
206. Zhao C, Ge B, de Villena J, Sudler R, Yeh E, Zhao S, White D, Wagner D, and Meng J. 2001. Prevalence of *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli* and *Salmonella* Serovars in Retail Chicken, Turkey, Pork, Beef from the Greater Washington, D.C. Area. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:5431-5436.
207. Ziprin RL, and Harvey RB. 2004. Inability of cecal microflora to promote reversion of viable nonculturable *Campylobacter jejuni*. *Avian Disease*. 48:647–650.

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

M. C. Luisa Yolanda Solís Soto

Candidato para el Grado de  
Doctor en Ciencias con Acentuación en Microbiología

Tesis: **PREVALENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE *Campylobacter jejuni* y *C. coli* AISLADOS DE ALIMENTOS Y HECES DE HUMANOS, MEDIANTE EL DESARROLLO DE UN MÉTODO RÁPIDO**

Campo de Estudio: Microbiología Sanitaria

Biografía:

Datos Personales: Nacida en Chihuahua, Chihuahua el 15 de febrero de 1979, hija de Luis Raúl Solís Vázquez y María Yolanda Soto Ruíz.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Chihuahua, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo con mención honorífica, segundo lugar de generación.

Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología.

Experiencia Profesional: Personal Profesional No docente de Tiempo Completo de la Universidad Autónoma de Nuevo León de 2001 al 2003. Investigador del Laboratorio de Bioquímica y genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología e Inmunología.

Profesor asociado a tiempo completo "A", de la Universidad Autónoma de Nuevo León, de 2003 a la fecha. Adscrito Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología e Inmunología.