

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS EN CEPAS DE CAMPYLOBACTER
TERMOTOLERANTES AISLADAS DURANTE EL PROCESO DE
FAENAMIENTO DE POLLOS BROILER***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Magister en alimentos con mención gestión, calidad e inocuidad de
los alimentos por:**

CRISTAL ANAYS SALCEDO FALCON

Director de Tesis: Dra. Lisette Lapierre

Santiago-CHILE

Enero 2020

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por la candidata

CRISTAL ANAYS SALCEDO FALCON

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Alimentos con mención Gestión, Calidad e Inocuidad de los Alimentos, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dra. Lisette Lapierre

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Davor Cotoras Tadic

Dr. Patricio Retamal Merino

Dr. Heriberto Fernández Jaramillo

Dedicatoria

A Magdelay Anays e Italo Nicolás, mis padres.

*A mi amiga y colega Estefhany Rubio, quien en vida compartió conmigo una linda
amistad.*

Merci beaucoup ma chère amie

Agradecimientos

Tuve la fortuna de desarrollar el proyecto de tesis bajo la dirección y guía de la Prof. Lisette Lapierre, quien, por sus cualidades humanas y profesionales, me brindó la confianza para lograr los objetivos, incluso me impulsó a buscar más allá de mis aspiraciones. Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio, depositar en mi confianza y buscar los recursos para culminar este proyecto de tesis.

Agradezco a María Belén Benavides, quien me brindó su valioso apoyo en la realización de los experimentos, con mucho compromiso y profesionalismo.

Agradezco a la Familia Antileo Valdés, en especial a mi amado Rubén por ser un apoyo incondicional, emocional, profesional y sentimental. Gracias Familia por llenar mis días de amor, cariño y muchos asaditos. Sin ustedes el camino hubiese sido menos placentero.

Gracias a mi mamá y a mi papá, Magdelay e Italo, quienes nuevamente me apoyaron con la idea de regresar a Chile. Que aceptaron mis decisiones. También quiero agradecer a mi abuela Anays, que incluyó en sus oraciones la realización de mis experimentos. Agradezco a mi Tío Bernardino Falcón A. quién ha confiado en mí durante 7 años en los que ha sido mi aval en las becas para mis estudios superiores.

Gracias a mi amigo Carlos Wilfredo, Willy. Confirmé que la distancia es insignificante y que cuando uno se compromete a cuidar una relación de amistad se mantiene en el tiempo.

Agradezco a mis familiares y amigos en Panamá quienes en muchas ocasiones se tomaron el tiempo de desearme buenos deseos para lograr los objetivos trazados.

Agradezco al Comité Interinstitucional de la Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología de Panamá, por validar mis esfuerzos, mis aspiraciones profesionales y por la aprobación del financiamiento de mis estudios de magíster en el marco de la Beca de SENACYT-IFARHU.

A la Comisión Evaluadora, gracias por brindarme su apoyo y por las correcciones que aportaron positivamente en mi experiencia de aprendizaje.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 9 |
| 1.1. <i>Campylobacter</i> | 9 |
| 1.1.1. <i>Campylobacter</i> termotolerante | 10 |
| 1.1.2. <i>Campylobacteriosis</i> en humanos | 11 |
| 1.1.3. Epidemiología de la infección por <i>Campylobacter</i> | 13 |
| 1.2. Sistema de producción de carne de pollo y la presencia de <i>Campylobacter</i> | 16 |
| 1.2.1. El proceso de faenamiento de pollos y las medidas de control de la contaminación bacteriana | 20 |
| 1.2.2. Formación de biopelículas de <i>Campylobacter</i> y su relación con las plantas de faenamiento de pollos | 25 |
| HIPÓTESIS | 31 |
| OBJETIVOS | 32 |
| 3.1. Objetivo General | 32 |
| 3.2. Objetivos Específicos | 32 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 33 |
| 4.1. Materiales | 33 |
| 4.1.1. Medios de cultivo bacteriano | 34 |
| 4.1.2. Material biológico | 36 |
| 4.2. Métodos | 38 |
| 4.2.1. Cultivo y mantención de cepas | 38 |
| 4.2.2. Ensayo de tinción de biopelículas mediante cristal violeta | 39 |
| 4.2.3. Ensayo de eficacia bactericida de desinfectantes en suspensión | 42 |
| 4.2.4. Recuento en placa de siembra por extensión en superficie | 45 |
| 4.2.5. Análisis estadístico de los datos | 46 |
| RESULTADOS | 48 |
| 5.1. Formación de biopelículas de cepas de <i>Campylobacter</i> termotolerantes | 48 |
| 5.2. Capacidad de <i>Campylobacter</i> termotolerantes de sobrevivir y replicarse en condiciones de estrés oxidativo y estrés térmico | 54 |
| 5.3. Validación del método de neutralización para los ensayos de eficacia bactericida de desinfectantes sobre cepas de <i>Campylobacter</i> termotolerantes | 57 |
| 5.4. Eficacia bactericida de desinfectantes de uso industrial sobre cepas de <i>Campylobacter</i> termotolerantes | 60 |
| DISCUSIÓN | 63 |
| CONCLUSIONES | 70 |
| GLOSARIO | 72 |
| BIBLIOGRAFÍA | 73 |
| ANEXO | 85 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Codificación de la cepa, sitio de aislado, y formación de biopelículas de cepas sometidas a estrés oxidativo, de <i>Campylobacter jejuni</i> y <i>Campylobacter coli</i> aisladas de cacasas de pollo en el proceso de faenamiento..... | 50 |
| Tabla 2. Codificación de la cepa, sitio de aislado, y formación de biopelículas de cepas sometidas a estrés oxidativo y estrés térmico, de <i>Campylobacter jejuni</i> y <i>Campylobacter coli</i> aisladas de carcasas de pollo en el proceso de faenamiento | 52 |
| Tabla 3. Análisis porcentual de los resultados según la habilidad de formación de biopelículas de cepas aisladas de <i>Campylobacter jejuni</i> y <i>Campylobacter coli</i> | 53 |
| Tabla 4. Recuento de células viables de <i>Campylobacter jejuni</i> de la fracción planctónica incubado en condición aeróbica | 55 |
| Tabla 5. Células viables de <i>Campylobacter jejuni</i> antes y después del shock térmico a 4°C | 56 |
| Tabla 6. Recuento de microorganismos iniciales y sobrevivientes en la validación de la solución neutralizante universal | 57 |
| Tabla 7. Recuento de microorganismos iniciales y sobrevivientes en el ensayo de Formalina para validar el método de neutralización por dilución con solución de agua peptonada tamponada | 59 |
| Tabla 8. Eficacia bactericida de diferentes desinfectantes comerciales sobre <i>Campylobacter jejuni</i> aislada de carcasa de pollo Broiler | 61 |
| Tabla 9. Eficacia bactericida de diferentes desinfectantes comerciales sobre <i>Campylobacter coli</i> aislada de carcasa de pollo Broiler | 62 |

RESUMEN

Campylobacter es el principal agente causante de gastroenteritis transmitida por los alimentos, en países desarrollados, y presenta una prevalencia importante en los países en desarrollo. De manera general, es aceptado que los alimentos de origen aviar son una fuente importante de infección por *Campylobacter* en humanos; y para los casos de infecciones por *Campylobacter jejuni*, el consumo de carne de pollo se ha establecido como el principal factor de riesgo. *Campylobacter* se considera un microorganismo comensal en el tracto gastrointestinal de los pollos, lo que conduce a una colonización predominantemente asintomática del intestino, en particular del ciego. Sin embargo, como patógeno alimentario, tiene que sobrevivir en condiciones desfavorables fuera del intestino del pollo. En este contexto, la contaminación de las carcasas de pollos, durante el proceso de faenamiento, ocurre debido al escurrimiento de fecas contaminadas desde la cloaca y la ruptura del ciego hacia las carcasas. La contaminación cruzada ocurre principalmente durante el escaldado, desplumado, evisceración y enfriamiento. Durante el proceso de producción de carcasas de pollos, *Campylobacter* se enfrenta a condiciones de estrés ambiental debido a los cambios de temperatura, la concentración de oxígeno atmosférico y los procedimientos de limpieza y desinfección. Actualmente, se desconoce el mecanismo completo que explique cómo *Campylobacter* articula los distintos factores que le permiten sobrevivir en la cadena alimentaria. Uno de los posibles factores que contribuyen a su supervivencia es la capacidad de formación de biopelículas. Las especies bacterianas patógenas capaces de formar biopelículas son un problema significativo para la salud y la producción de alimentos. Se ha reportado que las cepas de una misma especie de *Campylobacter* difieren en su capacidad para formar biopelículas. En este proyecto de investigación, se caracterizó la capacidad de formación de biopelículas en *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas desde carcasas de pollos broiler en las diferentes zonas de proceso dentro de una planta de faenamiento en Chile; y se evaluó la eficacia de los productos desinfectantes utilizados para su eliminación. Según las condiciones establecidas en este estudio, las cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas desde carcasas de pollo, no son formadoras fuertes de biopelículas mono- especie. Por lo tanto, no fue posible asociar la formación de biopelículas de *Campylobacter* termotolerante con alguna etapa del proceso de faenamiento. Las cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, sobrevivieron y se mantuvieron viables y cultivables posterior a la incubación en condiciones de estrés oxidativo y estrés térmico. Por otro lado, los desinfectantes comerciales a base de ácido peracético (5%), peróxido de hidrógeno (15%), glutaraldehído (20%) y formalina (37%), son eficaces en un 99,9999% sobre las cepas de *Campylobacter* en suspensión, después de 5 minutos de exposición en suspensión. El conocimiento generado a partir de esta investigación aporta fundamentos científicos para el desarrollo de nuevas estrategias de prevención y control en la industria de pollos.

ABSTRACT

Campylobacter is the most common causes of human gastroenteritis transmitted by food, in developed countries, and has a significant prevalence in developing countries. In general, it is accepted that poultry meat and poultry products are an important source of *Campylobacter* infection in humans; and for cases of *Campylobacter jejuni* infections, consumption of chicken meat has been established as the main risk factor. *Campylobacter* is considered a commensal microorganism in the gastrointestinal tract of chickens, which leads to a predominantly asymptomatic colonization of the intestine, particularly the caecum. However, as a food pathogen, it must survive in unfavorable conditions outside the chicken intestine. In this context, the contamination of chicken carcasses, during the slaughter process, occurs due to the runoff of contaminated feces from the sewer and the rupture of the cecum towards the carcasses. Cross contamination occurs mainly during blanching, plucking, evisceration and cooling. During the process of production of chicken carcasses, *Campylobacter* faces environmental stress conditions due to changes in temperature, atmospheric oxygen concentration and cleaning and disinfection procedures. Currently, the complete mechanism that explains how *Campylobacter* articulates the different factors that allow it to survive in the food chain is unknown. One of the possible factors that contribute to their survival is the ability to form biofilms. Pathogenic bacterial species capable of forming biofilms are a significant problem for health and food production. It has been reported that strains of the same *Campylobacter* species differ in their ability to form biofilms. In this research project, the biofilm formation capacity in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from broiler chicken carcasses in the different processing zones within a slaughter plant in Chile was characterized; and the effectiveness of the disinfectant products used for their elimination was evaluated. According to the conditions established in this study, strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from chicken carcasses are not strong formers of mono-species biofilms. Therefore, it was not possible to associate the biofilm formation of *Campylobacter* thermotolerant with any stage of the slaughtering process. The strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* survived and remained viable and cultivable after incubation under conditions of oxidative stress and thermal stress. On the other hand, commercial disinfectants based on peracetic acid (5%), hydrogen peroxide (15%), glutaraldehyde (20%) and formalin (37%), are 99.9999% effective on *Campylobacter* strains. in suspension, after 5 minutes of exposure, in suspension. The knowledge generated from this research provides scientific foundations for the development of new prevention and control strategies in the chicken industry.

INTRODUCCIÓN

1.1. *Campylobacter*

Las bacterias del género *Campylobacter* son Gram negativas, tienen forma de bacilos curvos o en espiral, con tamaños de 0,2 – 0,8 μm de ancho x 0,5 – 5 μm de largo, no son formadoras de esporas y pueden presentar un flagelo polar, o dos flagelos en cada extremo, o bien, no tener flagelo. Esta última característica depende de la especie. La presencia del flagelo les confiere motilidad; y por su morfología presentan un desplazamiento en forma de saca corcho (Gilbreath et al., 2011; Park, 2002). El género *Campylobacter* comprende 39 especies y 16 subespecies (Parte, 2014).

Las bacterias *Campylobacter* son parte del grupo consideradas como “patógenos emergentes” (Kaakoush et al., 2015). Estas bacterias están ampliamente distribuidas en la naturaleza, teniendo diferentes animales como reservorio. Se caracterizan por ser bacterias comensales en el tracto gastrointestinal de mamíferos y aves, siendo de mayor importancia en aves de corral (Suzuki y Yamamoto, 2009). Otros reservorios incluyen vacas, ovejas y cerdos; siendo fuente directa o indirecta de la infección en humanos (Fernández et al., 2008).

En comparación con otras bacterias patógenas, *Campylobacter spp.* requiere de condiciones especiales para su proliferación y presenta mayor sensibilidad en condiciones de estrés ambiental (Cameron et al., 2012; Obiri-Danso et al., 2001; Solomon y Hoover, 2004; Waterman y Small, 1998). Se diferencian de otros patógenos transmitidos por los alimentos porque son esencialmente microaerofílicos, es decir proliferan mejor en atmósferas que contengan aproximadamente 10 % CO₂ y 5% O₂.

1.1.1. *Campylobacter* termotolerante

Las especies patógenas para el hombre se diferencian también porque tienen un rango de temperatura de crecimiento estrecho, que oscila entre 37 °C y 42 °C y son incapaces de proliferar a temperaturas por debajo de los 30 °C. Estos son clasificados como *Campylobacter* termotolerantes (EFSA, 2014; Murphy et al., 2006). Este grupo de bacterias está comprendido por *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Campylobacter lari* (Penner, 1988). El reservorio de *C. jejuni* son las aves de corral, pero también se ha aislado en ganado bovino, ovino, y caprino, en perros y en gatos. El reservorio de *C. coli* son los cerdos, se ha aislado también en aves de corral, vacas y ovejas (WHO, 2009). Por otro lado, *C. lari* se aisló originalmente de las gaviotas y otras aves playeras,

como los pluvialis o chorlitos, albatros y pingüinos. También se han aislado de mamíferos marinos, mariscos, y a partir de agua de mar y agua dulce. Aunque algunas cepas se han aislado del ganado porcino y pollos, esta especie está asociada principalmente con animales de regiones costeras y cuencas hidrográficas (Miller et al., 2014).

1.1.2. *Campylobacteriosis* en humanos

La *Campylobacteriosis* es la enfermedad causada por la infección de *Campylobacter* (WHO, 2016). *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari* son las especies más frecuentemente asociadas con la enfermedad en humanos (EFSA; ECDC, 2013; Fernández et al., 2008). A nivel mundial, *Campylobacter* es uno de los principales agentes causantes de enfermedad diarreica y está considerada como la causa bacteriana más frecuente de gastroenteritis en países industrializados (WHO, 2016). Los seres humanos, por lo general, son infectados a través de alimentos contaminados; por el consumo de carne poco cocida, principalmente de pollo y sus derivados. La infección también se puede generar mediante el consumo de leche no pasteurizada, de agua contaminada; y a través del contacto directo con animales colonizados con *Campylobacter* (Obiri-Danso et al., 2001; Solomon y Hoover, 2004).

El patógeno presenta un período de incubación de 1 - 10 días, pero se puede desarrollar manifestaciones clínicas al cuarto día posterior a la infección. La sintomatología de la enfermedad se caracteriza por diarrea acuosa que puede llegar a sanguinolenta, dolor abdominal, fiebre, dolor de cabeza, náuseas y en ocasiones vómitos, con una duración de 3 - 6 días (WHO, 2016). La mayoría de las infecciones son auto limitadas. Es importante considerar que la muerte por *Campylobacteriosis* es poco frecuente (EFSA; ECDC, 2016); y suele ocurrir solo en pacientes muy jóvenes (<4 años) o de edad avanzada (>75 años) (Batz et al., 2014), o bien en aquellos que ya padecen alguna otra enfermedad grave. Sin embargo, en algunos casos pueden ocurrir complicaciones como hemorragia intestinal, septicemia, meningitis y adenitis mesentérica (inflamación de los linfonódulos abdominales), el resultado de la enfermedad depende de la virulencia de la cepa infectante y el estado inmune del hospedero. La *Campylobacteriosis* también se ha asociado con el desarrollo de artritis reactiva y con trastornos neurológicos como el síndrome de Miller–Fisher y Guillain-Barré, una forma de parálisis semejante a la poliomielitis que puede provocar disfunción respiratoria y neurológica grave, e incluso la muerte, en un reducido número de casos. Se ha reportado que la ocurrencia del síndrome de Guillain-Barré es de 1 cada 1,000 casos de *Campylobacteriosis* (Kaakoush et al., 2015).

El mecanismo por el cual *Campylobacter* produce la enfermedad aún no está definido por completo. Actualmente, se conoce que *Campylobacter*, en el

hospedero humano, se desplaza impulsado por flagelos, supera el peristaltismo y logra la adhesión a la mucosa intestinal (ileón y colon) (Silva et al., 2011). Según la evidencia científica, se postulan dos posibles mecanismos; (i) la adherencia intestinal y producción de toxinas y (ii) la invasión y posterior proliferación en la mucosa intestinal (Park, 2002). Este último mecanismo, está mediado por los antígenos de invasión de *Campylobacter* (Cia) que son liberados por un sistema de secreción asociado al flagelo (Konkel et al., 1999). La reacción inflamatoria es el resultado de la producción de proteínas citolíticas de distensión (CDT) que afectan el ciclo celular, causando distensión y liberación de citoquinas proinflamatorias (Hickey et al., 2000). Dentro de las células epiteliales, las bacterias sobreviven, se replican en vacuolas intracitoplasmáticas (Cróinín and Backert, 2012) y migran a las células aledañas, dando como resultado una enterocolitis inespecífica (Zilbauer et al., 2008).

1.1.3. Epidemiología de la infección por *Campylobacter*

Campylobacter es el principal agente causante de gastroenteritis en países desarrollados, y presenta una prevalencia importante en los países en desarrollo (WHO, 2016). En Estados Unidos, la Red de Vigilancia Activa de Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (FoodNet) indica que 12,82 casos de *Campylobacteriosis* por cada 100.000 habitantes fueron diagnosticados en el

año 2015 (CDC. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet);, 2017). Se estima que la enfermedad afecta a 1,3 millones de personas anualmente, de las cuales 120 personas mueren al año por este patógeno (CDC. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet);, 2014). El costo de la *Campylobacteriosis* para los sistemas de salud pública y la productividad del país fueron evaluados entre 1,2 y 4 mil millones de dólares para los EE. UU (Batz et al., 2011, 2014; Silva et al., 2011). Por otro lado, en la Unión Europea (UE), donde la campylobacteriosis es una de las enfermedades zoonóticas más reportada desde el año 2005, el costo es alrededor de 2,4 mil millones de euros al año (EFSA; ECDC, 2016). En el 2015, la incidencia de infección por *Campylobacter* fue de 65,5 casos por 100,000 habitantes (EFSA; ECDC, 2016), y además se reportó que la mayoría de los brotes de origen alimentario fueron causados por agentes bacterianos, siendo *Campylobacter* el segundo agente etiológico, después de *Salmonella*, asociado principalmente al consumo de leche no pasteurizada y a la carne de pollo y sus derivados (EFSA; ECDC, 2016). En Chile, en el periodo enero 2005 – agosto 2013 se confirmaron en el Instituto de Salud Pública (ISP) un total de 462 cepas de *Campylobacter* spp. y un total de 267 muestras resultaron sugerentes a *Campylobacter* spp. mediante tinción Violeta-Bicarbonato positivo provenientes de coprocultivo, sangre y líquido articular de pacientes de la red asistencial de salud pública y privada (Instituto de Salud Pública, 2014). Durante el periodo 2013 – 2018, hubo 951 casos de *Campylobacteriosis* notificados en el ISP. Se evidenció un aumento del 78% de

los casos reportados en el 2016 comparado con los reportados en el 2017 alcanzando los 127 casos y 213, respectivamente (Instituto de Salud Pública de Chile, 2015). Sin embargo, la notificación y derivación de *Campylobacter* spp. hacia el Laboratorio de Referencia del Instituto de Salud Pública es baja, debido principalmente a que no todos los laboratorios estudian este agente por falta de implementación de técnicas de diagnóstico, a pesar de que desde el año 1983, *Campylobacter* spp. es agente de vigilancia de laboratorio según lo establece el Reglamento sobre Notificación de Enfermedades Transmisibles de Declaración Obligatoria, DS N° 158 (Ministerio de Salud de Chile, 2005). Además, se debe considerar la subnotificación de brotes que existe en Chile, ya que la mayoría de las personas no busca atención médica cuando la sintomatología no es severa (Prado et al., 2002). Actualmente, existen pocos estudios de prevalencia de *Campylobacter* en productos alimenticios en Chile. Además, no se cuenta con la información precisa de los alimentos implicados en los casos reportados y tampoco asociados a brotes de campylobacteriosis. Existe un estudio realizado en Chile, por Fernández y Pisón (1996), donde se analizaron muestras de hígado de pollo en expendio, siendo un 92,9 % (117/126) de estas positivas a la presencia de *Campylobacter*, y que la mayoría (78,6 %) de estos fueron positivos para *C. coli* (Fernández y Pisón, 1996). Por otro lado, el Boletín del Instituto de Salud Pública sobre Vigilancia de laboratorio de *Campylobacter* spp. Chile, 2005 – 2013 especifica que en el total de cepas confirmadas de *Campylobacter* spp. en el periodo de estudio, las especies más frecuentes fueron *C. jejuni* (79,2 %),

C. coli (15,2 %), y *C. fetus* (4,3 %) (Instituto de Salud Pública, 2014). Estos resultados hacen evidente la necesidad de realizar estudios epidemiológicos específicos que relacionen los casos de *Campylobacteriosis* diagnosticados en el país a la presencia de *Campylobacter* spp. en productos alimenticios. Sin embargo, de manera general es aceptado que los alimentos de origen aviar son una fuente importante de infección por *Campylobacter* en humanos (Batz et al., 2014; Hodges et al., 2019; Uyttendaele et al., 2006) y, para los casos de infecciones por *C. jejuni* el consumo de carne de pollo se ha establecido como el principal factor de riesgo (Pielsticker et al., 2016; Suzuki y Yamamoto, 2009). El manejo, la preparación y el consumo de carne de pollo explica el 20-30 % de los casos humanos de *Campylobacteriosis*, mientras que el 50-80 % puede atribuirse al pollo (incluidas las gallinas de postura) como reservorio en su totalidad (EFSA Panel on Biological Hazard, 2011).

1.2. Sistema de producción de carne de pollo y la presencia de *Campylobacter*

Consumo y producción de carne de aves en Chile

La carne de pollo es considerada una fuente importante de proteína de alta calidad en la mayoría de los países, es rica en aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. El pollo desgrasado contiene la misma cantidad de proteínas que la carne asada desgrasada (Silva et al., 2011). En Chile, el consumo de carne de

ave fue de 37,5 Kg por habitante en el año 2013, siendo la principal fuente de proteína animal (ODEPA, 2014). Por otro lado, se proyecta para la próxima década un aumento de 2,6 Kg en el consumo per cápita anual de carnes en los países en desarrollo, de lo cual 60 % correspondería a carne de aves (Echávarri, 2011). En términos de producción, Chile es uno de los mayores productores de pollo en Latinoamérica y la producción avícola es uno de los principales negocios en el país, tanto para el mercado interno como para exportación (Echávarri, 2011). La producción ha crecido en forma sostenida, a una tasa promedio anual de 4,9 % para el período 1994-2013 (Echávarri, 2011; OCDE-FAO, 2014). Los datos de la encuesta de mataderos del año 2017 indican que la producción de aves Broiler alcanzó 632.512,8 toneladas, que corresponde al 88.8% de la producción total de aves (INE, 2018).

Presencia de *Campylobacter* spp. en la producción primaria de pollos

Dado el hecho de que *Campylobacter* es un microorganismo ubicuo, es difícil controlar su introducción y diseminación en las granjas de aves. Esto hace que sea común encontrar granjas de aves colonizadas por *Campylobacter* spp. en muchos países alrededor del mundo (EFSA; ECDC, 2013, 2016; Newell y Fearnley, 2003). La introducción del patógeno desde el ambiente a las aves ocurre usualmente entre la segunda y cuarta semanas de edad (Hermans et al., 2011; Pielsticker et al., 2016). La propagación de manera rápida de *Campylobacter* en las aves se facilita en condiciones de producción intensiva, en

donde coexisten de 10.000 a 30.000 aves por recinto y varios galpones por granja (Skarp et al., 2016). La transmisión horizontal en la granja de aves ocurre predominantemente en la pelecha de las aves o por camas contaminadas. También, el alimento y el agua son fuentes de infección oral - fecal recurrente (Pielsticker et al., 2012). La prevalencia de *Campylobacter* en una granja puede llegar al 95 % luego de su introducción (Van Gerwe et al., 2009). Además, estudios demuestran la coexistencia de clones de *Campylobacter* en una misma granja, por lo tanto, la colonización por más de una cepa en un mismo galpón es posible (Petersen et al., 2001). *C. jejuni* se considera un microorganismo comensal de la flora intestinal de los pollos, lo que conduce a una colonización predominantemente asintomática del intestino, en particular del ciego (10^6 - 10^8 UFC/g) (Beery et al., 1988; Hermans, V. et al., 2011). Esta colonización, en pollos broiler, puede persistir durante toda la vida del animal (6 – 7 semanas), en consecuencia, es muy probable la contaminación de la carcasa en la planta de faenamiento (EFSA Panel on Biological Hazards, 2010; FAO/OMS, 2009; Gruntar et al., 2015). En efecto, Figueroa et. al. en el año 2009, evaluó la presencia de *Campylobacter* termotolerante en dos plantas de faenamiento de pollos en Chile. En dicho estudio se reportó un 54 % (338/625) de muestras positivas, con una gran diferencia de 80 % en la planta B y 41 % en planta A (Figueroa et al., 2009). Esto es congruente con los datos publicados a nivel mundial, donde se reportan prevalencias de *Campylobacter* en plantas de producción de carne de pollo entre

18 - 95 % (EFSA; ECDC, 2013, 2016; Newell y Fearnley, 2003; Van Gerwe et al., 2009).

Las intervenciones actuales utilizadas para controlar *Campylobacter* spp. se aplican a los animales vivos y durante el procesamiento de las canales (Oyarzabal y Backert, 2016). Durante el período de crecimiento, se han realizado varios intentos para controlar *Campylobacter* spp. mediante la aplicación de medidas de bioseguridad. Aunque la cocción de la carne de pollo es también una medida de control para la transmisión de *Campylobacter* spp., la contaminación encontrada en las muestras de pollo requiere un enfoque más amplio para reducir la aparición del patógeno en el producto final.

Lo expuesto anteriormente, deja en evidencia la importancia del pollo como reserva potencial y fuente de infección por *Campylobacter*, por consumo de carne de pollo poco cocida y sus derivados. Por lo tanto, es fundamental para proteger la salud pública, establecer medidas de control que sean capaces de prevenir, eliminar o reducir este patógeno en los distintos eslabones de la cadena de producción.

1.2.1. El proceso de faenamiento de pollos y las medidas de control de la contaminación bacteriana

La frecuencia de *Campylobacter* termotolerante, específicamente la presencia de *C. jejuni* en pollos de corral, motivó a las organizaciones de Salud Pública y de Comercio Internacional a la aplicación de los principios del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (HACCP) (Humphrey et al., 2007). Esta estrategia tiene como objetivo identificar y controlar la presencia de patógenos entéricos en todas las etapas de la cadena alimenticia; en particular en la producción y el procesamiento (Buchanant y Whiting, 1998). Según evidencia descrita en literatura científica, en el proceso de producción de carcasas de pollo se pueden identificar varias etapas que pueden tener una mayor influencia sobre el nivel de contaminación de la carcasa con *Campylobacter* spp (Gruntar et al., 2015; National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 1997; Skarp et al., 2016). La contaminación de la carcasa, durante el proceso de faenamiento ocurre debido al escurrimiento de fecas contaminadas desde la cloaca y la ruptura del ciego hacia las carcasas, el ambiente de la planta y los equipos industriales (Reich et al., 2008). Es importante mencionar que adicionalmente, las carcasas pueden resultar afectadas por contaminación cruzada con cepas de *Campylobacter* ambientales entre distintas parvadas faenadas (Hermans et al., 2011). En efecto, los estudios de Gruntar et al. (2015) sugieren que el nivel de contaminación aumenta en los lotes de

faenamiento sucesivos en una misma planta, lo que es indicativo de la acumulación de *Campylobacter* en el proceso (Gruntar et al., 2015).

El flujo de proceso de faenamiento de pollos se esquematiza en la figura 1.

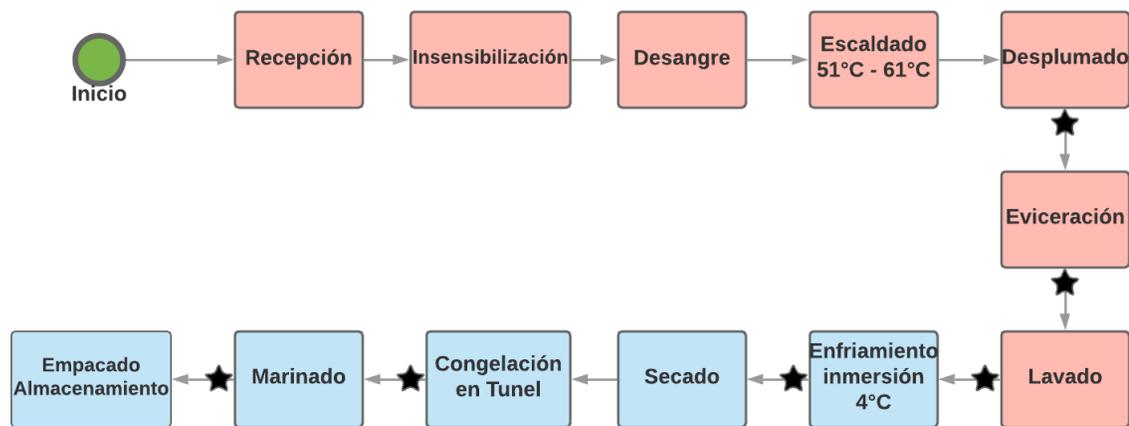


Figura 1. Flujograma de producción de carcasas de pollos broiler en una planta de faenamiento. La zona caliente, como lo hemos denominado en este trabajo de investigación, se representa con cuadros de color rosado – rojizo. Esta zona consta de las etapas de recepción, insensibilización, desangre, escaldado, desplumado, eviscerado, lavado interno y externo de la carcasa. La zona fría, con cuadros de color celeste, que incluye las etapas diseñadas como medidas de mitigación, el enfriamiento y congelación, además incluye el secado, marinado y empacado. En este trabajo de investigación se tomaron muestras de enjuague de carcasas de pollo en los puntos que se resaltan en el flujograma (★).

Durante el proceso de faenamiento, la contaminación ocurre principalmente durante el escaldado, desplumado, evisceración y enfriamiento (Gruntar et al., 2015; Hermans et al., 2011; National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 1997; Reich et al., 2008). Luego de la

insensibilización y el desangrado individual, continua el escaldado; que tiene por objetivo dilatar los poros de la piel para ablandar al máximo las plumas a través de la inmersión en agua a una temperatura de 51 - 61°C, para poder eliminarlas en el proceso del desplume y evitar contaminaciones bacterianas por las plumas en el producto final. El desplumado, cuyo objetivo es eliminar al máximo las plumas presentes en las aves para lograr una mejor presentación del producto, se realiza mediante un masaje con dedos de caucho. La evisceración, es la etapa que se realiza mediante la introducción de una cuchara mecánica, a través de la abertura hecha en el precorte. Este brazo atrapa el contenido abdominal, lo jala y expone el exterior del pollo sin cortarlo. Posteriormente, se produce la extracción de intestinos y la cosecha mecánica de hígado, molleja y corazón. En este momento se produce la carcasa de pollo, que corresponde al esqueleto y músculos o carne de pollo desplumado sin vísceras, cuello y patas. A continuación, las carcasas se someten a la combinación de medidas de control, que incluye: el lavado con desinfectante y el enfriamiento en tinas de agua o aire frío y congelación (Air Products and Chemincal, 2017). El lavado se efectúa en una máquina que lava las carcasas con agua potable a gran presión con o sin desinfectante (cloro), tanto por dentro como por fuera. Su finalidad es eliminar la contaminación provocada por la evisceración, desplumado o escaldado, de modo de llegar a la sala de enfriado con una carcasa en óptimas condiciones de limpieza. El posible efecto del cloro sobre los microorganismos es la oxidación de componentes celulares que resulta en muerte celular, aunque hay poca

información científica sobre la reducción real de *Campylobacter* por el uso de cloro (Oyarzabal y Backert, 2016). Mead et al. (1995) reportaron que hubo reducción en los niveles de *Campylobacter* en las carcasas de pollo, sin embargo, concluyeron que la reducción no es significativa para preservar la salud pública (Mead et al., 1995).

Luego, continúa la etapa de enfriamiento por agua o aire que se realiza con el objetivo de lavar, desinfectar y disminuir la temperatura interna de las aves, esta etapa disminuye la carga microbiana y aumenta la vida útil del producto. La etapa de enfriamiento ha sido identificada como un Punto Crítico de Control (PCC) en un estudio genérico de HACCP de contaminación por patógenos de aves de corral (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 1997). Se ha reportado que los niveles de reducción de *Campylobacter* son similares en las operaciones de enfriamiento (Rosenquist et al., 2006). Cuando se emplea el enfriamiento por inmersión, el agua se encuentra a una temperatura inferior a 4 °C, y si se aplica el enfriado por aire, las aves atraviesan un túnel de aire con temperatura inferior o igual a 1,5 °C. Esta medida de control es plausible; ya que, el análisis de la secuencia genómica de *C. jejuni* se evidencia la ausencia de proteínas de shock térmico frío, lo que hace imposible para esta bacteria replicarse a bajas temperaturas (Park, 2002); pero sí puede sobrevivir bajo las condiciones de almacenamiento frías de la carne de pollo hasta su comercialización (EFSA Panel on Biological Hazards, 2010). La congelación de

carcasas de pollo es una medida de control, que ha reportado reducciones significativas de presencia de *Campylobacter* spp. en carcasas de pollo (Gruntar et al., 2015; Rosenquist et al., 2006; Stern et al., 1985). Según Humphrey et al. (2007) señalan que la congelación inhibe el crecimiento de *Campylobacter*, reduciendo su número, pero no eliminándolos completamente en alimentos congelados, como carcasas de pollo (Humphrey et al., 2007). Esto puede ser explicado porque *Campylobacter* puede persistir en los folículos de las plumas de las aves, así como penetrar en la piel, manteniéndose protegido frente a las condiciones de estrés ambiental (Jang et al., 2007). Las medidas de control contribuyen a reducir la exposición de *Campylobacter*. Aún cuando es incapaz de replicarse a temperaturas de almacenamiento de alimentos, *C. jejuni* es metabólicamente activo a temperaturas mucho menor de 30 °C, siendo capaz de realizar respiración y síntesis de ATP a 4 °C. Inclusive a esta temperatura el microorganismo mantiene su capacidad móvil, posibilitando su movimiento hacia ambientes más favorables (Park, 2002), y donde le permitan ejecutar mecanismos de sobrevivencia, como la formación de biopelículas.

1.2.2. Formación de biopelículas de *Campylobacter* y su relación con las plantas de faenamiento de pollos

La formación de biopelículas de *Campylobacter*

Existen estudios que describen que *Campylobacter* ha desarrollado mecanismos de supervivencia ante condiciones desfavorables (Murphy et al., 2006). A pesar de presentar las características especiales de cultivo, que se mencionan anteriormente, existe una tendencia ascendente en la incidencia de casos por infección de *Campylobacter* spp. en humanos (EFSA; ECDC, 2013, 2016; EFSA, 2014; Kaakoush et al., 2015). Uno de los mecanismos de supervivencia de las bacterias es la formación de biopelículas (Buswell et al., 1998; Joshua, 2006). En general, se considera que la formación de biopelículas es una estrategia de supervivencia microbiana frente a condiciones ambientales estresantes, tales como la radiación ultravioleta, depredación y desecación (Roberta Torres de Melo et al., 2016).

Las biopelículas bacterianas se definen como una población de microorganismos mono o multi-especies, que están unidos a una superficie biótica o abiótica; conectadas por una sustancia polimérica extracelular. La composición de la matriz extracelular varía dependiendo de las especies microbianas implicadas; pero generalmente contiene ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos (Brown et al., 2015; Donlan, 2002; Flemming y Wingender, 2010;

Toole et al., 2000; Turonova et al., 2016). Las células en la matriz se comunican mediante el mecanismo de *quorum-sensing*; que es también un factor importante en la adaptación de *Campylobacter* al medio ambiente y formación de biopelículas (Plummer, 2012). La formación de biopelículas de *C. jejuni* se ha asociado con la capacidad de colonización intestinal y a la tolerancia al estrés durante la patogénesis (Svensson et al., 2009). Se reportó que las cepas de *Campylobacter* presentan distintas capacidades de formar biopelículas (Revez et al., 2011; Teh et al., 2010). En efecto, las investigaciones realizadas por Pascoe et al. (2015) sugieren que los determinantes genéticos para la formación de biopelículas difieren entre las especies denominadas como hospederos generalistas (que pueden colonizar y transmitirse por medio de múltiples especies de hospederos) y hospederos especialistas (que pueden colonizar y transmitirse por medio de una especie de hospedero). Los autores investigaron la base genética de la formación de biopelículas en 102 cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas de diferentes hospederos y de muestras clínicas. Se reportaron 46 genes asociados a la formación de biopelículas; incluyendo los genes involucrados en los mecanismos de adhesión, motilidad, glicosilación, producción de cápsula y estrés oxidativo. Las cepas de *C. jejuni* generalistas presentaron mayor capacidad de formación de biopelículas que las cepas clasificadas genéticamente como hospedero específico de pollo y vacuno. Estos resultados sugieren que la capacidad de formación de biopelículas puede ser una adaptación evolutiva para la transmisión de *Campylobacter* hasta el hospedero

humano, ya que las bacterias están expuestas a altas concentraciones atmosféricas de oxígeno al dejar el intestino del hospedero reservorio (Oh et al., 2015; Pascoe et al., 2015).

En los procesos de producción de alimentos se presentan condiciones de estrés ambiental que *Campylobacter* tiene que superar; como las variaciones de temperatura, falta de nutrientes y la exposición a altas concentraciones de oxígeno (Teh et al., 2014). Se ha reportado que *C. jejuni* puede sobrevivir en las condiciones adversas del proceso de faenamiento debido a su capacidad para formar biopelículas mono-especies (Brown et al., 2014) o integrarse en las biopelículas pre-existentes (Culotti y Packman, 2015; Hanning et al., 2008; Teh et al., 2010). Considerando que, durante el procesamiento de alimentos, y también durante la transferencia al hospedero, *Campylobacter* está expuesto a concentraciones de oxígeno atmosférico y a pesar de esto sigue siendo viable para causar infección, Reuters et al (2010) examinaron la formación de biopelículas en condiciones aeróbicas y lo compararon con un grupo control sometido a atmósfera microaerobia. Los investigadores reportaron que el nivel de formación de biopelículas en condiciones aerobias fue el doble que el observado en condiciones microaeróbicas (Reuter et al., 2010). Otros estudios señalan que las cepas de *Campylobacter* presentan distintas capacidades de formar biopelículas (Melo et al., 2017; Pascoe et al., 2015; Teh et al., 2010). Por otro lado, la exposición a concentración de oxígeno atmosférico aumenta la

capacidad de formación de biopelículas en las cepas de *C. jejuni* generalistas en comparación con *C. jejuni* especialista y *C. coli* (Pascoe et al., 2015).

La contaminación de la carcasa de pollo, además de producirse por escurrimiento de fecas contaminadas, puede ser ocasionada por contaminación cruzada (Garcia-Sanchez et al., 2017; Hue et al., 2011; Rosenquist et al., 2006). Si el procedimiento de sanitización no es eficaz; entonces, pueden formarse biopelículas. En este caso, generalmente, los desinfectantes no penetran en la matriz de biopelículas; por lo tanto, no logra destruir todas las células vivas en las biopelículas (Simões et al., 2010). En la planta de faenamiento de pollos, las bacterias como *Campylobacter* y la formación de biopelículas microbianas pueden resistir los procesos de sanitización (Garcia-Sanchez et al., 2017; Peyrat et al., 2008a, 2008b; Teh et al., 2014). En efecto, Lourdes García-Sánchez et al. (2017) reportaron que *C. jejuni* puede sobrevivir en condiciones ambientales adversas, incluso después de la limpieza y desinfección, y persistir durante al menos 21 días en el entorno de la planta de faenamiento (Garcia-Sanchez et al., 2017).

La formación de biopelículas normalmente se relaciona con la acumulación de materia orgánica que protege a las bacterias frente a los agentes sanitizantes (Garcia-Sanchez et al., 2017). Esto aumenta el riesgo de contaminación del producto final ya que las biopelículas se constituyen como fuentes de

contaminación recurrente en el proceso productivo (González-hein et al., 2013; Teh et al., 2014). Es por ello, que la limpieza debe ser efectiva para eliminar la materia orgánica protectora de la superficie, previo a la aplicación de los desinfectantes. Los productos químicos de desinfección ocupados en la industria son a base de ácido peracético, peróxidos, formalina y glutaraldehído. Estos provocan la oxidación o la ruptura de la membrana celular, la desnaturalización de proteínas citoplásmicas, o la reducción del pH interno de la célula (Chmielewski y Frank, 2007). Sin embargo, algunos investigadores indican que los programas convencionales de limpieza y desinfección no previenen la formación de biopelículas, por ejemplo, cuando se aplican los desinfectante en concentraciones subletales, lo que contribuye a la diseminación de microorganismos resistente a biocidas (Simões et al., 2010; Techaruvichit et al., 2016). En general, no existe una estrategia única, con una eficiencia absoluta, para el control de biopelículas, es por eso que es recomendable la validación de los procedimientos de limpieza y desinfección (Simões et al., 2010) ocupando, preferiblemente, cepas aisladas *in situ*; ya que cuentan con el perfil genético que les permite sobrevivir en ambientes desfavorables dentro de la planta de faenamiento.

Considerando que:

a) La capacidad de formación de biopelículas es un mecanismo adaptativo propio de *Campylobacter*.

b) Existe evidencia de que las cepas de una misma especie difieren en su capacidad para formar biopelículas.

c) No se ha reportado información que asocie la capacidad de formación de biopelículas de *Campylobacter* aisladas desde carcasas de pollo y si existe alguna relación con las etapas del proceso de faenamiento.

d) Es relevante conocer la eficacia bactericida de los desinfectantes utilizados en la industria sobre cepas de *Campylobacter* termotolerantes aisladas de carcasas de pollo, como parte de la validación de los procedimientos de limpieza y desinfección. Plateamos las siguientes hipótesis.

HIPÓTESIS

Hipótesis 1: La capacidad de formación de biopelículas es mayor en las cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas después de la aplicación de medidas de mitigación durante el proceso de faenamiento de pollos Broiler.

Hipótesis 2: Los desinfectantes utilizados en la planta de faenamiento de pollos, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, eliminan eficazmente a *Campylobacter* termotolerantes en ensayos de suspensión bacteriana.

OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Caracterizar la capacidad de formación de biopelículas y el *fitness* en *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas desde carcasas de pollos broiler en las diferentes zonas de proceso dentro de una planta de faenamiento en Chile; y evaluar la eficacia de los productos desinfectantes utilizados para su eliminación.

3.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar la formación de biopelículas *in vitro* en las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas desde carcasas de pollo en distintas zonas del proceso de faenamiento.
- Evaluar en las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* la capacidad de sobrevivir y replicarse en condiciones de estrés oxidativo y estrés térmico.
- Evaluar la eficacia bactericida de cuatro productos comerciales desinfectantes, utilizados en la industria avícola.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

Para el desarrollo y el mantenimiento de las cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, en el laboratorio, es necesario satisfacer los requerimientos nutricionales, y, especialmente, las condiciones de microaerofilia definidas: 85% de N₂, 10% de CO₂ y 5% de O₂ (Davis and DiRita, 2008). Para ello, se utilizó el Sistema de Recipientes GasPak™ EZ que permite crear las condiciones de microaerofilia mediante el uso de sobres o *sachets* generadores de gas CampyGen™ de Thermo Scientific, Oxoid Ltd. Basingstoke, UK. Este sistema se utilizó en el desarrollo de las cepas en medios de cultivos sólidos y líquidos.

Para realizar los ensayos de biopelículas se ocuparon placas de microtitulación de poliestireno, de 96 pocillos, fondo plano, estéril, con tapa de marca Corning® Costar® de Sigma Aldrich – Merck. Para realizar la tinción de biopelículas se utilizó la solución de Cristal Violeta al 0,5% (p/v).

La solución de agua peptonada tamponada (APT) se preparó con peptona deshidratada de Thermo Scientific, Oxoid Ltd. Basingstoke, UK. Esta solución se

utilizó para realizar las diluciones progresivas de suspensión bacteriana. Corresponde a una solución de APT que contiene cloruro de sodio al 0,5% para mantener el balance osmótico (ICMSF, 2000); ya que *Campylobacter* spp. son más sensibles al estrés osmótico que otros patógenos bacterianos transmitidos por los alimentos. Por ejemplo, *C. jejuni* crece mejor a una concentración de cloruro de sodio del 0,5% y no crece en ausencia de cloruro sódico o en presencia de concentraciones de cloruro de sodio del 2% o más (Doyle and Roman, 1982; Park, 2002).

Los desinfectantes estudiados son productos comerciales utilizados en la producción primaria y/o en la industria de alimentos, específicamente utilizados en la planta de faenamiento de pollos de donde se aislaron las cepas de este estudio. La composición de los desinfectantes es la siguiente:

- Desinfectante A **Ácido peracético 5,0%**, ácido acético y peróxido de hidrógeno.
- Desinfectante B **Peróxido de hidrógeno 15%**, ácido acético 10% y ácido peracético 12%.
- Desinfectante C **Glutaraldehído 20%** y alcoholes C12-14 secundarios, etoxilados 3,0%.
- Desinfectante D **Formalina 37%**, metanol.

4.1.1. Medios de cultivo bacteriano

Las placas de Agar TSA II TM (Trypticase TM Soy Agar) suplementadas con 5% de sangre de ovino se obtuvieron de Becton, Dickinson and Company, Le Point de Claix, Francia. Estas se utilizaron para reactivar metabólicamente las cepas preservadas a - 80°C, según como se detalla más adelante. También se ocuparon placas de agar sangre de elaboración propia. Estas se elaboraron añadiendo 700 µL de sangre de ovino, que fue facilitada por el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), en 15 mL de Agar de Soya – caseína estéril; para cada placa Petri. El producto BBL TM Trypticase Soy Agar se obtuvo de Becton, Dickinson and Company, Le Point de Claix, Francia.

Para mantener las cepas de *Campylobacter* metabólicamente activas, se sembraron en placas de Agar Mueller Hinton Difco TM, que se obtuvo de Becton, Dickinson and Company, Le Point de Claix, Francia. También, se ocupó caldo Mueller Hinton (MH) para el desarrollo de las cepas en medio líquido en los ensayos de biopelículas. El caldo MH se obtuvo de Oxoid LTD., Basingtoke, Hampshire, Inglaterra.

Para realizar los recuentos en placas de siembra por extensión en superficie, se ocuparon placas Petri con Agar selectivo para *Campylobacter* exento de sangre (Modified charcoal-cefoperazone-deoxycholate agar, o por sus siglas en inglés: mCCDA) de Sigma Aldrich-Merck, Darmstadt, Alemania. En los

ensayos de validación de neutralización se utilizaron placas Petri con agar Nutritivo de Oxoid LTD., Basingtoke, Hampshire, Inglaterra.

4.1.2. Material biológico

Las cepas de este estudio se obtuvieron de una planta de faenamiento de pollos, ubicada en la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins, que faena pollos de sus propias granjas y distribuye el producto (pollo entero congelado) en todo el territorio nacional. El personal de nuestro laboratorio visitó la planta en 12 ocasiones entre diciembre de 2016 y junio de 2017, donde se recolectaron muestras de enjuague de carcasas. En el laboratorio, se procedió al aislamiento de *Campylobacter* siguiendo la metodología de la Norma Nórdica NMKL 119 (Nordic Committee on Food Analysis, 2007). Las muestras de enjuague de carcasas se recolectaron en distintas etapas del proceso que se destacan en la Figura 1. Para el desarrollo de este proyecto, se ocuparon las cepas aisladas e identificadas, previamente, a nivel molecular por PCR según especie, *C. jejuni* y *C. coli* (Wang et al., 2002). Las cepas aisladas se preservaron en el Laboratorio de Inocuidad Alimentaria (LIA) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, almacenadas a -80°C en criotubos con sangre de ovino.

Bioseguridad: *Campylobacter* spp. Es clasificado como un agente de riesgo moderado, por lo que requiere contención de bioseguridad nivel 2 (Favi et al., 2013). Para el desarrollo de este trabajo se tomaron las siguientes medidas de bioseguridad:

- ✓ Los guantes, las mascarillas y el delantal fueron los elementos de protección del personal utilizados en los procedimientos de laboratorio.
- ✓ Las manos y las superficies de trabajo se desinfectaban con alcohol 70% antes y después de trabajar con agentes bacterianos.
- ✓ Los procedimientos en que se manipulaban bacterias vivas eran realizados en cabina de bioseguridad clase IIA.
- ✓ Los desechos biológicos se recolectaron en bolsas de autoclave, las cuales se procesaron adecuadamente por personal capacitado.

4.2. Métodos

4.2.1. Cultivo y mantención de cepas

Reactivación de cepas de *C. jejuni* y *C. coli*

Para la reactivación metabólica, se procedió a sembrar las cepas desde los criotubos en las placas de agar sangre. Las placas se introdujeron en un recipiente GasPak™ EZ donde se establecieron las condiciones de microaerofilia con los sobres generadores de gas CampyGen™. El sistema antes descrito se incubó a 42°C durante 48 h.

Cultivo de trabajo de cepas de *C. jejuni* y *C. coli* para los ensayos de biopelículas

A partir de los cultivos en placas de agar sangre después de la reactivación metabólica, se sembraron en agar MH y se incubaron a 37°C en condiciones de microaerofilia, durante aproximadamente 24 h. Posteriormente, se fijaron las muestras en porta objetos y se procedió a teñir con Cristal Violeta. Las muestras se observaron en el microscopio, para comprobar el fenotipo (morfología de bacilos curvos) característico de *Campylobacter spp.* Finalmente, las cepas se inocularon en caldo MH, y se incubaron a 37°C en condiciones de microaerofilia, durante 48 h.

4.2.2. Ensayo de tinción de biopelículas mediante cristal violeta

Para realizar los ensayos de tinción de biopelículas, se ocuparon 52 cepas de *Campylobacter* termotolerantes (n = 27 *C. jejuni* y n = 25 *C. coli*). El cultivo de trabajo, en caldo MH, de cada cepa se ajustó a OD₆₀₀ = 0,230; que equivale a 10⁸ UFC/mL según estimación realizada en nuestro laboratorio (anexo 1).

Para caracterizar la formación de biopelículas *in vitro* se llevaron a cabo dos tratamientos bajo condiciones de estrés oxidativo y estrés térmico:

Tratamiento 1: A partir del cultivo de trabajo, se añadieron 200 µL a cada pocillo de la placa de poliestireno. Las placas se cubrieron con su tapa y se incubaron por 48 h, a 37°C en condición aeróbica. La situación control negativo contenía solo caldo MH.

Tratamiento 2: Los cultivos de trabajo se sometieron a *shock* térmico a 4°C durante 2 h. Posteriormente, se tomaron 200 µL de cultivo de trabajo y se añadieron a cada pocillo de la placa de poliestireno. Las placas se cubrieron con su tapa y se incubaron por 48 h, a 37°C en condición aeróbica. La situación control negativo contenía solo caldo MH.

Después de 48 h, se realizó la tinción de las biopelículas. Para ello, se extrajo el cultivo de cada pocillo, se lavó con solución buffer fosfato (PBS) para retirar las bacterias de la fracción planctónica que pudieron haber quedado sobre la biopelícula. Posteriormente, se dejó secando por 30 min a 42°C. Luego, se agregó 200 µL de cristal violeta al 0,5% en cada pocillo de la placa y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 15 min. Los pocillos se lavaron dos veces con agua destilada para eliminar el exceso de colorante y se dejó secar por 30 min a 42°C. Para desprender el material adherido a las paredes de los pocillos, se agregó 200 µL de solución 80% etanol – 20% acetona. Finalmente, se midió por espectrofotometría la densidad óptica de cada pocillo en la longitud de 570 nm (Reeser et al., 2007).

Los datos resultantes se agruparon en categorías según la densidad óptica de corte (OD_c), la que se define como la densidad óptica promedio alcanzada por los pocillos control negativo de la placa más tres desviaciones estándar. Las cepas se agruparon según las siguientes categorías:

- **No formadoras** de biopelículas, cuando la densidad óptica es menor o igual a la OD_c,
- **Formadoras débiles** de biopelículas, cuando la densidad óptica es mayor a la OD_c pero menor o igual a dos veces la OD_c (2xOD_c),

- **Formadoras moderadas** de biopelículas, cuando la densidad óptica es mayor a dos veces la ODc (2xODc) pero menor a cuatro veces la ODc (4xODc), y
- **Formadoras fuertes** de biopelículas, cuando la densidad óptica es mayor a cuatro veces la ODc (4xODc) (Xu et al., 2016).

Recuento de células viables para el ensayo de biopelículas.

Se determinó el número de células viables desde las biopelículas con el propósito de corroborar la viabilidad de las bacterias en suspensión tras ser sometidas a estrés oxidativo y/o estrés térmico (según condiciones del tratamiento 1 y 2). Para esto, se tomó 100 μ L de la fase planctónica de cada pocillo y seguidamente se realizaron diluciones decimales en caldo MH. Posteriormente, se sembraron alícuotas de 100 μ L de cada dilución en placas de mCCDA y se incubaron a 37°C durante 48 h. Finalmente, se contaron las colonias formadas y se calculó la UFC/mL como se describe en detalle en la sección 4.2.4.

4.2.3. Ensayo de eficacia bactericida de desinfectantes en suspensión

4.2.3.1. Validación del método de neutralización

Con el fin de validar que la solución neutralizante universal no afecta la viabilidad de las bacterias se realizó la prueba de toxicidad. En la prueba de toxicidad se ocupó una cepa de *C. jejuni*, como cepa de estudio; y como control, se utilizó una cepa de *Salmonella* spp. La cual ha sido objeto de estudio en nuestro laboratorio, anteriormente, en ensayos de eficacia bactericida utilizando la solución neutralizante universal. La solución neutralizante universal se compone de los siguientes elementos:

Tween 80 30ml/100ml

NaHSO₃ 6,25ml (40%)

Na₂S₂O₃ 3,92g

Diluyente c.s.p. 250ml:

Peptona 1g

NaCl 8,5g

H₂O 1000ml

La metodología que se desarrolló es la siguiente: A partir de un inóculo de trabajo, se diluyó 1:100 en solución neutralizante. Luego, se realizaron diluciones decimales en solución APT (US EPA, 2016). Posteriormente, se tomaron

alícuotas de 100 μ L desde la dilución 10^{-2} hasta 10^{-7} y se sembraron en placas de agar para el recuento. Para la cepa de *C. jejuni*, se sembraron en placas de agar mCCDA y se incubaron a 42 °C en condiciones de microaerofilia, durante 48 h. Para la cepa de *Salmonella* spp., se sembraron en placas de agar nutritivo y se incubaron a 37 °C por 24 h. Se espera que luego de la exposición a la solución neutralizante, si la solución no afectó la viabilidad, entonces no debe haber reducción decimal en el número de microorganismos viables.

4.2.3.2. Ensayos de eficacia bactericida

Para efectuar el ensayo de eficacia bactericida, se estandarizó el cultivo de trabajo, mediante espectrofotometría. Para ello, se tomaron varias colonias de la cepa en agar MH y se suspendieron en solución APT. La turbidez se ajustó a $OD_{600} = 0,315$, que corresponde a 1×10^9 UFC/mL (estimación realizada en nuestro laboratorio, anexo 1), y de la cual se extrajo una alícuota de 100 μ L para realizar el recuento inicial en los distintos ensayos independientes.

Los ensayos de eficacia bactericida de los desinfectantes se desarrollaron en base a procedimientos similares (Gutiérrez-Martín et al., 2011; US EPA, 2016). Las diluciones de los desinfectantes se prepararon de acuerdo con las recomendaciones de uso. Se utilizó agua destilada estéril como diluyente. Los

desinfectantes se prepararon en las concentraciones que se describe a continuación:

- Desinfectante A 0,05% v/v
- Desinfectante B 0,02% v/v
- Desinfectante C 0,1% v/v
- Desinfectante D 4,0% v/v

Los ensayos se llevaron a cabo de la siguiente manera, en un tubo Eppendorf que contenía 900 μL de desinfectante se añadieron 100 μL de suspensión bacteriana de la cepa de *Campylobacter* termotolerante (cultivo de trabajo $\text{OD}_{600}=0,315$). El tubo Eppendorf se agitó vigorosamente y se dejó actuar durante 5 minutos, a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de contacto, e inmediatamente después, se extrajo 10 μL de la mezcla (suspensión bacteriana + desinfectante) y se añadió a 990 μL de solución APT, para diluir el desinfectante y de esta manera neutralizarlo (Best et al., 1988; Gutiérrez-Martín et al., 2011). Posteriormente, se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-7} . A partir de cada dilución, se extrajo 100 μL y se sembró por extensión en superficie en placas de agar mCCDA. Las placas se incubaron a 42°C en condiciones de microaerofilia, durante 48 h. Los datos de recuento en placa se reportaron como valores de UFC/mL promedio de duplicados de los ensayos independientes. Finalmente, se calculó el valor de la eficacia bactericida que corresponde al porcentaje de

microorganismos que son eliminados por la acción del desinfectante, y se obtiene a partir de la siguiente expresión:

$$\% \text{ Eficacia} = \frac{N_0 - N_f}{N_0} \times 100$$

Donde:

N_0 : número de microorganismos iniciales.

N_f : número de microorganismos sobrevivientes al final del tiempo de contacto.

El criterio de eficacia que se utilizó fue: se acepta un producto químico como agente desinfectante eficiente, si el compuesto elimina el 99,999% (6-log_{10}) de una cierta población de microorganismos, de acuerdo a investigaciones similares (Ayres et al., 1980; Best et al., 1988; Rodríguez Ferri et al., 2010; Gutiérrez-Martín et al., 2011).

4.2.4. Recuento en placa de siembra por extensión en superficie

Para realizar el cálculo de recuento en placa de siembra por extensión en superficie se eligieron dos placas, correspondientes a una dilución, que presentaron entre 30 y 300 colonias por placa. Se contaron todas las colonias de cada placa utilizando el contador de colonias y el dispositivo de registro automático. Se obtuvo la media aritmética de los dos valores y se multiplicó por

el factor de dilución (el inverso de la dilución cuyas placas fueron seleccionadas). Si todas las placas presentaron más de 300 colonias, se dividieron las dos placas en secciones radiales (2, 4 u 8) y se contaron todas las colonias que se presentaron en una o más secciones. Posteriormente, se multiplicó el total de las colonias obtenidas en cada caso por el factor adecuado, con el fin de conseguir una estimación del número total de colonias presentes en la placa. Se obtuvo la media del valor estimado por las dos placas y se multiplicó por el factor de dilución correspondiente. El valor obtenido se reportó como el recuento estándar en placa estimado (ICMSF, 2000).

En el caso en que no se encontraron colonias en las placas correspondientes a la dilución más concentrada, se expresó el recuento estándar en placa estimado como inferior a ($<$) 1 multiplicado por el factor de dilución más concentrada. (ICMSF, 2000).

4.2.5. Análisis estadístico de los datos

Los datos de los ensayos de biopelículas no permitieron aplicar alguna prueba estadística que nos permitiera asociar los resultados; y para los datos de eficacia bactericida de desinfectantes se debe considerar que las concentraciones recomendadas, y los principios activos de los productos ensayados no eran iguales, hecho que no permitió efectuar una comparación efectiva. Por lo tanto,

el análisis de los datos y la comparación entre ellos se realizaron de forma cualitativa e individual.

RESULTADOS

5.1. Formación de biopelículas de cepas de *Campylobacter* termotolerantes

La formación de biopelículas de las cincuenta y dos cepas de *Campylobacter* termotolerantes (*C. jejuni* n = 27 y *C. coli* n = 25) fue evaluada según dos tratamientos; 1) Incubación por 48 h, a 37°C en condición aeróbica. 2) *Shock* térmico previo a 4°C durante 2 h. Luego, incubaron por 48 h, a 37°C en condición aeróbica.

Al medir la absorbancia (OD₅₇₀) de las biopelículas solubilizadas, se reportaron valores desde 0,123 a 0,624. Los datos, posteriormente, fueron clasificados según la OD_c (OD_c es la densidad óptica promedio alcanzada por los pocillos control negativo de cada lectura más tres desviaciones estándar). El valor de la OD_c fue 0,450. A partir de este valor se definieron las siguientes categorías:

No formadora de biopelículas: $OD \leq 0,45$

Formación débil: OD entre 0,46 y 0,90

Formación moderada: OD entre 0,91 y 1,80

Formación fuerte: $OD > 1,80$

En el ensayo de formación de biopelículas, las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas fueron sometidas a condiciones, *in vitro*, de temperatura 37°C en ambiente aeróbico (estrés oxidativo) por 48 h. Los resultados de la formación de biopelículas en estas condiciones se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Codificación de la cepa, sitio de aislamiento, y formación de biopelículas de cepas sometidas a estrés oxidativo, de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas de cacasas de pollo en el proceso de faenamiento

| <i>Campylobacter jejuni</i> | | | | <i>Campylobacter coli</i> | | | |
|-----------------------------|----------|-------------------------------|--------------|---------------------------|----------|-------------------------------|--------------|
| Sitio de aislamiento | Código | Biofilms (OD ₅₇₀) | Categoría | Sitio de aislamiento | Código | Biofilms (OD ₅₇₀) | Categoría |
| Post Desplumado | PD 1-1 | 0.149 | No Formadora | Post Desplumado | PD 1-2 | 0.382 | No Formadora |
| Post Desplumado | PD 3-4 | 0.135 | No Formadora | Post Desplumado | PD 4-1 | 0.303 | No Formadora |
| Post Desplumado | PD 8-1 | 0.165 | No Formadora | Post Eviscerado | PE 5-1 | 0.344 | No Formadora |
| Post Desplumado | PD 9-1 | 0.148 | No Formadora | Post Eviscerado | PE 20-2 | 0.363 | No Formadora |
| Post Desplumado | PD 9-3 | 0.152 | No Formadora | Post Eviscerado | PE 21-2 | 0.248 | No Formadora |
| Post Desplumado | PD 11-3 | 0.166 | No Formadora | Post Eviscerado | PE 11-2 | 0.341 | No Formadora |
| Post Desplumado | PD 12-3 | 0.164 | No Formadora | Post Eviscerado | PE 2-5 | 0.243 | No Formadora |
| Post Desplumado | PD 19-3 | 0.153 | No Formadora | Post Lavado | PL 3-5 | 0.369 | No Formadora |
| Post Desplumado | PD 19-3 | 0.226 | No Formadora | Post Lavado | PL 1-1 | 0.280 | No Formadora |
| Post Desplumado | PD 14-3 | 0.234 | No Formadora | Post Lavado | PL 3-3 | 0.379 | No Formadora |
| Post Desplumado | PD 19-1 | 0.221 | No Formadora | Post Lavado | PL 5-5 | 0.260 | No Formadora |
| Post Desplumado | PD 19-2 | 0.241 | No Formadora | Post Chiller | PCH 2-5 | 0.259 | No Formadora |
| Post Eviscerado | PE 17-3 | 0.188 | No Formadora | Post Chiller | PCH 3-4 | 0.265 | No Formadora |
| Post Eviscerado | PE 19-3 | 0.214 | No Formadora | Post Chiller | PCH 4-2 | 0.266 | No Formadora |
| Post Eviscerado | PE-13-3 | 0.292 | No Formadora | Post Chiller | PCH 3-5 | 0.259 | No Formadora |
| Post Eviscerado | PE 1-1 | 0.143 | No Formadora | Post Chiller | PCH 7-2 | 0.468 | Débil |
| Post Lavado | PL 12-1 | 0.210 | No Formadora | Post Chiller | PCH 17-2 | 0.481 | Débil |
| Post Chiller | PCH 12-2 | 0.127 | No Formadora | Post Chiller | PCH 20-1 | 0.380 | No Formadora |
| Post Chiller | PCH 13-3 | 0.149 | No Formadora | Post Chiller | PCH 6-1 | 0.421 | No Formadora |
| Post Chiller | PCH 13-1 | 0.220 | No Formadora | Post Chiller | PCH 8-1 | 0.433 | No Formadora |
| Post Túnel Frío | PTF 11-3 | 0.128 | No Formadora | Post Chiller | PCH 5-4 | 0.223 | No Formadora |
| Post Túnel Frío | PTF 40-1 | 0.624 | Débil | Post Túnel Frío | PTF 3-5 | 0.320 | No Formadora |
| Post Marinado | PM 11-2 | 0.414 | No Formadora | Post Túnel Frío | PTF 1-3 | 0.249 | No Formadora |
| Post Marinado | PM 12-1 | 0.123 | No Formadora | Post Túnel Frío | PTF 1-4 | 0.263 | No Formadora |
| Post Marinado | PM 13-1 | 0.465 | Débil | Post Túnel Frío | PTF 2-3 | 0.307 | No Formadora |
| Post Marinado | PM 17-2 | 0.439 | No Formadora | | | | |
| Post Marinado | PM 11-3 | 0.160 | No Formadora | | | | |

La densidad óptica de corte (OD_c) fue de 0.450

Los cultivos de trabajo se sometieron a *shock* térmico para evaluar el efecto del estrés térmico en la formación de biopelículas. Para esto, se realizó el ensayo en las condiciones del tratamiento 2. Los cultivos de trabajo permanecieron a 4°C (estrés térmico) durante 2 h. Posteriormente, las placas de microtitulación se incubaron en condición aeróbica (estrés oxidativo) a 37°C por 48 h. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Codificación de la cepa, sitio de aislamiento, y formación de biopelículas de cepas sometidas a estrés oxidativo y estrés térmico, de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas de carcasas de pollo en el proceso de faenamiento

| <i>Campylobacter jejuni</i> | | | | <i>Campylobacter coli</i> | | | |
|-----------------------------|----------|----------------------------------|--------------|---------------------------|----------|----------------------------------|--------------|
| Sitio de aislamiento | Código | Biopelícula (OD ₅₇₀) | Categoría | Sitio de aislamiento | Código | Biopelícula (OD ₅₇₀) | Categoría |
| Post Desplumado | PD 1-1 | 0.161 | No Formadora | Post Desplumado | PD 1-2 | 0.437 | No Formadora |
| Post Desplumado | PD 3-4 | 0.147 | No Formadora | Post Desplumado | PD 4-1 | 0.367 | No Formadora |
| Post Desplumado | PD 8-1 | 0.185 | No Formadora | Post Eviscerado | PE 5-1 | 0.326 | No Formadora |
| Post Desplumado | PD 9-1 | 0.161 | No Formadora | Post Eviscerado | PE 20-2 | 0.357 | No Formadora |
| Post Desplumado | PD 9-3 | 0.158 | No Formadora | Post Eviscerado | PE 21-2 | 0.248 | No Formadora |
| Post Desplumado | PD 11-3 | 0.170 | No Formadora | Post Eviscerado | PE 11-2 | 0.318 | No Formadora |
| Post Desplumado | PD 12-3 | 0.152 | No Formadora | Post Eviscerado | PE 2-5 | 0.312 | No Formadora |
| Post Eviscerado | PE 1-1 | 0.133 | No Formadora | Post Lavado | PL 3-5 | 0.482 | Débil |
| Post Chiller | PCH 13-1 | 0.196 | No Formadora | Post Lavado | PL 1-1 | 0.277 | No Formadora |
| Post Chiller | PCH 13-3 | 0.164 | No Formadora | Post Lavado | PL 3-3 | 0.380 | No Formadora |
| Post Túnel Frío | PTF 11-3 | 0.158 | No Formadora | Post Lavado | PL 5-5 | 0.255 | No Formadora |
| Post Marinado | PM 11-2 | 0.143 | No Formadora | Post Chiller | PCH 3-5 | 0.214 | No Formadora |
| Post Marinado | PM 12-1 | 0.150 | No Formadora | Post Chiller | PCH 7-2 | 0.417 | No Formadora |
| Post Marinado | PM 11-3 | 0.268 | No Formadora | Post Chiller | PCH 17-2 | 0.411 | No Formadora |
| Post Marinado | PM 12-2 | 0.207 | No Formadora | Post Chiller | PCH 20-1 | 0.317 | No Formadora |
| | | | | Post Chiller | PCH 6-1 | 0.370 | No Formadora |
| | | | | Post Chiller | PCH 8-1 | 0.404 | No Formadora |
| | | | | Post Chiller | PCH 2-5 | 0.175 | No Formadora |
| | | | | Post Chiller | PCH 3-4 | 0.188 | No Formadora |
| | | | | Post Chiller | PCH 4-2 | 0.189 | No Formadora |
| | | | | Post Chiller | PCH 5-4 | 0.173 | No Formadora |
| | | | | Post Túnel Frío | PTF 3-5 | 0.202 | No Formadora |
| | | | | Post Túnel Frío | PTF 1-3 | 0.241 | No Formadora |
| | | | | Post Túnel Frío | PTF 1-4 | 0.215 | No Formadora |
| | | | | Post Túnel Frío | PTF 2-3 | 0.234 | No Formadora |

La densidad óptica de corte (OD_c) fue de 0.450

De acuerdo con la habilidad de producción de biopelículas en las condiciones de los ensayos, el 92,3% de las cepas incubadas a 37°C bajo estrés oxidativo no fueron capaces de formar biopelículas sobre placas de poliestireno. Los resultados fueron similares al incubar los cultivos a 4°C y luego a 37°C en ambiente aeróbico, en las que el 97,5% de las cepas no fueron eficaces en la formación de biopelículas (Tabla 3).

Tabla 3. Representación porcentual de los resultados según la habilidad de formación de biopelículas de cepas aisladas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*

| | Incubación a 37°C, ambiente aeróbico | | | |
|-------------------------|--|---------------------|-----------------------|---------------------|
| | No formadoras Nro. (%) | Débiles Nro. (%) | Moderadas Nro. (%) | Fuertes Nro. (%) |
| <i>C. jejuni</i> (n=27) | 25 (92,6%) | 2 (7,4%) | 0 | 0 |
| <i>C. coli</i> (n=25) | 23 (92%) | 2 (8%) | 0 | 0 |
| Total | 48 (92,3%) | 4 (7,7%) | 0 | 0 |
| | Shock térmico 4°C, incubación a 37°C, ambiente aeróbico | | | |
| | No formadoras Nro. (%) | Débiles Nro. (%) | Moderadas Nro. (%) | Fuertes Nro. (%) |
| <i>C. jejuni</i> (n=15) | 15 (100%) | 0 | 0 | 0 |
| <i>C. coli</i> (n=25) | 24 (96%) | 1 (4%) | 0 | 0 |
| Total | 39 (97,5%) | 1 (2,5%) | 0 | 0 |

Los resultados de los ensayos de formación de biopelículas indican que la mayoría de las cepas de *Campylobacter* termotolerantes, aisladas de carcasas

de pollo durante el proceso de faenamiento, no formaron biopelículas mono-especie en las condiciones de los tratamientos. Excepto, dos cepas *C. jejuni*, una aislada de carcasa de pollo Post Túnel Frio, y otra cepa aislada Post Marinado (PTF 40-1, PM 13-1); y dos cepas *C. coli* aisladas de carcasas de pollo Post Chiller (PCH 7-2, PCH 17-2); que formaron biopelículas débilmente. Es interesante destacar que dichas cepas fueron aisladas en las etapas del proceso denominadas en este trabajo como zona fría, en las cuales incluyen las medidas de mitigación. La cepa *C. coli* (PL 3-5) aislada de carcasa de pollo en la etapa posterior al lavado, presentó formación de biopelículas posterior al *Shock* térmico a 4°C.

5.2. Capacidad de *Campylobacter* termotolerantes de sobrevivir y replicarse en condiciones de estrés oxidativo y estrés térmico

Campylobacter ha desarrollado mecanismos de sobrevivencia ante condiciones desfavorables (Murphy et al., 2006). A pesar de presentar las características especiales de cultivo, que se mencionan en secciones anteriores, *Campylobacter* persiste en los sistemas productivos y existe una tendencia ascendente en la incidencia de casos por infección de *Campylobacter* spp. en humanos (EFSA; ECDC, 2013, 2016; EFSA, 2014; Kaakoush et al., 2015).

Para evaluar la capacidad de *Campylobacter jejuni* de mantener su *fitness* bajo condiciones de estrés oxidativo (ambiente aeróbico) durante 48 h a 37°C, se realizaron recuentos en placa a partir de alícuotas de la fracción planctónica provenientes de los ensayos de biopelículas sometidos al tratamiento 1. Los resultados se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Recuento de células viables de *Campylobacter jejuni* de la fracción planctónica incubado en condición aeróbica

| Código cepa | Promedio* (UFC/mL) |
|--------------------|-------------------------------|
| PD 8-1 | 1,28 x10 ⁸ |
| PD 11-3 | 3,30 x10 ⁶ |
| PD 19-3 | 6,70 x10 ⁶ |
| PE 17-3 | 6,28 x10 ⁷ |
| PE 19-3 | 1,80 x10 ⁷ |
| PCH 12-2 | 7,07 x10 ⁶ |
| PCH 13-1 | 7,83 x10 ⁶ |
| PCH 13-3 | 4,03 x10 ⁷ |
| PTF 11-3 | 1,90 x10 ⁷ |
| PM 11-2 | 8,49 x10 ⁷ |
| PM 11-3 | 1,04 x10 ⁸ |
| PM 12-1 | 8,60 x10 ⁷ |
| PM 13-1 | 1,23 x10 ⁸ |

Zona caliente: post - desplumado (PD), post - evisceración (PE). Zona fría: post – *chiller* (PCH), post - túnel frío (PTF), post - marinado (PM). * Promedio de ensayos en triplicado.

El cultivo de trabajo fue de 10⁸ UFC/mL, según estimación en nuestro laboratorio. Los resultados indican que después de la incubación en condiciones aeróbicas por 48 h, las cepas de *C. jejuni* se mantienen viables y cultivables.

Además, se evaluó la capacidad de *Campylobacter jejuni* de sobrevivir, después del *shock* térmico a 4°C en ambiente aeróbico. Se realizó el recuento de células viables antes del *shock* y 2 h después. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Células viables de *Campylobacter jejuni* antes y después del *shock* térmico a 4°C

| Código cepa | Antes del <i>shock</i> | Después del <i>shock</i> * |
|-------------|------------------------|----------------------------|
| | UFC/mL | UFC/mL |
| PD 1-3 | 3,40 x10 ⁶ | 5,80 x10 ⁶ |
| PD 3-4 | 5,30 x10 ⁶ | 1,49 x10 ⁷ |
| PD 5-4 | 1,37 x10 ⁷ | 4,48 x10 ⁶ |
| PD 8-1 | 1,35 x10 ⁷ | 4,30 x10 ⁶ |
| PD 9-1 | 2,90 x10 ⁶ | 3,38 x10 ⁶ |
| PD 12-3 | 1,02 x10 ⁷ | 1,27 x10 ⁶ |
| PD 14-3 | 1,91 x10 ⁸ | 1,64 x10 ⁸ |
| PD 19-1 | 2,47 x10 ⁷ | 3,06 x10 ⁷ |
| PD 19-2 | 3,20 x10 ⁷ | 5,30 x10 ⁷ |
| PD 19-3 | 9,00 x10 ⁷ | 9,10 x10 ⁷ |
| PD 19-3 | 7,40 x10 ⁷ | 7,40 x10 ⁷ |
| PL 12-1 | 7,60 x10 ⁷ | 1,05 x10 ⁷ |
| PE 1-1 | 5,18 x10 ⁶ | 3,71 x10 ⁶ |
| PE 13-3 | 1,97 x10 ⁷ | 2,65 x10 ⁷ |
| PE 17-3 | 1,81 x10 ⁸ | 1,68 x10 ⁸ |
| PE 17-3 | 1,16 x10 ⁸ | 9,10 x10 ⁷ |
| PE 19-3 | 2,03 x10 ⁸ | 1,73 x10 ⁸ |
| PE 19-3 | 1,07 x10 ⁸ | 1,26 x10 ⁸ |
| PTF 40-1 | 1,94 x10 ⁸ | 1,81 x10 ⁸ |
| PM 11-2 | 2,86 x10 ⁷ | 1,15 x10 ⁷ |

Zona caliente: post - desplumado (PD), post – lavado (PL), post - evisceración (PE). Zona fría: post - túnel frío (PTF), post - marinado (PM). Promedio de ensayos en duplicado.

Los resultados del recuento en placa de las cepas, después de la incubación a 4°C y en condiciones aeróbicas, las cepas de *C. jejuni* se mantienen viables y

cultivables. La mayoría de las cepas mantuvieron la concentración de bacterias inicial. Las cepas PD 5-4, PD 8-1, PD 12-3 y PE 17-3 mostraron reducción de 1 log luego de la incubación. Lo contrario ocurrió con la cepa PD 3-4, que aumentó en 1 log la concentración de bacterias post incubación.

5.3. Validación del método de neutralización para los ensayos de eficacia bactericida de desinfectantes sobre cepas de *Campylobacter* termotolerantes

Con el fin de validar que la solución neutralizante universal no afectaba la viabilidad de *Campylobacter* spp. se realizó la prueba de toxicidad utilizando una cepa de *C. jejuni*, como cepa de estudio; y como control, se utilizó una cepa de *Salmonella* spp. La cepa de *Salmonella* spp. ha sido objeto de estudio en nuestro laboratorio, en ensayos de eficacia bactericida en los cuales se ha utilizado la solución neutralizante universal, y no ha presentado efecto bactericida sobre *Salmonella* spp.

Tabla 6. Recuento de microorganismos iniciales y sobrevivientes en la validación de la solución neutralizante universal

| Recuento* | <i>Salmonella</i> spp. UFC/mL | <i>Campylobacter jejuni</i> UFC/mL |
|----------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| Inicial | 6,59 x10 ⁹ | 1,81 x10 ⁸ |
| Sobrevivientes | 4,32 x10 ⁹ | <10 ² |

*Valores promedio de dos repeticiones independientes.

La Tabla 6 muestra los valores promedios del recuento de microorganismos iniciales y sobrevivientes luego de 2 minutos de contacto de la suspensión bacteriana con la solución neutralizante. Los recuentos de microorganismos iniciales y sobrevivientes resultaron similares para la cepa de *Salmonella* spp., el recuento mantuvo el orden de 10^9 UFC/mL después del tiempo de contacto. Esto demuestra que el neutralizante no presentó efecto bactericida sobre *Salmonella* spp.

Por otro lado, *C. jejuni* presentó sensibilidad a la solución neutralizante universal, ya que hubo reducción estimada fue de 6,26 log de microorganismos en relación con la cantidad inicial.

Debido al resultado anterior, donde se evidencia que la solución neutralizante universal interferiría en los ensayos de eficacia bactericida de los desinfectantes comerciales, se procedió a la búsqueda de alternativas del proceso de neutralización.

De acuerdo con la Guía general para la realización y presentación de ensayos de eficacia de productos desinfectantes y sanitizantes de uso sanitario y doméstico, del Departamento de Salud Ambiental, del Instituto de Salud Pública de Chile, se define neutralización como:

“El proceso para inactivar la actividad antimicrobiana durante la prueba de eficacia. Esto puede ser logrado a través de medios físicos, como la filtración, **dilución**, subcultivo; o químicos, como la adición de tiosulfato de sodio u otro diluyente” (Petersen, 2014).

Considerando lo anterior, para la continuación de los ensayos, se optó por utilizar un método de neutralización físico: dilución (1:100) en solución APT.

Para validar el método de neutralización, se realizó en duplicado el ensayo de eficacia bactericida de Formalina al 0,002% v/v, utilizando una cepa de *Salmonella* spp. Se compararon los métodos de neutralización químico, con solución neutralizante universal; y físico, por dilución en solución APT. El procedimiento realizado se describe en la sección 4.2.3.2., con la variación del tiempo de contacto con el desinfectante de 2 minutos, y considerando las condiciones de siembra e incubación para *Salmonella* spp. descritas previamente.

Tabla 7. Recuento de *Salmonella* spp. inicial y sobreviviente en el ensayo de Formalina para validar el método de neutralización por dilución con solución de agua peptonada tamponada

| Método de neutralización | Recuento* | <i>Salmonella</i> spp. UFC/mL |
|--|----------------|----------------------------------|
| | | Inicial |
| Químico: Sol. neutralizante universal | Sobrevivientes | 1,10 x10 ⁷ |
| Físico: Dilución (1:100) en sol. APT | Sobrevivientes | 1,28 x10 ⁷ |

*Los valores son el promedio de dos repeticiones independientes. Se utilizó Formalina al 0,002% v/v.

La Tabla 7 muestra los valores promedios del recuento de *Salmonella* spp. inicial y sobreviviente en el ensayo de eficacia bactericida de la Formalina al 0,002% v/v. Los resultados muestran que ambos métodos de neutralización son eficaces para detener la acción bactericida de la Formalina al 0,002% v/v sobre *Salmonella* spp. y en las condiciones establecidas; ya que, los recuentos de microorganismos sobrevivientes mantienen el orden de 10^7 UFC/mL después de ocupar el método físico (dilución 1:100), y el método químico (solución neutralizante).

5.4. Eficacia bactericida de desinfectantes de uso industrial sobre cepas de *Campylobacter* termotolerantes

Los programas de limpieza y desinfección deben incorporar procedimientos de validación del uso de desinfectantes en las distintas etapas del proceso productivo. Un desinfectante debe ser capaz de demostrar su efectividad contra patógenos determinados. Los procedimientos para el uso de desinfectantes deben elaborarse lo más específico posible en su aplicación, es decir, detallando dosis de uso, patógenos a eliminar y la forma más apropiada de proceder, de manera que los encargados del control de calidad puedan elegir la mejor opción para reducir o eliminar los microorganismos patógenos.

Debido a que no existe información científica sobre la eficacia de los desinfectantes contra aislados de *Campylobacter* termotolerante del sector

productivo local, se evaluó la eficacia de cuatro desinfectantes comúnmente utilizados en la industria, con el fin de entregar información valiosa para continuar las validaciones *in situ*.

Los ensayos se realizaron en triplicado, con cada desinfectante, para determinar la capacidad de reducir de hasta 6-log_{10} (99.9999%) la concentración de microorganismos iniciales. Los resultados de las pruebas de suspensión se resumen en la Tabla 8 y 9, para *C. jejuni* y *C. coli*, respectivamente. En todas las pruebas, las reacciones del control que no contenían desinfectante dieron como resultado la recuperación del inóculo inicial (10^9 UFC / ml).

Tabla 8. Eficacia bactericida de diferentes desinfectantes comerciales sobre *Campylobacter jejuni* aislada de carcasa de pollo Broiler

| Concentración de desinfectante (% v/v) * | Microorganismos iniciales (N_0) UFC/mL | Microorganismos sobrevivientes (N_F) UFC/mL | Eficacia (%) |
|--|--|---|--------------|
| Desinfectante A: 0,05 | $1,75 \times 10^9$ | $<10^3$ | 99,9999 |
| Desinfectante B: 0,02 | $3,01 \times 10^9$ | $<10^3$ | 99,9999 |
| Desinfectante C: 0,10 | $2,41 \times 10^9$ | $<10^3$ | 99,9999 |
| Desinfectante D: 4,00 | $3,15 \times 10^9$ | $<10^3$ | 99,9999 |

*Las concertaciones de los desinfectantes son las recomendadas por el fabricante, excepto el desinfectante D, la concentración utilizada fue recomendación de Rodríguez, 2015 . El tiempo de exposición de la suspensión bacteriana con el desinfectante fue de 5 minutos Lo valores son el promedio de dos repeticiones independientes. Cepa de estudio: PE 13-3.

Tabla 9. Eficacia bactericida de diferentes desinfectantes comerciales sobre *Campylobacter coli* aislada de carcasa de pollo Broiler

| Concentración de desinfectante (% v/v) * | Microorganismos iniciales (N ₀) UFC/mL | Microorganismos sobrevivientes (N _F) UFC/mL | Eficacia (%) |
|--|--|---|--------------|
| Desinfectante A: 0,05 | 2,05 x10 ⁹ | <10 ³ | 99,9999 |
| Desinfectante B: 0,02 | 5,18 x10 ⁹ | <10 ³ | 99,9999 |
| Desinfectante C: 0,10 | 4,90 x10 ⁹ | <10 ³ | 99,9999 |
| Desinfectante D: 4,00 | 1,47 x10 ⁹ | <10 ³ | 99,9999 |

*Las concertaciones de los desinfectantes son las recomendadas por el fabricante, excepto el desinfectante D, la concentración utilizada fue recomendación de Rodríguez, 2015 . El tiempo de exposición de la suspensión bacteriana con el desinfectante fue de 5 minutos Lo valores son el promedio de dos repeticiones independientes. Cepa de estudio: PL 3-3.

DISCUSIÓN

Campylobacter es una de las causas principales de infección bacteriana transmitida por los alimentos en el mundo. Uno de los aspectos más intrigantes de *Campylobacter* es la aparente sensibilidad a las condiciones de laboratorio, lo que es contrario a su habilidad de persistir en la cadena productiva hasta llegar a infectar al ser humano. Dada la importancia para la salud pública que implica la zoonosis, es relevante comprender los mecanismos, de este patógeno, para sobrevivir en condiciones ambientales adversas a las cuales se enfrenta en la cadena productiva de pollos Broiler. Se ha reportado que *C. jejuni* puede sobrevivir en las condiciones desfavorables del proceso de faenamiento debido a su habilidad para formar biopelículas mono-especies (Brown et al., 2014) o también integrarse en las biopelículas pre-existentes (Culotti y Packman, 2015; Hanning et al., 2008; Teh et al., 2010). Es relevante el estudio de la formación de biopelículas, porque estas se constituyen como fuentes de contaminación recurrente en el proceso productivo (González-hein et al., 2013; Teh et al., 2014), aumentando el riesgo de contaminación por contacto directo del producto final. Considerando que durante el proceso productivo de pollos se implementan medidas de control, como el enfriamiento por inmersión, congelación en túnel frío y marinado; nos llevó a plantearnos, que la formación de biopelículas de *Campylobacter* termotolerantes, es mayor en las cepas aisladas desde carcasas

de pollo después de la aplicación de medidas de mitigación (zona fría) que en las cepas aisladas en las etapas previas a la aplicación de las medidas de mitigación (zonas calientes), al interior de la planta de faenamiento. Además, nos planteamos que los desinfectantes utilizados en la planta de faenamiento de pollos, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, eliminan eficazmente a *Campylobacter* termotolerantes aisladas de carcasas de pollos, en los ensayos de suspensión bacteriana.

El muestreo realizado en la planta de faenamiento resultó positivo para *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en ambas zonas del proceso (datos no publicados). Los ensayos de formación de biopelículas se realizaron ocupando dichas cepas en condiciones específicas con el objetivo de someter a la bacteria a estrés ambiental similar al que se enfrenta en la cadena productiva de pollos, como estrés oxidativo y estrés térmico.

Nuestros resultados muestran que las cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, independientemente del momento del proceso donde aislada desde la carcasa de pollo, no son formadoras fuertes de biopelículas mono-especie. El 92,3% de las cepas de *Campylobacter* sometidas a estrés oxidativo no fueron capaces de formar biopelículas sobre placas de poliestireno. Los resultados fueron similares al incubar los cultivos en condiciones de estrés térmico y estrés oxidativo, en las que el 97,5% de las cepas no formaron biopelículas. La formación de biopelículas normalmente se relaciona con la

acumulación de materia orgánica que protege a las bacterias frente a los agentes sanitizantes (Garcia-Sanchez et al., 2017). Nuestros resultados concuerdan con el estudio realizado por Melo y colaboradores (2017), donde muestran que *C. jejuni* formó biopelículas de manera fuerte, solo en condición suplementada con jugo de carcasa de pollo. En la condición sin suplementación las cepas de *C. jejuni* no formaron biopelículas. Estos datos muestran que las superficies en contacto con materia orgánica, en las plantas de proceso y faenamiento pueden mantener estas biopelículas, ya que hay una presencia constante de jugo de pollo durante el procesamiento de las carcasas (Melo et al., 2017).

El alcance de nuestro proyecto no incluyó los análisis filogenéticos para determinar si las cepas aisladas de carcasa de pollo provenían de un mismo linaje filogenético (clonales). Sin embargo, algunos autores señalan que *Campylobacter* forma biopelículas pero que existen diferencias en la habilidad de formación de biopelículas a pesar de provenir de un mismo linaje genético (Kudirkiene et al., 2012; Revez et al., 2011; Teh et al., 2010). Kudirkiene y colaboradores (2012), reportaron que las cepas de *C. jejuni* aisladas desde superficies de una planta de faenamiento y desde la carne de pollo formaron biopelículas a 24, 48 y 72 h posterior a la incubación, excepto dos cepas aisladas desde los filetes de pollo y desde la cloaca. Lo que resulta interesante, es que estos autores, determinaron el perfil filogenético de las cepas mediante el análisis de Tipificación multilocus de secuencias (MLST, por sus siglas en inglés de

Multilocus sequence typing), y pudieron identificar que las cepas formadoras de biopelículas y las cepas no formadoras pertenecían a un mismo linaje genético (clonales). Además, reportaron que las cepas aisladas desde superficies después de haber sido desinfectadas formaron más biopelículas, incluso a 24 h post-incubación, en comparación al resto de las cepas aisladas que resultaron del mismo linaje genético.

Para el análisis de los datos, se consideró la desviación estándar de los datos de densidad óptica del control negativo. Se sumaron tres desviaciones estándar para clasificar las cepas como formadoras de biopelículas. De esta manera, los datos de densidad óptica de las cepas estudiadas se encuentran sobre el límite superior de la distribución normal de los datos del control negativo (99.7% de los datos).

En este estudio, dos cepas de *C. jejuni*, una aislada de carcasa de pollo Post Túnel Frio, y otra cepa aislada Post Marinado (PTF 40-1, PM 13-1); y dos cepas *C. coli* aisladas de carcasas de pollo Post Chiller (PCH 7-2, PCH 17-2); formaron biopelículas débilmente, posterior a la incubación por 48 h. Es interesante destacar que dichas cepas fueron aisladas en las etapas del proceso denominadas en este trabajo como zona fría, en la cual se encuentran implementada las medidas de mitigación para eliminar o reducir patógenos. Sin

embargo, no es posible asociar la formación de biopelículas de *Campylobacter* termotolerante con alguna etapa del proceso de faenamiento.

Por otro lado, existe escasa información sobre los mecanismos que promueven el crecimiento y la supervivencia de *C. jejuni* en el medio ambiente, sobre todo por sus requerimientos nutricionales y las condiciones adversas que debe enfrentar hasta llegar al hospedero. Nuestros resultados del recuento en placa indican que las cepas de *C. jejuni* aisladas de caracas de pollo se mantienen viables y cultivables post-incubación a 4°C y en condiciones aeróbicas. Es interesante conocer los mecanismos moleculares que promueven la sobrevivencia, e incluso la replicación (*Fitness*) de este patógeno en ambientes desfavorables. En este sentido, existen algunos estudios sobre los genes relacionados al *fitness*, como el de De Vries y colaboradores (2017), donde reportaron que el gen *trxC* (que codifica a tiol-disulfuro oxidoreductasa) es requerido para la supervivencia a baja temperatura, tanto en condiciones ricas en nutrientes como en condiciones escasas; y para resistencia contra el peróxido. La complementación genética de cepas mutantes para el gen *trxC* recuperó el fenotipo de la cinética de crecimiento bajo todas las condiciones probadas, confirmando la importancia de *trxC* en la supervivencia de *C. jejuni* a 4 °C (De Vries et al., 2017).

A pesar de que *Campylobacter* es generalmente considerada como sensible a los desinfectantes, también puede resistir a las condiciones drásticas que se enfrenta durante los procedimientos de limpieza y desinfección (Avrain et al., 2003; Blaser et al., 1986; Peyrat et al., 2008a; Trachoo et al., 2002). Por su habilidad de sobrevivir en ambientes extremos, resulta relevante la evaluación de los distintos desinfectantes que comúnmente se ocupan en la industria como parte de los procedimientos operativos estandarizados de sanitización. La formación de biopelículas de manera rápida, después de la desinfección en la planta de faenamiento, puede ser importante porque la biopelícula protege a las bacterias contra los desinfectantes y porque la fijación firme sobre una superficie evita su eliminación.

En este estudio, evaluamos la eficacia bactericida de desinfectantes de uso comercial. Para lo cual iniciamos con la prueba de toxicidad de la solución neutralizante, que permitió validar el protocolo del ensayo de eficacia bactericida de desinfectantes comerciales en suspensión, ya que, si el método de neutralización destruye las bacterias estaríamos invalidando el estudio.

Los resultados de la prueba de toxicidad de la solución neutralizante mostraron que *C. jejuni* presentó sensibilidad a la solución neutralizante universal, lo que concuerda con los reportes que indican que existen patógenos sensibles a diluyentes que contienen sales inorgánicas (ICMSF, 2000), y específicamente,

que *C. jejuni* no crece en presencia de concentraciones de cloruro de sodio del 2% o más (Doyle y Roman, 1982; Park, 2002).

Nuestro estudio demostró el método de neutralización por dilución con APT puede adaptarse a *Campylobacter*. Los desinfectantes a base de ácido peracético, peróxido de hidrógeno, glutaraldehído y formalina fueron eficaces *in vitro* contra las cepas de *Campylobacter* después de 5 minutos de exposición, ya que se constató la eliminación del 99.9999% de bacterias en suspensión. Es muy importante, destacar que la interferencia entre otras bacterias, otros desinfectantes y la materia orgánica, presentes en la planta de faenamiento, no fue considerada en este estudio. En consecuencia, en condiciones reales, los desinfectantes pueden ser menos efectivos. De hecho, varios factores como la formulación, la dilución correcta, el tiempo de exposición, la presencia de materia orgánica, el tipo y la cantidad de microorganismos, la temperatura, el pH y la dureza del agua pueden modificar la eficacia del desinfectante (Ruano et al., 2001). Sin embargo, el tiempo de exposición recomendado por los fabricantes es generalmente más largo que 5 min. Por lo tanto, en los procedimientos estandarizados de sanitización se recomienda validar *in situ* la eficacia de los desinfectantes, bajo las condiciones reales de proceso.

CONCLUSIONES

- La primera hipótesis de investigación se rechaza, puesto que las cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas antes de las medidas de mitigación, y las que fueron aisladas en las etapas posteriores, no son formaron fuertes de biopelículas mono -especie, según las condiciones establecidas en este estudio.
- No es posible asociar la formación de biopelículas de *Campylobacter* termotolerante con alguna etapa del proceso de faenamiento, ya que las cepas aisladas en las distintas etapas del proceso de faenamiento de pollos broiler no formaron biopelículas, *in vitro*.
- Las cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, sobreviven y se mantienen viables y cultivables post-incubación en suspensión en condiciones de estrés oxidativo y estrés térmico.
- La segunda hipótesis de investigación se aprueba, ya que los desinfectantes comerciales a base de ácido peracético (5%), peróxido de hidrógeno (15%), glutaraldehído (20%) y formalina (37%), son eficaces

contra las cepas de *Campylobacter* en suspensión, después de 5 minutos de exposición, ya que presentaron una eficacia bactericida del 99,9999%.

GLOSARIO

Cultivo de trabajo: subcultivo proveniente de un cultivo intermedio, en este trabajo proviene de placas de agar MH.

Desinfectante de uso industrial: sustancia o mezcla de ellas, que no es de uso humano y que por un proceso físico o químico elimina irreversiblemente el crecimiento de microorganismos tales como: bacterias, virus, hongos, protozoos y otros, en ambientes inanimados (no necesariamente esporas bacterianas).

Ensayos de eficacia biocida: se refiere a todos los análisis o ensayos para determinar la eficacia de un producto con acción antimicrobiana, ya sea desinfectante o sanitizante.

Fitness bacteriano: la capacidad de la bacteria de sobrevivir o replicarse.

Medida de control: en contexto de la inocuidad de los alimentos, es la acción o actividad que puede realizarse para prevenir o eliminar un peligro relacionado con la inocuidad de los alimentos o para reducirlo a un nivel aceptable.

Microaerofilia: condiciones atmosféricas en la que las bacterias del género *Campylobacter* se desarrollan de manera óptima: 5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂.

Neutralización: en el contexto de los ensayos de eficacia bactericida de desinfectantes, la neutralización es el proceso para inactivar la actividad antimicrobiana durante la prueba de eficacia. Esto puede ser logrado a través de medios físicos (filtración, dilución, subcultivo), o químicos (adición de tiosulfato de sodio u otro diluyente).

Peligro relacionado con la inocuidad de los alimentos: agente biológico, químico o físico presente en un alimento, o la condición en que éste se halla, que puede ocasionar un efecto adverso para la salud.

Punto crítico de control: en el contexto de inocuidad de alimentos, etapa en la puede aplicarse un control y que es esencial para prevenir o eliminar un peligro relacionado con la inocuidad de los alimentos o para reducirlo a un nivel aceptable.

Validación: es la confirmación, mediante la aportación de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista.

BIBLIOGRAFÍA

- Air Products and Chemical, I. (2017). *Freshline© SafeChill System for Poultry*.
- Avrain, L., Allain, L., Vernozy-Rozand, C., & Kempf, I. (2003). Disinfectant susceptibility testing of avian and swine *Campylobacter* isolates by a filtration method. *Veterinary Microbiology*, 96(1), 35–40.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00180-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00180-9)
- Ayres J.C., Mundt J.O and Sandine W.E. (1980). *Microbiology of foods* (San Francisco: W. H. Freeman and Company, Ed.).
- Batz, M., Hoffmann, S., & Morris, G. (2011). Ranking the Risks: The 10 Pathogen-food Combinations with the Greatest Burden on Public Health. *Emerging Pathogens Institute. University of Florida*, 21(4), 1–68.
<https://doi.org/10.3201/eid2104.141073>
- Batz, M., Hoffmann, S., & Morris, G. (2014). Disease-Outcome Trees, EQ-5D Scores, and Estimated Annual Losses of Quality-Adjusted Life Years (QALYs) for 14 Foodborne Pathogens in the United States. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(5), 395–402.
<https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1658>
- Beery, J. T., Hugdahl, M. B., & Doyle, M. P. (1988). Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(10), 2365–2370.
- Best, M., Sattar, S. A., Springthorpe, V. S., & Kennedy, M. E. (1988). Comparative mycobactericidal efficacy of chemical disinfectants in suspension and carrier tests. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(11), 2856–2858.
- Blaser, M. J., Smith, P. F., Wang, W. L., & Hoff, J. C. (1986). Inactivation of *Campylobacter jejuni* by Chlorine and Monochloramine. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(2), 307–311.
- Brown, H. L., Reuter, M., Hanman, K., Betts, R. P., & Vliet, A. H. M. Van. (2015). *Prevention of Biofilm Formation and Removal of Existing Biofilms by Extracellular DNases of Campylobacter jejuni*. 1–21.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121680>

- Brown, H. L., Reuter, M., Salt, L. J., Cross, K. L., Betts, R. P., & Vliet, H. M. Van. (2014). *Chicken Juice Enhances Surface Attachment and Biofilm Formation of Campylobacter jejuni*. 80(22), 7053–7060. <https://doi.org/10.1128/AEM.02614-14>
- Buchanan, R. L., & Whiting, R. C. (1998). *Risk Assessment : A Means for Linking HACCP Plans and Public Health*. 61(11), 1531–1534.
- Buswell, C.M., Herlihy, Y.M., Lawrence, L.M., Mcguiggan, J.T., Marsh, P.D., Keevil, C.W., Leach, S. A. (1998). Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilm and their detection by immunofluorescent antibody and rRNA staining. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1), 733–745.
- Cameron, A., Fridrich, E., Huynh, S., Parker, C. T., & Gaynor, E. C. (2012). Hyperosmotic Stress Response of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology*, 194(22), 6116–6130. <https://doi.org/10.1128/JB.01409-12>
- CDC. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): (2014). FoodNet Surveillance Report for 2014 (Final Report). In *U.S. Department of Health and Human Services, CDC*. Atlanta, Georgia.
- CDC. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): (2017). FoodNet 2015 Surveillance Report (Final Data). In *U.S. Department of Health and Human Services, CDC*. Atlanta, Georgia.
- Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. (2007). *Biofilms in the Food Environment Chapter 4 Inactivation of listeria monocytogenes biofilms using chemical sanitizers and heat* (M. E. A. Hans P. Blaschek, Hua H. Wang, Ed.). Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologists.
- Cróinín, T. Ó., & Backert, S. (2012). *Host epithelial cell invasion by Campylobacter jejuni : trigger or zipper mechanism?* 2(3), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00025>
- Culotti, A., & Packman, A. I. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* facilitates *Campylobacter jejuni* growth in biofilms under oxic flow conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(12), 1–8. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv136>
- Davis, L., & DiRita, V. (2008). Growth and Laboratory Maintenance of *Campylobacter jejuni*. In *Current Protocols in Microbiology* (pp. 1–11). <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc08a01s10>
- de Melo, R. T., Monteiro, G. P., Mendonça, E. P., & Rossi, D. A. (2016). *Campylobacter* spp.: Capacity of Biofilm Formation and Other Strategies of

- Survival and Adaption to Remain in the Poultry Industry. In *Campylobacter spp. and Related Organisms in Poultry* (pp. 151–164). Springer.
- De Vries, S. P. W., Gupta, S., Baig, A., Wright, E., Wedley, A., Jensen, A. N., ... Grant, A. J. (2017). Genome-wide fitness analyses of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni* in in vitro and in vivo models. *Scientific Reports*, 7(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01133-4>
- Donlan, R. M. (2002). *Biofilms : Microbial Life on Surfaces*. 8(9), 881–890.
- Doyle, M. P., & Roman, D. J. (1982). Response of *Campylobacter jejuni* to sodium chloride . Response of *Campylobacter jejuni* to Sodium Chloride. 43(3), 561–565.
- Echávarri, V. (2011). Las carnes de aves. In *Oficina de Estudios y Políticas Agrarias de Chile (ODEPA)*. Chile.
- EFSA; ECDC. (2013). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal*, 11(4), 250. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3129>
- EFSA; ECDC. (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 14(12), 231. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4634>
- EFSA. (2014). *EFSA explains zoonotic diseases. Campylobacter*. 1–2. <https://doi.org/10.2805/59450>
- EFSA Panel on Biological Hazard. (2011). Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. *EFSA Journal*, 9(4), 141. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2105>
- EFSA Panel on Biological Hazards. (2010). Scientific Opinion on Quantification of the risk posed by broiler meat to human *Campylobacteriosis* in the EU 1. *EFSA Journal*, 8(1), 1–89. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1437>. Available
- FAO/OMS. (2009). *Evaluación de riesgos de Campylobacter spp . en pollos para asar*. Italia.
- Favi, M., Jimenez, M., Martinez, C., Olivares, B., Ramirez, V., & Scappaticcio, A. (2013). Guia de bioseguridad para laboratorios clinicos. *Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile*, 46. Retrieved from <http://www.ispch.cl/sites/default/files/Manual>

Bioseguridad ISPCH.pdf

- Fernández, H., & Pisón, V. (1996). Isolation of thermotolerant species of *Campylobacter* from commercial chicken livers. *International Journal of Food Microbiology*, 29(1), 75–80. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00023-2](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00023-2)
- Fernández, H., Vera, F., Villanueva, M. P., & García, A. (2008). Occurrence of *Campylobacter* species in healthy well-nourished and malnourished children. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), 56–58. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000100013>
- Figueroa, G., Troncoso, M., López, C., Rivas, P., & Toro, M. (2009). Occurrence and enumeration of *Campylobacter* spp. during the processing of Chilean broilers. *BMC Microbiology*, 9, 94. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-94>
- Flemming, H., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Publishing Group*, 8(9), 623–633.
- García-Sánchez, L., Melero, B., Jaime, I., Hanninen, M.-L., Rossi, M., & Rovira, J. (2017). *Campylobacter jejuni* survival in a poultry processing plant environment. *Food Microbiology*, 65, 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.02.009>
- Gilbreath, J. J., Cody, W. L., Merrell, D. S., & Hendrixson, D. R. (2011). Change Is Good: Variations in Common Biological Mechanisms in the Epsilonproteobacterial Genera *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1), 84–132. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00035-10>
- González-hein, G., Huaracán, B., García, P., & Figueroa, G. (2013). Prevalence of virulence genes in strains of *Campylobacter jejuni* isolated from human , bovine and broiler. 1229, 1223–1229.
- Gruntar, I., Biasizzo, M., Ku, D., & Pate, M. (2015). *Campylobacter jejuni* contamination of broiler carcasses : Population dynamics and genetic profiles at slaughterhouse level. 50, 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.03.007>
- Gutiérrez-Martín, C. B., Yubero, S., Martínez, S., Frandoloso, R., & Rodríguez-Ferri, E. F. (2011). Evaluation of efficacy of several disinfectants against *Campylobacter jejuni* strains by a suspension test. *Research in Veterinary Science*, 91(3), 44–47. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.01.020>
- Hanning, I., Jarquin, R., & Slavik, M. (2008). *Campylobacter jejuni* as a

- secondary colonizer of poultry biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 105(4), 1199–1208. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03853.x>
- Hermans, D., Van Deun, K., Martel, A., Van Immerseel, F., Messens, W., Heyndrickx, M., ... Pasmans, F. (2011). Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. *Veterinary Research*, 42(1), 82. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-82>
- Hermans, D., Van Deun, K., Messens, W., Martel, A., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F., ... Pasmans, F. (2011). *Campylobacter* control in poultry by current intervention measures ineffective: Urgent need for intensified fundamental research. *Veterinary Microbiology*, 152(3–4), 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.03.010>
- Hickey, T. E., McVeigh, A. L., Scott, D. A., Michielutti, R. E., Bixby, A., Carroll, S. A., ... Guerry, P. (2000). *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin mediates release of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity*, 68(12), 6535–6541. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.6535-6541.2000>
- Hodges, L., Carrillo, C. D., Upham, J. P., Borza, A., Eisebraun, M., Kenwell, R., ... Taboada, E. N. (2019). A strain comparison of *Campylobacter* isolated from retail poultry and human clinical cases in Atlantic Canada. *PLoS ONE*, 14(5), 1–16. <https://doi.org/doi.org/10.1371/journal.pone.0215928>
- Hue, O., Allain, V., Laisney, M.-J., Le Bouquin, S., Lalande, F., Petetin, I., ... Chemaly, M. (2011). *Campylobacter* contamination of broiler caeca and carcasses at the slaughterhouse and correlation with Salmonella contamination. *Food Microbiology*, 28(5), 862–868. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.11.003>
- Humphrey, T., O'Brien, S., & Madsen, M. (2007). *Campylobacters* as zoonotic pathogens: A food production perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 117(3), 237–257. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.01.006>
- ICMSF. (2000). *Microorganismos de los Alimentos Volumen 1. Su significado y métodos de enumeración* (2° Ed.; Editorial Acribia S. A., Ed.). España.
- INE. (2018). *Encuestas Intercensales Agropecuarias 2017 - 2018*. Retrieved from <https://www.ine.cl/docs/default-source/econ/estadísticas-agropecuarias/publicaciones/sintesis-agropecuaria-encuestas-intercensales-agropecuarias-2017-2018.pdf?sfvrsn=5>
- Instituto de Salud Pública de Chile. (2015). Buscador de Archivos. Retrieved

May 30, 2017, from
http://www.ispch.cl/resultados_reportes_mensuales/buscararchivos.php

- Instituto de Salud Pública, M. de S. (2014). Vigilancia de laboratorio de *Campylobacter* spp., Chile 2005 - 2013. *Boletín ISP Enero*, 4(1), 2005–2013. Retrieved from http://www.ispch.cl/sites/default/files/Boletín_Campylobacter.pdf
- Jang, K. Il, Kim, M. G., Ha, S. Do, Kim, K. S., Lee, K. H., Chung, D. H., ... Kim, K. Y. (2007). Morphology and adhesion of *Campylobacter jejuni* to chicken skin under varying conditions. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(2), 202–206.
- Joshua, G. W. P. (2006). Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, 152(2), 387–396. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28358-0>
- Kaakoush, N. O., Castaño-Rodríguez, N., Mitchell, H. M., & Ming, S. (2015). *Global Epidemiology of Campylobacter Infection*. 28(3), 687–720. <https://doi.org/10.1128/CMR.00006-15>
- Konkel, M. E., Kim, B. J., Rivera-Amill, V., & Garvis, S. G. (1999). Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. *Molecular Microbiology*, 32(4), 691–701. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01376.x>
- Kudirkienė, E., Cohn, M. T., Stabler, R. A., Strong, P. C. R., Šernienė, L., Wren, B. W., ... Brøndsted, L. (2012). Phenotypic and Genotypic Characterizations of *Campylobacter jejuni* Isolated from the Broiler Meat Production Process. *Current Microbiology*, 65(4), 398–406. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0170-z>
- Mead, G. C., Hudson, W. R., & Hinton, M. H. (1995). Effect of change in processing to improve hygiene control on contamination of poultry carcasses with *Campylobacter*. *Epidemiol. Infect.*, (115), 495–500.
- Melo, R. T., Mendonça, E. P., Monteiro, G. P., Siqueira, M. C., Pereira, C. B., Peres, P. A. B. M., ... Rossi, D. A. (2017). Intrinsic and Extrinsic Aspects on *Campylobacter jejuni* Biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 8(July). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01332>
- Miller, W. G., Yee, E., Chapman, M. H., Smith, T. P., Bono, J. L., Huynh, S., Korlach, J. (2014). Comparative genomics of the *Campylobacter lari* group. *Genome biology and evolution*, 6(12), 3252–3266. doi:10.1093/gbe/evu249
- Ministerio de Salud de Chile. *Aprueba reglamento sobre notificación de*

- enfermdades de declaración obligatoria.* , Pub. L. No. Artículo 9° (2005).
- Murphy, C., Carroll, C., & Jordan, K. N. (2006). Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *Journal of Applied Microbiology*, *100*(4), 623–632. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02903.x>
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. (1997). Generic HACCP Application in Broiler Slaughter and Processing. *Journal of Food Protection*, *60*(5), 579–604.
- Newell, D. G., & Fearnley, C. (2003). Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(8), 4343–4351. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4343>
- Nordic Committee on Food Analysis. (2007). *NMKL*. (119), 47.
- Obiri-Danso, K., Paul, N., & Jones, K. (2001). The effects of UVB and temperature on the survival of natural populations and pure cultures of *Campylobacter jejuni*, *Camp. coli*, *Camp. lari* and urease-positive thermophilic *Campylobacters* (UPTC) in surface waters. *Journal of Applied Microbiology*, *90*(2), 256–267. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01239.x>
- OCDE-FAO. (2014). *OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2014*. https://doi.org/10.1787/agr_outlook-2014-es
- ODEPA. (2014). *Evolución del consumo aparente de los principales alimentos en Chile: 2003-2013*. Retrieved from <https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2014/09/evolucionConsumoAlimentos.pdf>
- Oh, E., McMullen, L., & Jeon, B. (2015). Impact of oxidative stress defense on bacterial survival and morphological change in *Campylobacter jejuni* under aerobic conditions. *Frontiers in Microbiology*, *6*(APR), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00295>
- Oyarzabal, O. A., & Backert, S. (2016). Control of *Campylobacter* spp. in Commercial Poultry Production. In *Campylobacter spp. and Related Organisms in Poultry*. Springer.
- Park, S. F. (2002). The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, *74*(3), 177–188. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00678-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00678-X)

- Parte, A. C. (2014). LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D613–D616. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1111>
- Pascoe, B., Méric, G., Murray, S., Yahara, K., Mageiros, L., Bowen, R., ... Sheppard, S. K. (2015). Enhanced biofilm formation and multi-host transmission evolve from divergent genetic backgrounds in *Campylobacter jejuni*. *Environmental Microbiology*, 17(11), 4779–4789. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13051>
- Penner, J. L. (1988). The genus *Campylobacter*. A decade of progress. *Clinical Microbiology Reviews*, 1(2), 157–172. <https://doi.org/10.1128/CMR.1.2.157>. Updated
- Petersen, Nielsen, E. M., & On, S. L. W. (2001). Serotype and genotype diversity and hatchery transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial poultry flocks. *Veterinary Microbiology*, 82(2), 141–154. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00382-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00382-0)
- Petersen, P. G. (2014). Guía general para la realización y presentación de ensayos de eficacia de productos desinfectantes y sanitizantes de uso sanitario y doméstico. *Departamento de Salud Ambiental. Instituto de Salud Pública de Chile*. Retrieved from <http://www.ispch.cl/sites/default/files/GuiaEficaciaDesinfectantes-12012015B.pdf>
- Peyrat, M. B., Soumet, C., Maris, P., & Sanders, P. (2008a). Phenotypes and genotypes of *Campylobacter* strains isolated after cleaning and disinfection in poultry slaughterhouses. *Veterinary Microbiology*, 128(3–4), 313–326. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.10.021>
- Peyrat, M. B., Soumet, C., Maris, P., & Sanders, P. (2008b). Recovery of *Campylobacter jejuni* from surfaces of poultry slaughterhouses after cleaning and disinfection procedures: Analysis of a potential source of carcass contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 124(2), 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.030>
- Pielsticker, C., Glünder, G., Aung, Y. H., & Rautenschlein, S. (2016a). Colonization pattern of *C. jejuni* isolates of human and avian origin and differences in the induction of immune responses in chicken. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 169, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.11.005>
- Pielsticker, C., Glünder, G., Aung, Y. H., & Rautenschlein, S. (2016b). Colonization pattern of *C. jejuni* isolates of human and avian origin and

- differences in the induction of immune responses in chicken. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 169, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.11.005>
- Pielsticker, Glünder, & Rautenschlein, S. (2012). Colonization properties of *Campylobacter jejuni* in chickens. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 2(1), 61–65. <https://doi.org/10.1556/EuJMI.2.2012.1.9>
- Plummer, P. J. (2012). LuxS and quorum-sensing in *Campylobacter*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2(3), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00022>
- Prado, V., Solari, V., Alvarez, I., Arellano, C., Vidal, R., Carreño, M., ... Muñoz, V. (2002). Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile: Período 1999-2000. *Revista Médica de Chile*, 130(5), 495–501. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872002000500003>
- Reeser, R. J., Medler, R. T., Billington, S. J., Jost, B. H., & Joens, L. A. (2007). Characterization of *Campylobacter jejuni* Biofilms under Defined Growth Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1908–1913. <https://doi.org/10.1128/AEM.00740-06>
- 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(1–2), 116–120. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.018>
- Reuter, M., Mallett, A., Pearson, B. M., & van Vliet, A. H. M. (2010). Biofilm Formation by *Campylobacter jejuni* Is Increased under Aerobic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(7), 2122–2128. <https://doi.org/10.1128/AEM.01878-09>
- Revez, J., Rossi, M., Ellstrom, P., de Haan, C., Rautelin, H., & Hänninen, M.-L. (2011). Finnish *Campylobacter jejuni* Strains of Multilocus Sequence Type ST-22 Complex Have Two Lineages with Different Characteristics. *PLoS ONE*, 6(10), e26880. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026880>
- Rodríguez, E. (2015). Consideraciones Importantes En El Uso De Desinfectantes. *Instituto de Salud Pública de Chile*. Retrieved from http://www.ispch.cl/sites/default/files/Nota_Tecnica_N_025_Consideraciones_Importantes_en_el_Uso_de_Desinfectantes.pdf
- Rodríguez Ferri, E. F., Martínez, S., Frandoloso, R., Yubero, S., & Gutiérrez Martín, C. B. (2010). Comparative efficacy of several disinfectants in suspension and carrier tests against *Haemophilus parasuis* serovars 1 and

5. *Research in Veterinary Science*, 88(3), 385–389.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.12.001>
- Rosenquist, H., Sommer, H. M., Nielsen, N. L., & Christensen, B. B. (2006). *The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant Campylobacter*. 108, 226–232.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.007>
- Ruano, M., El-attrache, J., Villegas, P., Ruano, M., El-attrache, J., & Villegasa, P. (2001). Efficacy Comparisons of Disinfectants Used by the Commercial Poultry Industry. *American Association of Avian Pathologists*, 45(4), 972–977.
- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P. A., & Teixeira, P. (2011). *Campylobacter* spp. as a Foodborne Pathogen: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 2(9), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00200>
- Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4), 573–583.
- Skarp, C. P. A., Hanninen, M.-L., & Rautelin, H. I. K. (2016). *Campylobacteriosis: the role of poultry meat*. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.11.019>
- Solomon, E. B., & Hoover, D. G. (2004). Inactivation of *Campylobacter jejuni* by high hydrostatic pressure. *Letters in Applied Microbiology*, 38(6), 505–509. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01527.x>
- Stern, N. J., Rothenberg, P. J., & Stone, J. M. (1985). Enumeration and Reduction of *Campylobacter-Jejuni* in Poultry and Red Meats. *Journal of Food Protection*, 48(7), 606–610.
- Suzuki, H., & Yamamoto, S. (2009a). *Campylobacter* contamination in retail poultry meats and by-products in Japan: A literature survey. *Food Control*, 20(6), 531–537. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.08.016>
- Suzuki, H., & Yamamoto, S. (2009b). *Campylobacter* contamination in retail poultry meats and by-products in Japan: A literature survey. *Food Control*, 20(6), 531–537. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.08.016>
- Svensson, S. L., Davis, L. M., Mackichan, J. K., Allan, B. J., Pajaniappan, M., Thompson, S. A., & Gaynor, E. C. (2009). The CprS sensor kinase of the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni* influences biofilm formation and is

- required for optimal chick colonization. *Mol Microbiol.*, 71(1), 253–272.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06534.x>.The
- Techaruvichit, P., Takahashi, H., Kuda, T., Miya, S., Keeratipibul, S., & Kimura, B. (2016). *Adaptation of Campylobacter jejuni to biocides used in the food industry affects biofilm structure , adhesion strength , and cross-resistance to clinical antimicrobial compounds.* 7014(July).
<https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1198476>
- Teh, A. H. T., Lee, S. M., & Dykes, G. A. (2014). Does *Campylobacter jejuni* form biofilms in food-related environments? *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), 5154–5160. <https://doi.org/10.1128/AEM.01493-14>
- Teh, K., Flint, S., & French, N. (2010). Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in controlled mixed-microbial populations. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3), 118–124.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.037>
- Toole, G. O., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm Formation as Microbial Development. *Annual Review of Microbiology*, 54, 49–79.
- Trachoo, N., Frank, J., & Stern, N. (2002). Survival of *Campylobacter jejuni* in Biofilms Isolated from Chicken Houses. *Journal of Food Protection*, 65(7), 1110–1116.
- Turonova, H., Neu, T. R., Ulbrich, P., Pazlarova, J., & Tresse, O. (2016). The biofilm matrix of *Campylobacter jejuni* determined by fluorescence lectin-binding analysis. *Biofouling*, 32(5), 597–608.
<https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1169402>
- US EPA. (2016). *Germicidal and Detergent Sanitizing Action of Disinfectants Test* (p. 16). p. 16. Retrieved from
<https://www.epa.gov/sites/production/files/2018-01/documents/mb-27-02.pdf>
- Uyttendaele, M., Baert, K., Ghafir, Y., Daube, G., De Zutter, L., Herman, L., ... Debevere, J. (2006). Quantitative risk assessment of *Campylobacter* spp. in poultry based meat preparations as one of the factors to support the development of risk-based microbiological criteria in Belgium. *International Journal of Food Microbiology*, 111(2), 149–163.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.05.023>
- Van Gerwe, T., Miflin, J. K., Templeton, J. M., Bouma, A., Wagenaar, J. A., Jacobs-Reitsma, W. F., ... Klinkenberg, D. (2009). Quantifying transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial broiler flocks. *Applied and*

Environmental Microbiology, 75(3), 625–628.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01912-08>

Wang, G., Clark, C. G., Taylor, T. M., Pucknell, C., Barton, C., Price, L., ...
Rodgers, F. G. (2002). Colony Multiplex PCR Assay for Identification and
Differentiation of. *Society*, 40(12), 4744–4747.
<https://doi.org/10.1128/JCM.40.12.4744>

Waterman, S. R., & Small, P. L. C. (1998). Acid-sensitive enteric pathogens are
protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2.5 when they
are inoculated onto certain solid food sources. *Applied and Environmental
Microbiology*, 64(10), 3882–3886.

WHO. (2009). *Evaluación de riesgos de Campylobacter spp. en pollos para
asar: resumen interpretativo*. 1–56.

WHO. (2016). *Campylobacter*. Retrieved May 26, 2017, from World Health
Organization website: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/es/>

Xu, Z., Liang, Y., Lin, S., Chen, D., Li, B., Li, L., & Deng, Y. (2016). Crystal Violet
and XTT Assays on *Staphylococcus aureus* Biofilm Quantification. *Current
Microbiology*, 73(4), 474–482. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1081-1>

Zilbauer, M., Dorrell, N., Wren, B. W., & Bajaj-Elliott, M. (2008). *Campylobacter
jejuni*-mediated disease pathogenesis: an update. *Transactions of the Royal
Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(2), 123–129.
<https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.09.019>

ANEXO

Estandarización del cultivo de trabajo

Los ensayos se realizaron a partir de cultivos de *Campylobacter* termotolerantes que se estandarizaron mediante espectrofotometría (turbidez) y recuento en placa de microorganismos.

Recuento de microorganismos para estandarizar el cultivo de trabajo

| OD₆₀₀ | Recuento de colonias (UFC/mL) | | Recuento final (UFC/mL) |
|-------------------------|--------------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| 0,157 | 1,35 x10 ⁷ | 1,81 x10 ⁸ | 9,73 x10 ⁷ |
| 0,230 | 7,56x10 ⁸ | 2,03 x10 ⁸ | 4,80 x10 ⁸ |
| 0,315 | 1,75x10 ⁹ | 1,20 x10 ¹⁰ | 6,88 x10 ⁹ |

*Los valores son el promedio de dos repeticiones independientes.