



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**Evaluación de un método inmunológico alternativo para la detección de
Campylobacter spp. en heces de pollo**

Mauricio Antonio Castillo Jorquera

Proyecto de Memoria para optar al
Título Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal.
Financiamiento: FONDECYT
11110200

PROFESOR GUÍA: DRA. LISETTE LAPIERRE ACEVEDO
Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE
AÑO 2015



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**Evaluación de un método inmunológico alternativo para la detección de
Campylobacter spp. en heces de pollo**

Mauricio Antonio Castillo Jorquera

Proyecto de Memoria para optar al
Título Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal.
Financiamiento: FONDECYT
11110200

Nota Final(número).....(letras)....

Dra. Lisette Lapierre

Dr. Patricio Retamal

Dra. Pilar Oviedo

PROFESOR GUÍA: DRA. LISETTE LAPIERRE ACEVEDO
Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE
AÑO 2015

I. AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Quisiera dedicar esta página para agradecer a todas las personas que de una u otra manera me apoyaron durante el largo camino recorrido desde que entre el año 2008 a la carrera de Medicina Veterinaria, y que ahora puedo concluir felizmente como Médico Veterinario de la Universidad de Chile.

Primero que nada a mis padres por todo el apoyo, ayuda y energías que me han brindado desde que llegué a este mundo, y que siempre velaron porque solo me preocupara de estudiar, vivir mi vida tranquilamente y de nada más. Sin su apoyo en este largo camino recorrido, nada de lo que soy ahora lo hubiera podido lograr, convirtiéndose desde el primer momento en el pilar fundamental que me permite ahora titularme como Médico Veterinario. De esta manera, pueden quedarse tranquilos en que ya cumplieron con creces su tarea de ser padres, y que desde ahora, me toca devolverles la mano.

Acotando más el periodo de tiempo, quisiera agradecer a todos los amigos y amigas que he tenido a lo largo de mi periodo en la Universidad, tanto a aquellos que conocí durante el transcurso de las clases como en las “actividades extra programáticas” de la facultad, y que finalmente se volvieron un gran apoyo en el día a día de mi vida universitaria, como a mis amigos y amigas de Talca, con los cuales siempre pude juntarme cuando quería tomar un respiro de los estudios y de esta tan ajetreada ciudad de Santiago.

También a quién se ha vuelto una persona muy importante durante mi último periodo de trabajo en la tesis, mi polola, que me ha dado muchos ánimos y energías para seguir adelante y poder titularme.

Por último, pero no menos importante quisiera agradecer a todos los profesores y profesionales que me ayudaron en el desarrollo de la memoria de título, en especial a la Doctora Lisette Lapierre que siempre tuvo tiempo para revisar los avances de la tesis que le enviaba, además de responder siempre todas las dudas que tenía y recibirme sin ningún problema, y a todas las demás personas que me ayudaron con sus críticas y consejos para poder terminar la tesis de forma adecuada.

A todos las personas mencionadas ya sea directa o indirectamente en esta página de agradecimiento, les agradezco de todo corazón. どもありがとうございました!!!
(Muchas gracias!!!).

II. INDICE DE CAPITULOS

1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	2
- 2.1 Importancia de las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos.....	2
- 2.2 Descripción de la bacteria <i>Campylobacter</i> spp.....	2
- 2.3 Infección por <i>Campylobacter</i> spp. en humanos.....	3
- 2.4 Métodos de detección de <i>Campylobacter</i> spp.....	5
- 2.4.1 Método de referencia para el diagnóstico de <i>Campylobacter</i> spp. en muestras de heces.....	5
- 2.4.2 Método alternativo para la detección de <i>Campylobacter</i> spp. en muestras de heces.....	6
- 2.5 Comparación del método alternativo y método tradicional.....	6
3. OBJETIVOS.....	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	13
6. PROTOCOLO DE BIOSEGURIDAD.....	15
7. RESULTADOS.....	16
8. DISCUSION.....	18
9. CONCLUSIONES.....	27
10. BIBLIOGRAFÍA.....	28
11. ANEXOS.....	35

III. INDICE DE TABLAS

- Tabla nro. 1: Tabla de contingencia 2 x 2.....13
- Tabla nro. 2: Resultados 120 muestras cecales analizadas por ambos métodos.....16
- Tabla anexa nro. 1: Tabla que permite interpretar el grado de acuerdo entre dos observadores (adaptada desde Landis y Koch (1977)).....35
- Tabla anexa nro. 2: Resultados obtenidos a partir del análisis de las muestras cecales de pollos broilers a través del método de referencia (MR) y el método alternativo (MA).....35

IV. INDICE DE FIGURAS

- Figura nro. 1: Imagen anexa número I: Rutas de transmisión de *Campylobacter* spp. desde el medio ambiente y los alimentos hacia el ser humano.....39
- Figura nro. 2: Imagen anexa número II: Imagen ilustrativa del dispositivo *Merck Singlepath® Direct Campy Poultry Kit*, en donde se destacan las zonas 1, 2, 3 y 4 explicadas en la memoria de título.....40

V. RESUMEN EJECUTIVO

El objetivo de este estudio fue comparar el método alternativo *Merck Singlepath® Direct Campy Poultry kit* contra el método de referencia (cultivo en placa) descrito por la OIE para la detección de *Campylobacter* spp. en muestras cecales de pollo, con el fin de evaluar el grado de concordancia que existe entre ambos métodos.

Para ello, se obtuvieron 130 intestinos de pollo desde una planta faenadora de la Región Metropolitana. En una primera etapa, se evaluó la capacidad de detección del método alternativo respecto de *Campylobacter* spp., para lo cual, 10 muestras cecales de pollo fueron contaminadas con la cepa *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 a una concentración de 9×10^8 UFC por gramo de contenido cecal (control positivo), mientras que 10 muestras de agua peptonada fueron contaminadas con la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 a una concentración de 9×10^8 UFC por mL de agua peptonada (control negativo). En una segunda etapa, se analizaron las restantes 120 muestras cecales de pollo a través del método de referencia y por medio del método alternativo, en donde posteriormente se analizaron los resultados de la segunda etapa por medio de los métodos estadísticos McNemar y *Kappa* (κ).

Los resultados de la primera etapa arrojaron que el *kit* efectivamente detecta *Campylobacter jejuni* (control positivo) y no otra bacteria como *Escherichia coli* (control negativo) a partir de una determinada concentración. Por otra parte, los resultados de la segunda etapa mostraron que no hubo diferencias significativas entre las mediciones realizadas por ambos métodos respecto de una misma muestra ($p > 0,05$), mientras que a través del método estadístico *Kappa*, se pudo determinar que los resultados entregados por el método alternativo son equivalentes a los que entregaría el método de referencia para muestras de heces de pollo, por lo que el método alternativo desarrollado por *Merck* puede efectivamente ser utilizado previo al sacrificio de pollos para identificar lotes de aves que estén altamente infectados con *Campylobacter* spp. a una concentración igual o mayor a 3×10^7 UFC por gramo de heces.

Palabras claves: Método de referencia, método alternativo, *Campylobacter* spp.

V. SUMMARY

The aim of this study was to compare the *Merck Singlepath® Direct Campy Poultry kit* alternative method against the reference method (plate culture) described by the OIE for the detection of *Campylobacter* spp. in chicken cecal samples in order to assess the degree of concordance between both methods.

For this, 130 intestines were obtained from a chicken slaughterhouse located in the Metropolitan Region. In a first step, the detection capability of the alternative method for *Campylobacter* spp. was assessed, for which 10 chicken cecal samples were contaminated with *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 strain at a concentration of 9×10^8 CFU per gram of cecal content (positive control), while 10 samples of peptone water were contaminated with *Escherichia coli* ATCC 25922 strain at a concentration of 9×10^8 CFU per ml of peptone water (negative control). In a second step, the remaining 120 chicken cecal samples were analyzed by the reference method and by the alternative method. Subsequently the results of the second stage were analyzed by statistical methods McNemar and *Kappa* (κ).

The results showed that in the first stage the 10 samples used as positive control were all positive by the alternative method, while in the 10 samples used as negative control, there was no *Escherichia coli* bacteria detected. Moreover, the results of the second stage showed that there were no significant differences between the measurements made by both methods within a single sample ($p > 0.05$), while using the statistical method *Kappa* determined that the results provided by the alternative method are equivalent to those that would provide the reference method for chicken fecal samples. Then, the alternative method developed by *Merck* can effectively be used prior to slaughter chickens to identify lots of batches that are highly infected with *Campylobacter* spp. at a concentration equal or greater than 3×10^7 CFU per gram of feces.

Key words: Reference method, alternative method, *Campylobacter* spp.

1. INTRODUCCIÓN

Con el fin de garantizar adecuados estándares de inocuidad en los alimentos, es que se han desarrollado pruebas tanto para evaluar la calidad microbiológica de estos productos, como para determinar la cantidad de patógenos presentes en las especies productivas o en las materias primas con las que se producen los alimentos destinados a consumo humano, siendo tanto las empresas del rubro como los organismos fiscalizadores, los mayores interesados en determinar el estatus microbiológico de los alimentos y/o de los animales destinados a consumo humano. Sin embargo, muchos de los métodos microbiológicos tradicionales usualmente demoran varios días y consumen muchos recursos antes de entregar resultados respecto a alguna muestra en particular. Este es el caso de *Campylobacter* spp., uno de los patógenos zoonóticos más prevalentes en el mundo y que su detección por técnicas de microbiología tradicional se realiza en aproximadamente 6 días.

Por lo anterior, con el fin de obtener resultados más rápidos y eficientes que los métodos clásicos de aislamiento microbiológico, se ha buscado desarrollar métodos alternativos que puedan entregar resultados de presencia/ausencia y/o de la cantidad de patógenos presentes en diferentes matrices en un menor tiempo, con resultados confiables y con menores costos. Esta es una necesidad que los productores de pruebas diagnósticas pretenden solucionar por medio del desarrollo de nuevos productos para cumplir dichos requerimientos. Sin embargo, estos nuevos métodos alternativos deben ser evaluados en cuanto a sus características analíticas y demostrar que son equivalentes a los métodos de referencia establecidos, además de reunir las características deseadas por los clientes, como rapidez, facilidad de uso y menor costo, entre otros. Para dicho proceso, existen distintas normas internacionales y parámetros estadísticos que permiten comparar un método de referencia contra un método alternativo utilizado en un laboratorio en particular.

Dado los antecedentes mencionados, el objetivo de esta memoria es evaluar el dispositivo “*Merck Singlepath® Direct Campy Poultry Kit*” para la detección de *Campylobacter* spp. en heces de pollo, mediante la comparación de los resultados obtenidos entre el método alternativo y el método tradicional para el aislamiento de este patógeno.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importancia de las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) son una amenaza importante para la salud pública mundial, las cuales pueden ser definidas como “enfermedades comúnmente transmitidas a través de la ingesta de alimentos y que son causadas por patógenos microbiológicos, contaminantes químicos, parásitos y biotoxinas” (OMS, 2008). Cifras provenientes de Estados Unidos, indican que anualmente en dicho país alrededor de 48 millones de personas se enferman debido al consumo de alimentos contaminados con diversos patógenos (CDC, 2014a), mientras que en la Unión Europea las cifras alcanzan las 320.000 personas (EFSA, 2014a), aunque en ambos casos se cree que las cifras son mucho mayores debido a la subnotificación de los casos. Cabe destacar que en base a los casos notificados, la infección por *Campylobacter* spp. es clasificada como la mayor causante de enfermedades gastrointestinales transmitidas a través de los alimentos en los países industrializados (Wingstrand, 2006; Mylius *et al.*, 2007 citado por Al-Sakkaf, 2013a), afectando aproximadamente a 1,3 millones de personas en Estados Unidos (CDC, 2014b) y sobre 190.000 personas en la Unión Europea (EFSA, 2014b). Esta infección bacteriana ha sido asociada principalmente al consumo de carne de pollo y productos derivados (crudos o poco cocinados) como las principales fuentes de infección en pacientes humanos (Wingstrand, 2006; Al-Sakkaf, 2013a; Pérez y Kienesberger, 2013; ISPCH, 2014).

En relación a lo anterior, se debe tener en cuenta la importancia de la carne de pollo para la subsistencia de la población en general, dado que es una de las principales fuentes de proteínas consumidas en el mundo. La producción global durante el año 2013 fue de aproximadamente 84 millones de toneladas, lo que corresponde al 32,8% de la carne total producida a nivel mundial, y su consumo fue cercano a los 82,5 millones de toneladas, representando el 33,5% del total de carnes consumidas globalmente (USDA, 2014).

2.2 Descripción de la bacteria *Campylobacter* spp.

Las especies correspondientes al género *Campylobacter* spp. se caracterizan por ser bacilos curvos Gram negativos, móviles, que poseen un flagelo polar presente en uno o ambos extremos, y que crecen en condiciones de microaerofilia, es decir, requieren oxígeno para sobrevivir pero en concentraciones mucho más bajas que las encontradas en la atmósfera,

necesitando típicamente de un 5 – 10% de oxígeno y entre 1 – 10% de CO₂ (Percival y Williams, 2014).

Se ha estimado que en la Unión Europea *Campylobacter* spp. es altamente prevalente entre los lotes de pollos broilers poco antes de ser sacrificados, resultando ser positivos a dicha bacteria un promedio de 60 a 80% de la totalidad de las aves (Evans y Powell, 2008; Hermans *et al.*, 2011) destacando que las principales especies aisladas de *Campylobacter* spp. desde los pollos corresponden a *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*, las cuales se diferencian de otras especies por su crecimiento a temperaturas de 42 – 43 °C, siendo *C. jejuni* la especie que mayormente se aísla desde las aves previamente mencionadas (Evans y Powell, 2008). En humanos, *C. jejuni* y *C. coli* son las especies más frecuentemente aisladas en los casos de zoonosis alimentarias reportadas a nivel mundial (Maurtua-Neumann y Oberhelman, 2013), estimándose que un 90% de los casos de campilobacteriosis son debido a *C. jejuni* y el restante 10% son producidas por *C. coli* (Wilson *et al.*, 2008 citado por Janez y Loc-Carrillo, 2013).

2.3 Infección por *Campylobacter* spp. en pacientes humanos

La transmisión de *Campylobacter* spp. hacia la población puede ocurrir a través de la ingesta de agua contaminada, leche sin pasteurizar, contacto oral directo con heces de animales y, en raras ocasiones, por contacto con personas infectadas, entre otras (imagen anexa número I) (Pérez y Kienesberger, 2013). Sin embargo, la principal vía de transmisión es a través del consumo de carne de pollo cruda o poco cocinada (Al-Sakkaf, 2013a; Pérez y Kienesberger, 2013). Otra importante forma de transmisión del patógeno es a través de la contaminación cruzada que puede producirse durante la preparación de los alimentos (Cogan *et al.*, 2002 citado por Pérez y Kienesberger, 2013; French, 2008 citado por Al-Sakkaf, 2013b), la cual es la transferencia de bacterias directa o indirectamente desde un alimento contaminado a uno no contaminado durante la preparación de los mismos (Al-Sakkaf, 2013b). Una vez ingerida la bacteria, esta puede establecerse como una infección subclínica, pero frecuentemente causa una gastroenteritis que es denominada campilobacteriosis, y que tiene un rango de síntomas clínicos que van desde una infección gastrointestinal auto limitada hasta una severa diarrea sanguinolenta y, ocasionalmente, ocurren complicaciones como septicemia, artritis reactiva o neuropatías autoinmunes como

el Síndrome de Guillan-Barré (Al-Sakkaf, 2013a; Pérez y Kienesberger, 2013; Percival y Williams, 2014).

Los mecanismos mediante los que *Campylobacter* spp. causa la enfermedad gastrointestinal son multifactoriales y complejos, pero se ha identificado que involucran diversos factores de virulencia tales como: la capacidad de movimiento (motilidad), la habilidad para adherirse e invadir las células del hospedero, la capacidad para evadir la respuesta inmune, la capacidad de inducir la muerte celular de las células del hospedero y la producción de toxinas (Percival y Williams, 2014). Cabe destacar, que se ha establecido que concentraciones tan bajas como 500 células de *Campylobacter* spp son capaces de producir la enfermedad en humanos (Rauta *et al.*, 2012).

En países desarrollados, las infecciones por *Campylobacter* spp. usualmente producen una enfermedad gastrointestinal que es indistinguible de las enfermedades causadas por otras bacterias entéricas, tales como *Salmonella* y *Sisella*, teniendo usualmente un comienzo de forma abrupta con calambres abdominales y diarrea (Allos y Lastovica, 2011). Sin embargo, casi la mitad de los pacientes infectados con *Campylobacter* spp. y que buscan atención médica en estos países presentan diarrea sanguinolenta, mientras que en países en vías de desarrollo, la diarrea usualmente no contiene sangre (Allos y Lastovica, 2011). El costo estimado que significa para los distintos países los cuadros de campilobacteriosis es alto. Un ejemplo es Nueva Zelanda, donde se gastan aproximadamente 55 millones de dólares (Al-Sakkaf, 2013a), en Estados Unidos unos 1700 millones de dólares (Janez y Loc-Carrillo, 2013; Nadeem, 2013), y en la Unión Europea se estima que los costos de la verdadera incidencia de infecciones asociadas a *Campylobacter* spp. sería de 2.4 billones de euros (EFSA, 2011).

Debido a estos antecedentes y a la importancia de *Campylobacter* spp. en la salud pública, es que se vuelve crucial disminuir la incidencia de campilobacteriosis en la población. Para esto, un primer paso es conocer y evaluar el grado de portación que presentan las aves comerciales previo a su faenamiento, con el fin de poder adoptar, ya sea en las plantas faenadoras o procesadoras de carne de pollo medidas adecuadas para prevenir, evitar y/o disminuir el traspaso de estas bacterias hacia la carne y, de ésta forma, evitar su ingesta por parte de la población. Una medida técnica adoptada por otros países es establecer en las

aves su nivel de contaminación previo al faenamiento y, entonces, faenar en forma diferencial aves que no presenten contaminación con *Campylobacter* spp. de aquellas en las que efectivamente la bacteria se encuentra presente en sus intestinos (Silva *et al.*, 2011).

2.4 Métodos de detección de *Campylobacter* spp.

Muchas herramientas diagnósticas como el cultivo microbiológico en placa, pruebas de Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas (ELISA), Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), entre otros, son aplicados por los laboratorios para resguardar la calidad microbiológica de los alimentos, siendo el cultivo en placa el método de referencia o *gold standard* para el diagnóstico de *Campylobacter* spp. (Allos y Lastovica, 2011; Tram *et al.*, 2012). Dicho método microbiológico permite el aislamiento de bacterias viables, y por lo tanto, capaces de producir la enfermedad en condiciones adecuadas. Sin embargo, éste tipo de método diagnóstico tiene algunas desventajas, como la gran cantidad de tiempo que se requiere desde la toma de muestras hasta la obtención de los resultados, los costos implicados en la compra y mantenimiento de insumos y equipos, y la necesidad de contar con personal calificado, entre otros (Jasson *et al.*, 2010). Para subsanar dichas desventajas, es que se han desarrollado a nivel comercial métodos que buscan entregar los mismos o mejores resultados que el método de referencia correspondiente, y que se caracterizan por entregarlos en un menor periodo de tiempo, de manera más fácil y con menores costos operativos, los cuales reciben la denominación de métodos alternativos (Jasson *et al.*, 2010). Para poder utilizarlos, éstos deben ser validados, o por otra parte, comparados contra el correspondiente método de referencia, con el fin de demostrar que son tan efectivos como este último, además de entregar las características adicionales deseadas en un método diferente al tradicional.

2.4.1 Método de referencia para el diagnóstico de *Campylobacter* en muestras de heces

Existen distintas normas que establecen la forma en cómo se desarrolla el método microbiológico de detección de *Campylobacter* spp. en muestras de heces de animales. Una de ellas es la descrita por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), en la cual se utilizan agares selectivos que son a base de sangre o carbón, siendo el agar modificado con deoxicolato, cefoperazona y carbón (mCCDA) el recomendado para el aislamiento selectivo de *Campylobacter* spp. Además, se requiere una atmósfera microaerofílica, con

concentraciones de 5 a 10%, tanto para oxígeno como para dióxido de carbono, y una temperatura de incubación de 42 °C durante un periodo de 48 horas (OIE, 2008).

2.4.2 Método alternativo para la detección de *Campylobacter* spp. en muestras de heces

Con el fin de identificar en las aves comerciales (previo al faenamiento) la portación de *Campylobacter* spp., se desarrolló por parte de la empresa *Merck Millipore* el “*Merck Singlepath® Direct Campy Poultry Kit*”, un dispositivo que detecta la presencia de *Campylobacter* spp. en heces de pollo desde una concentración igual o superior a 3×10^7 UFC por gramo de muestra. Este método fue desarrollado bajo la tecnología inmunológica de flujo lateral, detectando el patógeno por medio del uso de anticuerpos monoclonales ligados a oro. En caso que *Campylobacter* spp. se encuentre presente en la muestra sobre el límite de detección, se formará una línea roja en la llamada “zona de unión”. El procedimiento básicamente es el siguiente: se agregan 160 µL de la muestra procesada en uno de los extremos del dispositivo (destinado a este propósito) que corresponde a la zona uno (imagen anexa número II), desde donde difundirá a una segunda zona donde se encuentran anticuerpos ligados a oro específicos contra *Campylobacter* spp., formándose complejos antígeno-anticuerpo. Estos últimos continuarán difundiendo hacia una tercera zona en donde los complejos se unirán a un segundo anticuerpo específico a *Campylobacter* spp., los que se encuentran fijados en dicha zona. Si las concentraciones de *Campylobacter* spp. en heces de pollos se encuentran sobre 3×10^7 UFC se formará una línea roja, mientras que si dicha concentración es menor, no se observará dicha coloración. El remanente de la muestra continúa migrando hacia la zona de control y se liga a un tercer anticuerpo específico que se une al anticuerpo contra *Campylobacter* spp., formándose una línea roja, que indicará que el dispositivo funciona correctamente (John *et al*, 2013).

2.5 Comparación del método alternativo y método tradicional

Dado que el proceso de validación de un método alternativo corresponde a un proceso complejo, el cual implica una gran cantidad de tiempo y recursos, no siendo posible realizarlo en nuestro laboratorio, y que además requiere de pruebas realizadas por laboratorios externos, es que en este estudio se comparará el dispositivo “*Merck Singlepath® Direct Campy Poultry Kit*” contra el método de referencia de aislamiento de

Campylobacter spp., descrito por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) en muestras de heces de pollos, para poder establecer si los resultados entregados por el método alternativo son equivalentes a los del método de referencia. La utilización de esta técnica de detección de lotes de aves portadoras de *Campylobacter* spp. podría servir a la industria avícola para diferenciar animales altamente infectados de otros con menor grado de portación, y de esta manera, prevenir, evitar y/o controlar la contaminación cruzada de las canales de pollo producidas con la bacteria *Campylobacter* spp, en las plantas faenadoras.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar el grado de concordancia entre el método alternativo “*Merck Singlepath® Direct Campy Poultry Kit*” y el método tradicional de cultivo en placa, para detectar la presencia de *Campylobacter* spp., en heces de pollos provenientes de una planta faenadora de la Región Metropolitana.

3.2 Objetivos específicos

1. Realizar el aislamiento de *Campylobacter* spp en heces de pollo mediante metodología de referencia.
2. Detectar la presencia de *Campylobacter* spp. en heces de pollo mediante el método alternativo.
3. Comparar los resultados obtenidos entre el método alternativo y el método de referencia, mediante la asociación estadística de dichos resultados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Método de referencia

El método de referencia escogido corresponde al descrito por la OIE para la detección de *Campylobacter* spp., el cual se describe a continuación: con un asa se toma una alícuota de la muestra y se siembra directamente mediante diseminación sobre el medio selectivo mCCDA (Oxoid®), incubándose en condiciones de microaerofilia a una temperatura de 42°C por 48 horas. En caso de la presencia de colonias sospechosas de *Campylobacter* spp., se debe recolectar una colonia y observarla “en fresco” bajo el microscopio, en donde se debe distinguir la forma y la motilidad característica de la bacteria, para posteriormente aplicar la tinción de Gram. Luego, las colonias sospechosas son sembradas en placas de agar sangre e incubadas bajo las mismas condiciones previamente descritas. Finalmente, se confirma la presencia de *Campylobacter* spp. mediante pruebas bioquímicas, tales como la prueba de detección de oxidasa y la hidrólisis de hipurato (OIE, 2008).

4.2 Método alternativo

El dispositivo “*Merck Singlepath® Direct Campy Poultry kit*” está compuesto por los siguiente elementos: 10 dispositivos *Singlepath® Direct Campy Poultry* basados en la tecnología inmunológica de flujo lateral descrita en el punto 2.4.2, una botella de 100 mL de diluyente para muestras, una botella de 1 mL de *buffer* para las muestras, un pack de 10 tubos de dilución de 30 mL cada uno, un pack de 10 tubos para muestra de 1,5 mL cada uno y un pack 10 pipetas de transferencia de 3 mL cada una.

Para realizar la detección de *Campylobacter* spp. por medio de este método, se agrega 1 gramo de muestra en el tubo de dilución del *kit*, y luego 9 mL del diluyente de muestra mezclándolos vigorosamente y dejando luego que sedimente por 10 minutos. Posteriormente se remueve 1 mL del sobrenadante y se agrega a un tubo de muestras. Para inactivar las bacterias presentes en el sobrenadante, el tubo se incuba a 95 °C durante 15 minutos. Una vez que el tubo se ha enfriado a temperatura ambiente, se adicionan 50 µL del *buffer* y se mezclan vigorosamente para luego dejarlo sedimentar durante 10 minutos. Finalmente, se extraen y aplican 160 µL del sobrenadante al dispositivo de detección, esperando 20 minutos para leer el resultado.

4.3 Obtención de las muestras

Las muestras de heces, las cuales corresponderán al contenido cecal de las aves, fueron obtenidas desde una planta faenadora de pollos broilers ubicada en la Región Metropolitana. Para ello, se muestrearon aleatoriamente 130 aves inmediatamente después de faenadas, a partir de las cuales se obtuvieron sus intestinos. Estos fueron almacenados en bolsas estériles para toma de muestras y mantenidos a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ para su posterior traslado al laboratorio.

4.3.1 Procesamiento de las muestras

De las 130 muestras obtenidas desde el ciego de las aves, diez fueron contaminadas artificialmente con la cepa *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 para ser utilizadas como control positivo, y las restantes 120 muestras fueron analizadas sin contaminar (muestras naturalmente contaminadas o no contaminadas artificialmente). Como control negativo, se utilizó la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 la que fue inoculada en 10 muestras de agua peptonada.

a) Contaminación experimental de las muestras con la cepa *C. jejuni* ATCC 33560 como control positivo

Las muestras fueron contaminadas artificialmente con la cepa *C. jejuni* ATCC 33560 a una concentración final de 9×10^8 UFC por gramo de heces. Dicha concentración se determinó mediante la comparación de la turbidez obtenida una vez reactivada la cepa *C. jejuni* ATCC 33560 (según las indicaciones del fabricante) contra el tubo estándar de turbidez 3 Mc Farland (9×10^8 UFC/mL), correspondiente a una absorbancia de 0,38 – 0,42, leída a 625 nm en un espectrofotómetro.

Como la totalidad de las muestras fueron contaminadas artificialmente con una concentración mayor al límite de detección del método alternativo, se esperaba que todas ellas resultaran positivas. En caso de que se hubiera producido algún caso negativo, se debería haber analizado la causa de dicho resultado y haber vuelto a repetir el trabajo.

b) Contaminación experimental con la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 como control negativo

Como control negativo se reactivó la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 a una concentración de 9×10^8 UFC/mL equivalente al estándar de turbidez 3 McFarland (9×10^8 UFC/mL), correspondiente a una absorbancia de 0,38 – 0,42, leída a 625 nm en un espectrofotómetro, la cual posteriormente fue inoculada en cada una de las 10 muestras de agua peptonada.

En este caso, se esperaba que las 10 muestras de agua peptonada contaminadas con la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 y analizadas por el método alternativo resultaran negativas. En caso de que se hubiera producido algún caso positivo, se debería haber evaluado la razón de dicho resultado y haber repetido el trabajo.

Cabe destacar, que las 10 muestras utilizadas como control positivo y las 10 muestras utilizadas como control negativo, fueron analizadas solo a través del método alternativo. Esto último es debido a que dichas muestras fueron contaminadas con concentraciones definidas de *Campylobacter jejuni* (para el control positivo) y de *Escherichia coli* (para el control negativo) muy altas (9×10^8 UFC por gramo/ml de muestra), por lo que todas las muestras resultarían positivas al ser cultivadas en placa. Además, lo que se busca con este método de diagnóstico alternativo no es detectar bacterias vivas, por lo que en esta primera etapa no sería de utilidad el cultivo de las mismas. Por otra parte, las 120 muestras de heces que no fueron contaminadas artificialmente fueron analizadas por ambos métodos para poder realizar la comparación estadística entre ellos.

La elección de utilizar agua peptonada como control negativo fue debido a que se prefirió este tipo de matriz dada la alta prevalencia que se observa de *Campylobacter* spp. en las aves en general. Una opción habría sido tratar pollos con antibióticos, pero esto implicaría haber tenido que comprar aves y mantenerlas, lo que aumentaría mucho los costos, y además el utilizar antibióticos en aves sanas, favorecería la contaminación innecesaria del medioambiente con residuos de antibióticos.

4.4 Preparación de los inóculos para la contaminación experimental

4.4.1 Cepa de *C. jejuni* ATCC 33560

Para la reactivación de la cepa *C. jejuni* ATCC 33560, el liofilizado fue rehidratado con 1 mL de caldo tripticasa de soya y luego se transfirió a 4 mL del mismo caldo. Posteriormente, se inoculó una placa de agar tripticasa soya a 37 °C bajo condiciones de microaerofilia por 48 horas. Tras la incubación, se traspasaron cinco colonias a 10 mL de caldo tripticasa soya y se incubaron a 37 °C hasta alcanzar una turbidez visible que se ajustó al estándar 3 McFarland (9×10^8 UFC/mL), correspondiente a una absorbancia de 0,38 – 0,42, leída a 625 nm en un espectrofotómetro.

4.4.2 Cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922

Para la reactivación de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, el liofilizado fue rehidratado de la misma forma descrita para la cepa *C. jejuni* ATCC 33560, pero el cultivo de las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 en agar tripticasa de soya fue a una temperatura de 37°C por 24 horas y bajo condiciones de aerobiosis. Posteriormente, con un asa estéril se traspasaron cinco colonias a 10 mL de caldo tripticasa soya y se incubaron a 37°C hasta alcanzar una turbidez visible, la cual se ajustó al estándar 3 McFarland (absorbancia de 0,38 – 0,42 a 625 nm en un espectrofotómetro).

4.5 Análisis de las muestras de contenido cecal de pollos sin contaminación artificial tanto por el método tradicional como por el método alternativo

Cada una de las 120 muestras obtenidas desde el contenido cecal de las aves y que no fueron contaminadas artificialmente, fueron analizadas tanto por el método tradicional como por el método alternativo de la forma que se describe en el punto 4.1 para el método tradicional y en el punto 4.2 para el método alternativo, en forma paralela. Cabe detallar que para el método tradicional se tomó una alícuota de la muestra cecal y se sembró directamente sobre la placa con agar mCCDA, y se siguieron las indicaciones del procedimiento descrito anteriormente, mientras que para el método tradicional se tomó un gramo de la misma muestra y fue procesada y analizada de la forma que estipula el fabricante, también descrita previamente.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos a través de ambos métodos respecto de las 120 muestras cecales no contaminadas artificialmente, fueron analizados por medio de dos métodos estadísticos: el índice de McNemar y el índice *Kappa* (κ). El primer estadístico (McNemar) permite evaluar si hay diferencias significativas en las mediciones realizadas entre el método de referencia y el método alternativo respecto de muestras relacionadas (Wassertheil-smoller y Smoller, 2015), mientras que el segundo método estadístico (*Kappa*) descrito por Cohen (1960), permite determinar el grado de concordancia que existe entre dos observadores (Yang y Zhou, 2014), en este caso, entre el método alternativo y el método de referencia. A través de esta última herramienta estadística, se pudo evaluar si los resultados obtenidos por medio del método alternativo son equivalentes a los que se obtuvieron a través del método de referencia.

Para poder realizar los cálculos necesarios en los métodos estadísticos antes mencionados, los resultados de las 120 muestras no contaminadas artificialmente fueron ingresados a una tabla de contingencia de 2 x 2, como la que se muestra a continuación:

Tabla nro. 1: Tabla de contingencia 2 X 2

		Método de referencia		Total
		Positivo	Negativo	
Método alternativo	Positivo	a	b	$e_1 = a + b$
	Negativo	c	d	$e_2 = c + d$
Total		$f_1 = a + c$	$f_2 = b + d$	$n = a + b + c + d$

En el caso del estadístico McNemar, éste fue calculado por medio del software estadístico InfoStat®, en donde se evaluó si existen diferencias significativas entre las mediciones realizadas por los métodos diagnósticos descritos en esta memoria de título respecto de la presencia o ausencia de *Campylobacter* spp. en las muestras. La fórmula del estadístico McNemar es la siguiente:

$$x^2 = \frac{(b-c)^2}{(b+c)}$$

En donde no hay diferencias significativas en caso que p sea > a 0,05 y si las hay en caso que p sea < a 0,05.

Por otra parte, para obtener el índice *Kappa*, se consideró la proporción de acuerdos observados (P_o) y la proporción de acuerdos esperados en la hipótesis de independencia entre los observadores, es decir, de acuerdos debidos al azar (P_e). El resultado obtenido fue corregido por el grado de acuerdo debido al azar para obtener el índice κ , cuyos valores pueden ir desde -1 hasta +1, siendo los valores obtenidos en esta memoria de título interpretados según la escala de valoración propuesta por Landis y Koch (1977) (cuadro anexo número I).

La fórmula para obtener el índice *Kappa* es expresada de la siguiente forma:

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

donde P_o son los acuerdos observados y P_e los acuerdos debido al azar. (Yang y Zhou, 2014). Dichos valores se obtienen a partir de la tabla de concordancia 2 x 2 anteriormente mencionada. En relación a esto, P_o se calcula en base a la siguiente formula:

$$P_o = \frac{(a + d)}{n}$$

y P_e de acuerdo a lo siguiente:

$$P_e = \frac{\left(\frac{f_1 \times e_1}{n} \right) \times \left(\frac{f_2 \times e_2}{n} \right)}{n}$$

6. PROTOCOLO DE BIOSEGURIDAD

El protocolo de bioseguridad bajo el cual se realizó el trabajo en laboratorio, corresponde al descrito en el “Manual de Normas de Bioseguridad FONDECYT - CONICYT” (CONICYT, 2008), para manipular de forma adecuada y segura las cepas de *Campylobacter* spp. y *Escherichia coli*, que están clasificadas como bacterias de riesgo nivel 2 y nivel 1 respectivamente.

7. RESULTADOS

7.1 Muestras utilizadas como control positivo

La totalidad de las muestras resultaron ser positivas al método alternativo, lo que demuestra que el *kit* efectivamente identifica como positivas muestras de heces contaminadas con *Campylobacter jejuni* a una concentración determinada previamente.

7.2 Muestras utilizadas como control negativo

Todas las muestras fueron negativas al método alternativo. Con esto se pudo demostrar que el dispositivo es específico para identificar el género *Campylobacter* spp., al no entregar como positivas muestras que se encontraban contaminadas con una bacteria tan común en el intestino de las aves como lo es *Escherichia coli*.

7.3 Muestras sin contaminar artificialmente analizadas por ambos métodos

Los resultados en su totalidad son mostrados en la tabla anexa número II y son resumidos en la siguiente tabla de contingencia:

Tabla nro. 2: Resultados del análisis de 120 muestras analizadas por ambos métodos.

		Método de referencia		Total
		Positivo	Negativo	
Método alternativo	Positivo	41	5	46
	Negativo	4	70	74
Total		45	75	120

Los datos presentados en esta tabla fueron analizados por el método estadístico McNemar y por el método estadístico *kappa*. En el primer caso, se obtuvo un $p = 0,11$, por lo que se concluye que no hay diferencias significativas entre las mediciones realizadas entre el método de referencia y el método alternativo, mientras que el estadístico *kappa* arrojó un valor de 0.846, lo que según la escala de Landis y Koch (1977) presentada en la tabla anexa número I, indica que entre el método de referencia y el método alternativo existe una concordancia casi perfecta. Esto último, se traduce en que los resultados entregados por el

método alternativo son equivalentes a aquellos que entregaría el método de referencia al analizar muestras de heces de pollo, por lo que efectivamente el método alternativo puede ser utilizado previo al sacrificio de las aves para saber que lotes se encuentran contaminados con *Campylobacter* spp. a una concentración igual o superior a 3×10^7 UFC por gramo muestra.

7.4 Análisis de resultados discrepantes

7.4.1 Positivo al método de referencia y negativo al método alternativo

Estos resultados se pueden deber a que el método de referencia detecta concentraciones menores a las que puede detectar el método alternativo, ya que a través del cultivo en placa se pueden identificar como positivas muestras cecales con niveles tan bajos de contaminación como 10 UFC por gramo de contenido cecal (límite de detección del método de cultivo en placa), según Rodjers y colaboradores (2010), por lo que la explicación más probable es que las muestras cecales en estos casos contenían una concentración menor a 3×10^7 UFC de *C. jejuni* por gramo de contenido cecal, concentración bajo el límite de detección del método alternativo pero superior al límite de detección del método tradicional.

7.4.2 Negativo al método de referencia y positivo al método alternativo

Cinco muestras fueron negativas al método de referencia pero positivas al método alternativo, esta diferencia podría deberse a que el método alternativo es un método inmunológico, y que por ende (como se explicó en el punto 2.4.2) detecta los antígenos presentes en la bacteria a través la unión con los anticuerpos específicos contra *Campylobacter* spp., que se encuentran en el dispositivo desarrollado por Merck. Una posibilidad es que si las muestras contenían cepas muertas o demasiado dañadas para desarrollarse, los antígenos fueron igualmente detectados por el método alternativo, pero las bacterias no pudieron crecer en el agar mCCDA, y por lo tanto, no pudieron ser detectadas por el método de referencia. Por otra parte, existe la posibilidad que *Campylobacter* spp. se haya encontrado en un estado llamado “forma no cultivable pero viable” (VBNC por sus siglas en inglés) el que cual se induce bajo condiciones desfavorables (Kvalsvig *et al.*, 2014), siendo posible detectar *Campylobacter* spp. a través

del método alternativo pero no por medio del método de referencia, ya que no crecerá estando en dicho estado.

8. DISCUSION

Una vez establecido que el método alternativo *Merck Singlepath® Direct Campy Poultry Kit* analizado en esta memoria de título es equivalente al método de referencia, y por lo tanto, los resultados que entrega son prácticamente los mismos que arroja el cultivo en placa respecto de *Campylobacter* spp. a partir de heces de pollos, se establece que el método alternativo podría ser utilizado para identificar aquellos lotes de aves que se encuentren infectados con *Campylobacter* spp. en una concentración igual o superior a 3×10^7 UFC por gramo de heces, en etapas previas a la faena.

Una vez obtenida la información respecto a un lote en particular a través del método alternativo, se podrían evaluar y/o considerar ciertas medidas tanto de tipo logístico como operacional a nivel de planta faenadora, con el fin de lograr una disminución de las concentraciones de *Campylobacter* spp. sobre las canales de pollos (Normand *et al.*, 2008), permitiendo de esta manera, un traspaso menor de la bacteria hacia la población en general. Cabe destacar, que debido a que las aves comerciales están bajo una constante presión de infección por parte de distintos patógenos a nivel de granja, es que las medidas de bioseguridad a nivel de productor primario no son suficientes por si solas para solucionar el problema de la contaminación de las canales de pollo con *Campylobacter* spp. (Hermans *et al.*, 2011). Por esto, se vuelve aún más importante tomar distintas medidas a lo largo de la cadena alimentaria, como por ejemplo a nivel de planta faenadora, con el fin de cumplir el objetivo antes mencionado de disminuir la carga bacteriana de *Campylobacter* spp. que finalmente llega a los consumidores.

Algunas de las medidas que podrían ser llevadas a cabo a nivel de dichas instalaciones son las siguientes: el sacrificio logístico o diferenciado (*logistic slaughter*), la prevención y/o reducción de la contaminación con heces sobre las canales de las aves, la descontaminación del tanque de escaldado, el enfriado o congelamiento de los productos a base de carne de pollo, el tratamiento de las canales con productos químicos, la irradiación de los productos finales, entre otros (Havellar *et al.*, 2007). Cabe destacar, que las medidas a implementar dependerán de los criterios, posibilidades y estado actual de cada planta en particular.

8.1 Faenamiento logístico o diferenciado

Consiste en evaluar (por algún método diagnóstico) si las aves, previo a la faena, resultan o no ser positivas a *Campylobacter* spp. y de esta manera, identificar y posteriormente separar los lotes de aves que hayan resultado ser negativas al método diagnóstico de aquellos lotes que se encuentren colonizados por la bacteria (Havellar *et al.*, 2007; Katsma, 2007; Silva *et al.*, 2011). Posteriormente, se sacrificarían primero los lotes que hayan resultado ser negativos a *Campylobacter* spp. y/o que resulten con recuentos bajos de dicha bacteria en sus heces (menor al límite de detección), y luego sacrificar los lotes que tengan recuentos más altos del patógeno en la matriz antes mencionada. Esta medida ha probado ser efectiva como un medio para prevenir y/o reducir la diseminación del patógeno desde las canales contaminadas hacia aquellas que no lo están, o que presentan bajos recuentos de *Campylobacter* spp. (Wagenaar *et al.*, 2006; Nauta y Havelaar, 2008; Silva *et al.*, 2011). Esto, tomando en cuenta antecedentes como el de la Unión Europea, en donde se estimó que la prevalencia de *Campylobacter* spp. en canales de aves resultó ser de un 76%, mientras que los lotes de pollos broilers positivos a *Campylobacter* spp. resultaron ser de un 71%, lo cual sugiere que ocurre algún grado de contaminación durante el procesamiento de las canales (EFSA, 2010).

La diferenciación de los lotes de aves previo al sacrificio puede ser logrado a través del uso de métodos diagnósticos, tanto por la forma tradicional como a través de métodos alternativos, pero se debe tener en cuenta las ventajas y desventajas de cada método, como aquellas que fueron mencionadas en la revisión bibliográfica, siendo la principal desventaja del método tradicional el tiempo que conlleva desde la toma de muestras hasta la obtención de los resultados, además de lo engorroso que resulta llevarlo a cabo (Jasson *et al.*, 2010). Dado esto, el dispositivo *Merck Singlepath® Direct Campy Poultry kit* podría ser una alternativa para poder evaluar el estatus de los lotes de aves respecto a *Campylobacter* spp., permitiendo saber que lotes de aves presentan un grado de contaminación en sus heces de $\geq 3 \times 10^7$ UFC por gramo de muestra en un tiempo máximo de dos horas, en comparación al método tradicional que demora un mínimo de 5 días (Tram *et al.*, 2012; OIE, 2008). Otros métodos alternativos son aquellos basados en la técnica de reacción de la polimerasa en cadena o PCR, por ejemplo, el utilizado en Dinamarca, en donde el sacrificio de las aves es

planificado basado en si los lotes están o no colonizadas con *Campylobacter* spp. Dicha determinación es realizada mediante una técnica de PCR siete a diez días previos al faenamiento de las aves (Rosenquist *et al.*, 2009), pero en este caso, una desventaja que se presenta es que los lotes que hayan resultado ser negativos a *Campylobacter* spp. el día que se tomó la muestra, puedan volverse positivos durante el transcurso de dicho periodo, por lo que las aves podrían llegar con un estatus distinto a la planta procesadora de alimentos de aquel que indicó el método diagnóstico (Katsma *et al.* 2007). Por otra parte, y también en Dinamarca, fue desarrollada una técnica de PCR en tiempo real que permite obtener resultados respecto al estatus de las aves en tan solo cuatro horas (Silva *et al.*, 2011), lo cual es un avance respecto al tiempo de entrega de éstos, y que podría ser comparado al método desarrollado por *Merck*. el cual demora como máximo dos horas en entregar los resultados respecto al estatus de un lote de aves. Sin embargo, dichos métodos basados en la técnica de PCR necesitan equipos costosos y personal calificado, lo que los diferencia del método alternativo analizado en esta memoria de título, el cual no requiere instrumentos de elevado costo, de personal calificado, ni de mantenimiento de instalaciones en el tiempo, además del corto periodo de tiempo que demora en entregar la información que uno requiere, entre otras ventajas.

Otra modalidad en que puede ser empleado el faenamiento diferenciado, es que aquellos lotes de aves que hayan resultado ser negativos a *Campylobacter* spp. se destinen a la producción de carne refrigerada, mientras que los lotes que hayan resultado ser positivos a la bacteria sean destinados hacia productos congelados, siendo esta última intervención considerada como prometedora (Rosenquist *et al.*, 2009). Esta modalidad se basa en el principio que la congelación puede disminuir los recuentos de *Campylobacter* spp. sobre las canales y productos cárnicos de pollo, en una concentración de dos logaritmos de magnitud (Georgsson *et al.*, 2006 citado por Rosenquist *et al.*, 2009), lo que permitiría, según una evaluación de riesgo cuantitativa hecha en Dinamarca, una reducción de hasta 30 veces la incidencia de campilobacteriosis en la población en general (Rosenquist *et al.*, 2003 citado por Hermans *et al.*, 2011), mientras que una evaluación de riesgo belga mostró que dicha incidencia disminuiría en un 85% si se lograra efectivamente la reducción de dos logaritmos de magnitud de *Campylobacter* spp. sobre las canales de pollo (Messens *et al.*, 2007 citado por Hermans *et al.*, 2011).

Adicionalmente, otra medida de control que sería posible al conocer el estatus de las aves respecto a *Campylobacter* spp., es que aquellos lotes de aves positivos a dicha bacteria sean destinados a plantas procesadoras de aves específicas, mientras que los lotes que hayan resultado ser negativos sean enviados a otras plantas distintas de los primeros, con el fin de no contaminar de ningún modo dichas canales (Katsma, 2007). Esta estrategia conlleva testear los lotes de aves en la granja poco antes del transporte a la planta, lo que sería también posible utilizando el método alternativo *Merck Singlepath® Direct Campy Poultry kit* analizado en esta memoria. De esta manera, los lotes de aves con resultados positivos podrían ser sacados de la cadena de producción de carne refrigerada y ser destinada solo a productos congelados, teniendo además como antecedente, que según una evaluación de riesgo desarrollada por la iniciativa holandesa denominada CARMA (*Campylobacter Rise Management and Assessment*), esto debería resultar en una gran disminución respecto al riesgo de productos cárnicos derivados del pollo contaminados a nivel de comercio en supermercados (Nauta *et al.*, 2009).

Si bien el sacrificio diferenciado puede ser una herramienta útil para disminuir la prevalencia y el recuento de *Campylobacter* spp. sobre las canales de pollos, en muchos países del mundo existe una marcada estacionalidad respecto a la prevalencia observada de dicha bacteria en los pollos broilers, lo que complicaría la canalización de dichos lotes durante los periodos de alta prevalencia (primavera - verano) hacia productos congelados (en caso que se tomara esa medida), dado que habría una menor disponibilidad de lotes que hayan resultado ser negativos a *Campylobacter* spp., o que su grado de contaminación fuera menor al que detecta el método alternativo para ser destinados a la elaboración de productos refrigerados (Rosenquist *et al.*, 2009), por lo que esta modalidad si bien es efectiva, debe tomarse en cuenta considerando diversos factores que dependerán de cada país en particular. En nuestro país, no existen estudios de estacionalidad de este patógeno.

8.2 Enfriamiento de las canales

El procedimiento de enfriamiento de las canales en el *chiller* ha sido identificado como un punto crítico de control (PCC) en un estudio de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) referente a la contaminación de las canales de pollo con una gran variedad de patógenos (Corry y Atabay, 2001 citado por Figueroa *et al.* 2009). En un

estudio realizado en Chile, se estableció que el proceso de enfriado (*chilling*) con agua que contenía una concentración de 0.5 a 0.75 ppm de cloro libre fue asociado significativamente ($P < 0.05$) con una importante reducción respecto del recuento de *Campylobacter* spp. sobre las canales de pollos broilers (Figueroa *et al.* 2009). Disminuciones en el recuento de la bacteria antes mencionada asociado con las operaciones de enfriamiento han sido también reportadas previamente, indicando que es posible lograr reducciones de hasta 2 logaritmos de magnitud de *Campylobacter* spp. sobre las canales de pollo durante el enfriado utilizando agua clorada (Figueroa *et al.*, 2009). Sin embargo, si bien el uso de agua clorada durante el enfriamiento de la canal reduce la población de *Campylobacter* spp., esta medida tiene un efecto limitado en la magnitud final de la contaminación sobre las canales, debido a que pudieran procesarse aves con altos recuentos de *Campylobacter* spp. que la etapa de enfriado no sería capaz de reducir del todo (Silva *et al.*, 2011), lo que según este antecedente, pondría en duda la real utilidad del dispositivo desarrollado por Merck, ya que éste tiene un límite de detección de $\geq 3 \times 10^7$ UFC por gramo de heces, el cual es alto, pero se debe tener en cuenta que las distintas opciones de enfriamiento de las canales serían una medida más dentro de las aplicadas a lo largo de la cadena alimentaria, con el fin de poder controlar la presencia de *Campylobacter* spp. sobre las canales de pollo, más que considerarla como una medida aislada.

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, podría usarse agua clorada a cierta concentración en conjunto con el faenamiento diferenciado de las canales de pollo, para poder procesar las canales de aves que hayan resultado positivas a algún método diagnóstico, y de esta manera, lograr una disminución importante en la carga bacteriana respecto de *Campylobacter* spp. que presentarían las canales que provengan de pollos broilers con altos recuentos del patógeno en sus heces previo a su sacrificio, entre otras medidas complementarias.

8.3 Congelación de los productos

Como se mencionó en el punto 8.1, el proceso de congelación de las canales y de los productos que se obtienen de ella puede dar lugar a una reducción de hasta 2 logaritmos de magnitud respecto de la contaminación con *Campylobacter* spp. (Georgsson *et al.*, 2006 citado por Rosenquist *et al.*, 2009), volviéndose una herramienta útil para disminuir su

concentración sobre los productos avícolas. Se estima, por ejemplo, que aquellas canales que hayan sido desviadas hacia la producción de productos congelados y que lo estén bajo esa condición por unas dos a tres semanas, reducirían el riesgo de consumir la bacteria por parte de los consumidores en alrededor de un 90% (EFSA, 2010; Janez y Loc-Carrillo, 2013) mientras que el congelado por dos a tres días reducirá el riesgo entre un 50 a 90%, similar a los valores que entrega la descontaminación de las canales usando agua caliente, ácido láctico, clorito de sodio acidificado o fosfato trisódico (Janez y Loc-Carrillo, 2013). Esto podría ser logrado a través del análisis del grado de infección de las aves vivas a través del análisis de sus heces por medio del dispositivo desarrollado por *Merk*, y así, destinar las canales de aves que hayan resultado positivas al *kit* hacia la línea de productos congelados.

Cabe destacar que si bien el proceso de congelación disminuye la concentración de *Campylobacter* spp. sobre las canales y los respectivos productos obtenidos desde ella, el riesgo de su presencia no es eliminado completamente (Silva *et al.*, 2011), pero como se dijo anteriormente, debe ser considerado como una medida más entre muchas otras que busquen disminuir la concentración de *Campylobacter* spp. que finalmente llega a los consumidores.

8.4 Descontaminación química

Se estima que la descontaminación de las canales (posterior al proceso de enfriamiento) con una solución de ácido láctico a una concentración de 2.5% disminuiría el recuento promedio de *Campylobacter* spp. entre unas 6 a 300 veces, con un valor más probable de 60 (Havellar *et al.*, 2007). De esta forma, el riesgo para el consumidor disminuiría en aproximadamente un 90% al consumir carnes descontaminadas de esta manera (Havellar *et al.*, 2007). Sin embargo, en países europeos la descontaminación de las canales de pollo con ácido láctico no está actualmente permitido, lo que complicaría su implementación en las plantas que busquen exportar hacia dicho continente (EFSA, 2010).

8.5 Irradiación

Se ha establecido que la irradiación de productos alimenticios es un proceso seguro, ambientalmente limpio y eficiente respecto al uso de la energía utilizada para dicha labor, siendo particularmente importante aplicarla como un procedimiento de descontaminación de los productos ya elaborados (productos finales) (Farkas, 1998 citado por Rauta *et al.*,

2012). Resulta importante destacar que se ha demostrado que *Campylobacter* spp. es más sensible a la radiación gamma que otros patógenos alimentarios como *Salmonella* y *Listeria* (Rauta *et al.*, 2012). En relación a esto, Rauta *et al.* (2012) estableció que dosis bajas de radiación (1 kGy) permiten una reducción de *Campylobacter* spp. de 10^5 UFC por gramo de carne de pollo a niveles prácticamente indetectables. Además, dicho autor cultivó muestras de carne de pollo en caldo preston, con el fin de comprobar la posibilidad de recuperación de las células de *Campylobacter* spp dañadas durante la irradiación, sin embargo, ninguna célula fue recuperada. Esto indica que aún dosis muy bajas de irradiación (1 kGy) pueden ser usadas para asegurar la inocuidad de los productos avícolas, teniendo además la ventaja de no alterar las características organolépticas de los productos finales (Raut *et al.*, 2012), lo que podría ser utilizado en caso de canales que provengan de aves que hayan resultado positivas al método alternativo, y de esta forma, asegurar un producto inocuo aún proveniente desde aves que presenten altos recuentos de *Campylobacter* spp. en sus heces.

8.6 Desventajas del método alternativo

Aun cuando el método diagnóstico *Merck Singlepaht® Direct Campy Poultry Kit* permite efectivamente la diferenciación de lotes de aves altamente contaminados de aquellos que no presentan una concentración de *Campylobacter* spp. de $\geq 3 \times 10^7$ UFC por gramo de heces, y de esta manera permite la planificación y/o ordenamiento de la faena, entre otras medidas, se debe tener en cuenta el límite de detección que posee el dispositivo. Si bien se ha demostrado que las heces (contenido cecal) de pollos pueden contener concentraciones de *Campylobacter* spp. tan alta como 10^7 UFC por gramo a la edad de sacrificio (Potturi-Venkata *et al.*, 2007), o incluso mayores (Hermans *et al.*, 2011), y por ende, suficientes para ser detectadas por el *kit*, concentraciones menores a 10^7 UFC por gramo de heces no serían detectadas a través del método alternativo, entregando como resultado que dichos lotes son negativos a *Campylobacter* spp, aun cuando pudieran presentar una alta concentración de la bacteria en las heces de las aves. Por esto, y si bien el método alternativo es efectivo en cumplir su objetivo (identificar lotes altamente contaminados de aquellos menos contaminados), aún existiría un gran riesgo para la población respecto a la contaminación de *Campylobacter* spp. sobre las canales y productos derivados de la carne

de pollo, por lo que sería adecuado que en un futuro este mismo *kit* pudiera ser mejorado para detectar concentraciones menores de *Campylobacter* spp. en las heces de las aves, pero con las mismas ventajas que posee el método alternativo.

Por otra parte, autores como Fluckey *et al.* (2003) han encontrado una fuerte correlación entre el estatus de *Campylobacter* spp. en aves vivas determinadas por isopados rectales a nivel de granja el día antes de su sacrificio y las muestras cecales a nivel de planta procesadora, demostrando de esta manera que el contenido cecal y de heces es un buen indicador del estatus de *Campylobacter* spp. en las aves vivas. Reich *et al.* (2008) observaron una correlación positiva entre el número de *Campylobacter* spp. presentes en el ciego de las aves y el número de bacterias presentes sobre las canales y productos trozados. Sin embargo, existen otros autores que indican que los resultados diagnósticos obtenidos desde muestras de contenedores (heces) o muestras cecales no son aceptables como un sustituto de las muestras obtenidas directamente desde la carne de pollo (Nauta *et al.*, 2009), y que por ende, no se correlacionarían adecuadamente. Posiblemente deberían realizarse estudios con el método diagnóstico *gold estándar* en los que en primer lugar se establezca si existe una relación entre la concentración de *Campylobacter* spp. en heces de aves vivas previo a la faena y la concentración de esta misma bacteria en los productos finales, luego del proceso. También deberían realizarse estudios en los que se establezca si las cepas presentes en las aves son idénticas a las cepas presentes en las plantas faenadoras (estudios de clonalidad). Estos estudios deberían realizarse en forma local, ya que quizás los resultados no son extrapolables a nivel general.

Con estos datos se podría establecer cuál es la cepa presente en los productos finales y en qué lugar de la cadena alimentaria se encuentra con el fin de aplicar las medidas de control más efectivas.

Además, y teniendo en cuenta la rapidez con que funcionan las grandes plantas procesadoras, tal vez no sería muy conveniente el análisis de las muestras de heces desde las aves que ingresen a dichas instalaciones, ya que cabe la posibilidad que el tiempo que transcurre entre la llegada de los pollos broilers y su posterior faenamamiento, sea menor al tiempo necesario para que las muestras sean analizadas a través del método alternativo comparado en esta memoria de título, impidiendo de esta manera el ordenamiento de la

faena de los pollos, por lo que sería adecuado evaluar en qué etapa de la cadena productiva sería más eficiente la utilización del *kit*. Tal vez, y como se mencionó en el punto 8.1, podría evaluarse la utilización del método alternativo a nivel de producción primaria poco antes de que las aves sean despachadas hacia las plantas de faenamiento, y así tener la posibilidad de destinar los lotes positivos hacia plantas específicas de procesamiento en donde tengan implementadas, por ejemplo, algunas de las medidas que se explicaron anteriormente, con la ventaja adicional de no interrumpir el ingreso normal de las aves a la línea de faena, en caso de empresas que tengan periodos muy acotados (menor a dos horas) entre la llegada de las aves a la planta de procesamiento y su colgado en la línea de faena.

También, es importante destacar que a nivel nacional no se encuentra estipulado en el Reglamento Sanitario de los Alimentos que los productos derivados del pollo deban cumplir con cierta exigencia respecto a la presencia/ausencia o niveles de contaminación de *Campylobacter* spp. en los alimentos, por lo que las empresas no deben controlar obligatoriamente dicho peligro microbiológico. Sin embargo, para productos que son exportados, algunos países requieren conocer al menos los niveles de contaminación con *Campylobacter* spp., por lo que debería comenzar a evaluarse como parte de una política integral para disminuir los casos de campilobacteriosis en humanos, tanto a nivel nacional como internacional, y sería adecuado que se tomaran las medidas pertinentes antes de que se vuelva obligatorio el control de *Campylobacter* spp. en los alimentos derivados de productos avícolas.

Finalmente, se debe tener en consideración que el *kit* no se encuentra validado, por lo que el método alternativo debería ser sometido a dicho proceso a través de la norma ISO 16140, para poder demostrar sus características diagnósticas. Una vez realizado dicho proceso, se podría evaluar y/o considerar con plena confianza su utilización en la industria avícola, para evaluar ciertas medidas tanto de tipo logístico como operacional a nivel de planta faenadora, con el fin de lograr una disminución de las concentraciones de *Campylobacter* spp. sobre las canales de pollo y/o de los productos que se obtienen de ésta (Normand et al., 2008).

9. CONCLUSIONES

Se puede concluir que el método alternativo *Merck Singlepath® Direct Campy Poultry Kit* entrega resultados equivalentes al método de referencia (cultivo en placa) respecto de la detección *Campylobacter* spp. en las heces de pollos broilers, medido por los estadísticos McNemar e índice *Kappa*.

Teniendo presente que el desarrollo y la utilización de este método alternativo u otros métodos de detección de patógenos no son una medida aislada de control, sino que están insertos dentro de un conjunto de otras medidas a lo largo de la cadena de producción (desde la granja a la mesa), la incorporación de este u otros métodos diagnósticos, podrían ser una herramienta interesante de evaluar en qué medida es que contribuyen a evitar, controlar y/o disminuir el traspaso de diversos patógenos hacia los productos de origen animal, y hacia la población.

10. BIBLIOGRAFÍA

AL-SAKKAF, A. 2013a. Campylobacteriosis in New Zealand: A new twist to the tale? Part one (the pathogen and the poultry plant). *Journal Food Control*. 33: 556-561.

AL-SAKKAF, A. 2013b. Campylobacteriosis in New Zealand: A new twist to the tale? Part two (the consumer and the regulator). *Journal Food Control*. 33: 562-566.

ALLOS, B.; LASTOVICA, A. 2011. *Campylobacter* Infections. **In:** Guerrant, R.; Walker, D.; Weller, P. *Tropical Infectious Diseases*. 2ª ed. Elsevier. pp. 145 – 149.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2014a. Estimates of Foodborne Illness in the United States. [en línea]. <<http://www.cdc.gov/foodborneburden/>> [consulta: 30-08-2014].

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2014b. *Campylobacter*. [en línea]. <<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter/>> [consulta: 31-08-2014].

COGAN, T.; BLOOMFIELD, S.; HUMPHREY, T. 2002. The effectiveness of hygiene procedures for prevention of cross-contamination from chicken carcasses in the domestic kitchen. *Letters in Applied Microbiology*. 29: 354 – 358. (citado por Perez, G.; Kienesberger, S. 2013. *Campylobacter*. **In:** Morris, J. (Eds). *Foodborne infections and intoxications*. 4ª. ed. Academic Press. pp. 165-185.

COHEN, J. 1960. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational Psychological Measurement*. 20: 37-46.

COMISION NACIONAL DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y TECNOLOGIA (CONICYT). 2008. Manual de normas de bioseguridad. Chile. 2ª ed. 139 p.

CORRY, J.; ATABAY, H. 2001. Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. *Journal of Applied Microbiology*. 90: 96 – 114. (citado por Figueroa, G.; Troncoso, M.; Lopez, C.; Rivas, P.; Toro, M. 2009. Occurrence and enumeration of *Campylobacter* spp. during the processing of Chilean broilers. *BMC Microbiology*. 9).

CORRY, J.; JAMES, C.; O'NEILL, D.; YAMAN, H.; KENDALL, A.; HOWELL, M. 2003. Physical methods, readily adapted to existing commercial processing plants, for reducing numbers of *Campylobacters* on raw poultry. *International Journal of Medical Microbiology*. 293. (citado por Havelaar, A.; Mangen, M.; De Koeijer, A.; Bogaardt, M.; evers, E.; Jacobs-Reitsma, W.; Pelt, W.; Wagenaar, J.; De Wit, A.; Van Der Zee, H.; Nauta, M. 2007. Effectiveness and Efficiency of Controlling *Campylobacter* on Broiler Chicken Meat. *Risk Analysis*. 27: 831 – 844).

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). 2010. Report of the international meeting on *Campylobacter* reduction in chicken. **In:** Proceedings of the international meeting on *Campylobacter* reduction in chicken. London. Inglaterra. 30 – 31 marzo 2010. European Food Safety Authority. P-31.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). 2011. Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. [en línea]. <<http://www.efsa.europa.eu/fr/search/doc/2105.pdf>> [consulta: 26-02-2015].

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). 2014a. Food-borne zoonotic diseases. [en línea]. <<http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/foodbornezoonoticdiseases.htm>> [consulta: 30-08-2014].

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). 2014b. *Campylobacter*. [en línea]. <<http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/campylobacter.htm>> [consulta: 31-08-2014].

EVANS, S.; POWELL, L. 2008. *Campylobacter*. **In:** Poultry diseases. 6^a ed. Elsevier. pp. 181 – 190.

FARKAS, J. 1998. Irradiation as a method for decontaminating food. *International Journal of Food Microbiology*. 44: 189 – 204. (citado por Raut, D.; Shashidhar, R.; Bandekar, J.; Kapadnis, B. 2012. Effectiveness of radiation processing in elimination of *Campylobacter* from poultry meat. *Radiation Physics and Chemistry*. 81: 82 – 85.)

FIGUEROA, G.; TRONCOSO, M.; LOPEZ, C.; RIVAS, P.; TORO, M. 2009. Occurrence and enumeration of *Campylobacter* spp. during the processing of Chilean broilers. BMC Microbiology. 9.

FRENCH, N. 2008. Enhancing surveillance of potentially foodborne enteric disease in New Zealand: Human camoylobacteriosis in Manawatu. [en línea]. <http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/enhancing-surveillance-potentially-research-projects-2/Campy_Attribution_Manawatu.pdf> [consulta: 16-04-2015]. (citado por Al-Sakkaf, A. 2013b. Campylobacteriosis in New Zealand: A new twist to the tale? Part two (the consumer and the regulator). Journal Food Control. 33: 562-566).

FLUCKEY, W.; SANCHEZ, M.; MCKEE, S.; SMITH, D.; PENDLETON, E.; BRASHEARS, M. 2003. Establishment of a microbiological profile for an air chilling poultry operation in the United States. Journal of Food Protection. 66: 272 – 279.

GEORGSSON, F.; PORKESSON, A.; GEIRSDOTTIR, M.; REIERSEN, J.; STERN, N. 2006. The influence of freezing and duration of storage on *Campylobacter* and indicator bacteria in broiler carcasses. Food Microbiology. 23: 677 – 683. (citado por Rosenquist, H.; Boysen, L.; Galliano, C.; Nordentoft, S.; Ethelberg, S.; Borck, B. 2009. Danish strategies to control *Campylobacter* in broilers and broiler meat: facts and effects. Epidemiology and Infection. 137: 1742 – 1750).

HAVELAAR, A.; MANGEN, M.; DE KOEIJER, A.; BOGAARDT, M.; EVERS, E.; JACOBS-REITSMA, W.; PELT, W.; WAGENAAR, J.; DE WIT, A.; VAN DER ZEE, H.; NAUTA, M. 2007. Effectiveness and Efficiency of Controlling *Campylobacter* on Broiler Chicken Meat. Risk Analysis. 27: 831 – 844.

HERMANS, D.; VAN, K.; MESSENS, W.; MARTEL, A.; VAN, F.; HAESBROUCK, F.; RASSCHAERT, G.; HEYNDRICKX, M.; PASMANS, F. 2011. *Campylobacter* control in poultry by current intervention measures ineffective: Urgent need for intensified fundamental research. Veterinary Microbiology. 152: 219 – 228.

INSTITUTO DE SALUD PUBLICA DE CHILE (ISPCH). 2014. Vigilancia de laboratorio de *Campylobacter* spp. Chile, 2005 – 2013. Instituto de Salud Pública (ISP), Ministerio de Salud, Chile. [en línea].

<<http://www.ispch.cl/sites/default/files/Bolet%C3%ADn%20Campylobacter.pdf>> [consulta : 22-03-2014].

JANEZ, N.; LOC-CARRILLO, C. 2013. Use of phages to control *Campylobacter* spp. *Journal of Microbiological Methods*. 95: 68 – 75.

JASSON, V.; JACXSENS, L.; LUNING, P.; RAJKOVIC, A.; UYTTENDAELE, M. 2010. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology*. 27: 710 – 730.

JOHN, L.; SLAGHUIS, J.; WADL, M.; WAGNER, M.; SELIWIORSTOW, T.; BARE, J.; UYTTENDAELE, M.; DE ZUTTER, L.; LINDHARDT, C. 2013. From farm-to-fork: Merck *Singlepath® Direct Campy Poultry* Rapid Test Kit for Direct Detection of *Campylobacter* spp. in Fresh Caecal Samples From Live Chicken. [en línea]. <http://www.emdmillipore.com/INTL/en/20140113_113003> [consulta: 24-03-2014].

KATSMA, W.; DE KOEIJER, A.; JACOBS-REITSMA, W.; MANGEN, M.; WAGENAAR, J. 2007. Assessing interventions to reduce the risk of *Campylobacter* prevalence in broilers. *Risk Analysis*. 27: 863 – 876.

KVALSVIG, A.; BAKER, M.; SEARS, A.; FRENCH, N. 2014. *Campylobacter*. In: Motarjemi, Y.; Moy, G.; Todd, E. *Encyclopedia of Food Safety*. 1ª ed. Elsevier. pp. 369 – 380.

LANDIS, J.; KOCH, G. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33: 159-174.

MAURTUA-NEUMANN, P.; OBERHELMAN, R. 2013. *Campylobacter* infections. In: Hill, D.; Magill, A.; Ryan, E.; Solomon, T. (Eds). *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease*. 9ª. ed. Elsevier. pp. 468-470.

MESSENS, W.; HARTNETT, E.; GELLYNCK, X.; VIAENE, J.; HALET, D.; HERMAN, L.; GRIJSPEERDT, K. 2007. Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis through the consumption of chicken meat in Belgium. XVIII European Symposium on the Quality of Poultry Meat and The XII European Symposium on the Quality of Eggs and Egg products. Praga, República Checa. pp. 167 – 168. (citado por Hermans, D.; Van, K.; Messens, W.; Martel, A.; Van, F.; Haesebrouck, F.; Rasschaert, G.;

Heyndrickx, M.; Pasmans, F. 2011. *Campylobacter* control in poultry by current intervention measures ineffective: Urgent need for intensified fundamental research. *Veterinary Microbiology*. 152: 219 – 228).

MYLIUS, S.; NAUTA, M.; HAVELAAR, A. 2007. Cross-contamination during food preparation: A mechanistic model applied to chicken-borne *Campylobacter*. *Risk Analysis*. 4: 803 – 813. (citado por Al-sakkaf, A. 2013a. *Campylobacteriosis in New Zealand: A new twist to the tale? Part one (the pathogen and the poultry plant)*. *Journal Food Control*. 33: 556-561).

NADEEM, K.; HAZEL, M.; SI MING, M. 2013. *Campylobacter*. **In:** Tang, Y.; Sussman, M.; Liu, D.; Poxton, I.; Schwartzman, J. *Molecular Medical Microbiology*. 2ª ed. Academic Press. pp. 1187 – 1236.

NAUTA, M.; HAVELAAR, A. 2008. Risk-based standards for *Campylobacter* in the broiler meat chain. *Food Control*. 19: 372 – 381.

NAUTA, M.; VAN DER WAL, F.; PUTIRULAN, F.; POST, J.; VAN DE KASSTEELE, J. BOLDER, N. 2009. Evaluation of the “testing and scheduling” strategy for control of *Campylobacter* in broiler meat in The Netherlands. *International Journal of Food Microbiology*. 134: 216 – 222.

NORMAND, V.; BOULIANNE, M.; QUESSY, S. 2008. Evidence of cross-contamination by *Campylobacter* spp. of broiler carcasses using genetic characterization of isolates. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 72: 396 – 402.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). 2008. Second formal meeting of the Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group (FERG). [en línea]. <<http://www.who.int/foodsafety/publications/ferg2/en/>> [consulta: 10-03-2015].

PERCIVAL, S.; WILLIAMS, D. 2014. *Campylobacter*. **In:** *Microbiology of waterborne disease*. 2ª ed. Academic Press. pp. 65-78.

PEREZ, G.; KIENESBERGER, S. 2013. *Campylobacter*. **In:** Morris, J. *Foodborne infections and intoxications*. 4ª. ed. Academic Press. pp. 165-185.

- POTTURI-VENKATA, L.; BACKART, S.; VIEIRA, S.; OYARZABAL, O.** 2007. Evaluation of logistic processing to reduce cross contamination of commercial broiler carcasses with *Campylobacter* spp. *Journal of Food Protection*. 70: 2549 – 2554.
- RAUT, D.; SHASHIDHAR, R.; BANDEKAR, J.; KAPADNIS, B.** 2012. Effectiveness of radiation processing in elimination of *Campylobacter* from poultry meat. *Radiation Physics and Chemistry*. 81: 82 – 85.
- REICH, F.; ATANASSOVA, V.; HAUNHORST, E.; KLEIN, G.** 2008. The effects of *Campylobacter* numbers in caeca on the contamination of broiler carcasses with *Campylobacter*. *International Journal of Food Microbiology*. 127: 116 – 120.
- RODGERS, J.; CLIFTON-HADLEY, F.; MARIN, C.; VIDAL, A.** 2010. An evaluation of survival and detection of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in broiler caecal contents using culture based methods. *Journal of Applied Microbiology*. 109: 1244 – 1252.
- ROSENQUIST, H.; NIELSEN, N.; SOMMER, H.; NORRUNG, B.; CHRISTENSEN, B.** 2003. Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *International Journal of Food Microbiology*. 83: 87 – 103. (citado por Hermans, D.; Van, K.; Messens, W.; Martel, A.; Van, F.; Haesebrouck, F.; Rasschaert, G.; Heyndrickx, M.; Pasmans, F. 2011. *Campylobacter* control in poultry by current intervention measures ineffective: Urgent need for intensified fundamental research. *Veterinary Microbiology*. 152: 219 – 228).
- ROSENQUIST, H.; BOYSEN, L.; GALLIANO, C.; NORDENTOFT, S.; ETHELBERG, S.; BORCK, B.** 2009. Danish strategies to control *Campylobacter* in broilers and broiler meat: facts and effects. *Epidemiology and Infection*. 137: 1742 – 1750.
- SILVA, J.; LEITE, D.; FERNANDES, M.; MENA, C.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P.** 2011. *Campylobacter* spp. as a Foodborne Pathogen: A Review. *Frontiers in Microbiology*. 2: 200.
- SNIJDERS, J.; LIPMAN, L.; NEDELKOYSKI, R.** 2004. Practical germicidal treatment in the poultry processing line. Department of Public Health and Food Safety, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University.

TRAM, L.; CAO, C.; HOGBERG, J.; WOLFF, A.; BANG, DANG. 2012. Isolation and detection of *Campylobacter jejuni* from chicken fecal samples by immunomagnetic separation-PCR. *Journal Food Control*. 24: 23-28.

UNITED STATES DEPARTMENT AGRICULTURE (USDA). 2014. Livestock and poultry: World Markets and Trade. [en línea]. <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf> [consulta: 15-03-2014].

WAGENAAR, J.; MEVIUS, D.; HAVELAAR, A. 2006. *Campylobacter* in primary animal production and control strategies to reduce the burden of human campylobacteriosis. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*. 25: 581–594.

WASSTHEIL-SMOLLER, S.; SMOLLER, J. 2015. Mostly about statistics. **In:** *Biostatistics and Epidemiology*. 4th ed. Springer. Verlag, Nueva York. pp. 27 – 81.

WILSON, D.; GABRIEL, E.; LEATHERBARROW, A.; CHEESBROUGH, J.; GEE, S.; BOLTON, E.; FOX, A.; FEARNHEAD, P.; HART, C.; DIGGLE, P. 2008. Tracing the source of campylobacteriosis. *PLoS Genet*. 4. (citado por Janez, N.; Loc-Carrillo, C. 2013. Use of phages to control *Campylobacter* spp. *Journal of Microbiological Methods*. 95: 68 – 75).

WINGSTRAND, A.; NEIMANN, J.; ENGBERG, J.; MOLLER, E.; GERNER-SMIDT, P.; WEGENER, H.; MOLBAK, K. 2006. Fresh chicken as main risk factor for campylobacteriosis, Denmark. *Emerging Infectious Diseases*. 12: 280 – 284.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). 2008. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **In:** *Terrestrial manual*. Organización Mundial de Sanidad Animal. [en línea]. <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.03_CAMPYLO.pdf> [consulta: 20-05-2014].

YANG, Z.; ZHOU, M. 2014. Kappa statistic for clustered matched-pair data. *Statistics in Medicine*. 33: 2612 – 2633.

11. ANEXOS

11.1 Tablas anexas:

11. 1. 1 Tabla anexa nro. 1:

- Tabla que permite interpretar el grado de acuerdo entre dos observadores (adaptada desde Landis y Koch (1977)).

Estadístico <i>kappa</i>	Grado de acuerdo
< 0.00	Pobre
0.00 – 0.20	Ligero
0.21 – 0.40	Adecuado
0.41 – 0.60	Moderado
0.61 – 0.80	Substancial
0.81 – 1.00	Casi perfecto

11. 1. 2 Tabla anexa nro. 2:

- Resultados obtenidos a partir del análisis de las muestras cecales de pollos broilers a través del método de referencia (MR) y el método alternativo (MA).

MUESTRA	MR	MA
1	Negativo	Negativo
2	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo
5	Negativo	Negativo
6	Negativo	Negativo
7	Negativo	Negativo
8	Negativo	Negativo
9	Negativo	Positivo
10	Negativo	Negativo

11	Negativo	Negativo
12	Negativo	Negativo
13	Positivo	Positivo
14	Positivo	Positivo
15	Negativo	Positivo
16	Negativo	Negativo
17	Negativo	Negativo
18	Negativo	Negativo
19	Negativo	Negativo
20	Negativo	Negativo
21	Negativo	Positivo
22	Positivo	Positivo
23	Negativo	Negativo
24	Positivo	Positivo
25	Negativo	Negativo
26	Positivo	Positivo
27	Negativo	Negativo
28	Negativo	Positivo
29	Positivo	Positivo
30	Positivo	Positivo
31	Negativo	Negativo
32	Positivo	Positivo
33	Positivo	Positivo
34	Positivo	Positivo
35	Positivo	Positivo
36	Positivo	Positivo
37	Positivo	Positivo
38	Positivo	Positivo
39	Positivo	Positivo
40	Positivo	Positivo
41	Positivo	Positivo

42	Positivo	Negativo
43	Positivo	Positivo
44	Positivo	Positivo
45	Positivo	Positivo
46	Positivo	Negativo
47	Positivo	Positivo
48	Positivo	Positivo
49	Negativo	Negativo
50	Positivo	Positivo
51	Negativo	Negativo
52	Positivo	Positivo
53	Negativo	Negativo
54	Negativo	Negativo
55	Negativo	Negativo
56	Negativo	Positivo
57	Positivo	Positivo
58	Negativo	Negativo
59	Negativo	Negativo
60	Negativo	Negativo
61	Negativo	Negativo
62	Negativo	Negativo
63	Negativo	Negativo
64	Positivo	Positivo
65	Negativo	Negativo
66	Positivo	Positivo
67	Positivo	Negativo
68	Negativo	Negativo
69	Negativo	Negativo
70	Negativo	Negativo
71	Negativo	Negativo
72	Negativo	Negativo

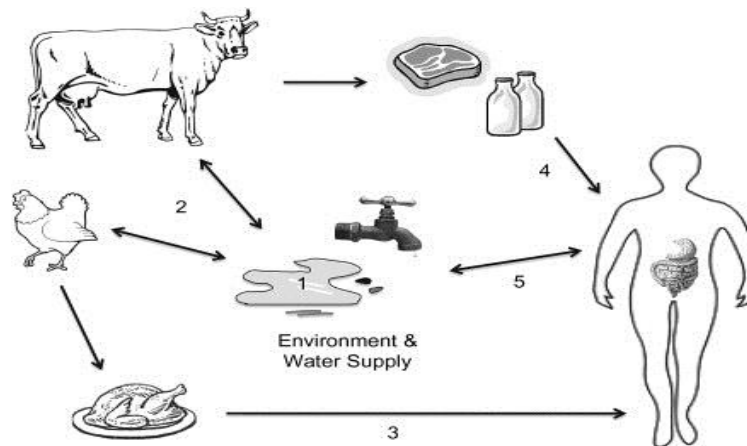
73	Negativo	Negativo
74	Positivo	Positivo
75	Positivo	Positivo
76	Negativo	Negativo
77	Negativo	Negativo
78	Negativo	Negativo
79	Negativo	Negativo
80	Negativo	Negativo
81	Negativo	Negativo
82	Negativo	Negativo
83	Negativo	Negativo
84	Negativo	Negativo
85	Negativo	Negativo
86	Negativo	Negativo
87	Negativo	Negativo
88	Negativo	Negativo
89	Negativo	Negativo
90	Negativo	Negativo
91	Negativo	Negativo
92	Negativo	Negativo
93	Positivo	Positivo
94	Negativo	Negativo
95	Negativo	Negativo
96	Negativo	Negativo
97	Negativo	Negativo
98	Negativo	Negativo
99	Negativo	Negativo
100	Negativo	Negativo
101	Positivo	Positivo
102	Positivo	Positivo
103	Positivo	Positivo

104	Positivo	Positivo
105	Positivo	Positivo
106	Positivo	Positivo
107	Negativo	Negativo
108	Negativo	Negativo
109	Negativo	Negativo
110	Positivo	Positivo
111	Positivo	Positivo
112	Positivo	Positivo
113	Positivo	Positivo
114	Positivo	Positivo
115	Negativo	Negativo
116	Negativo	Negativo
117	Negativo	Negativo
118	Negativo	Negativo
119	Positivo	Negativo
120	Negativo	Negativo

11.2 Imágenes anexas

11.2.1 Imagen anexa número I:

- Rutas de transmisión de *Campylobacter* spp. desde el medio ambiente y los alimentos hacia el ser humano (Perez y Kienesberger, 2013).



11.2. 2 Imagen anexa número II:

- Imagen ilustrativa del dispositivo *Merck Singlepath® Direct Campy Poultry Kit*, en donde se destacan las zonas 1, 2, 3 y 4 explicadas en la memoria de título.

