

# Universidad del Valle de Guatemala Facultad de Ciencias y Humanidades



## **IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO VIDAS CAM PARA LA DETECCIÓN DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* EN QUESO FRESCO ARTESANAL INOCULADO EXPERIMENTALMENTE Y COMPARACIÓN CON LA METODOLOGÍA DEL ESTÁNDAR DE ORO (BAM)**

Trabajo de Graduación presentado  
por Jayne Clark Migoya  
para optar al grado de  
Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala  
2010



**IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO VIDAS CAM  
PARA LA DETECCIÓN DE *CAMPYLOBACTER*  
*JEJUNI* EN QUESO FRESCO ARTESANAL  
INOCULADO EXPERIMENTALMENTE Y  
COMPARACIÓN CON LA METODOLOGÍA DEL  
ESTÁNDAR DE ORO (BAM)**

# Universidad del Valle de Guatemala Facultad de Ciencias y Humanidades



## **IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO VIDAS CAM PARA LA DETECCIÓN DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* EN QUESO FRESCO ARTESANAL INOCULADO EXPERIMENTALMENTE Y COMPARACIÓN CON LA METODOLOGÍA DEL ESTÁNDAR DE ORO (BAM)**

Trabajo de Graduación presentado  
por Jayne Clark Migoya  
para optar al grado de  
Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala  
2010

Vo. Bo.

(f) Maricruz Álvarez Mury  
Licenciada Maricruz Álvarez Mury

Tribunal

(f) Leyla Dabroy  
Licenciada Leyla Dabroy de Arrivillaga

(f) Pamela Pennington  
Doctora Pamela Marie Pennington

(f) Maricruz Álvarez Mury  
Licenciada Maricruz Álvarez Mury

Fecha de aprobación: Guatemala, 9 de junio del 2010

## CONTENIDO

Lista de cuadros .....	vi
Lista de figuras .....	vii
Resumen .....	viii
Abstract .....	ix
I. Introducción .....	1
II. Antecedentes .....	3
III. Justificación .....	26
IV. Objetivos .....	28
V. Hipótesis .....	29
VI. Metodología .....	30
VII. Resultados .....	47
VIII. Discusión .....	52
IX. Conclusiones .....	55
X. Recomendaciones .....	56
XI. Bibliografía .....	57
XII. Apéndice .....	64

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Manifestaciones comunes de enteritis por <i>Campylobacter jejuni</i> en países desarrollados .....	9
Cuadro 2. Causas de morbilidad de 1 a 4 años.....	10
Cuadro 3. Causas de mortalidad en menores de 7 días, 1 año y de 1 a 4 años. ....	10
Cuadro 4. Enteritis debido a <i>Campylobacter</i> en mujeres en el departamento de Huehuetenango para el año 2009.....	11
Cuadro 5. Enteritis debido a <i>Campylobacter</i> en mujeres en los departamentos de Guatemala, Quetzaltenango y Zacapa para los años 2007-2008.....	11
Cuadro 6. Enteritis debido a <i>Campylobacter</i> en hombres en el departamento de Huehuetenango, Guatemala y Zacapa para los años 2007-2009.....	11
Cuadro 7. Diarreas debido a <i>Campylobacter</i> en Cuilapa, Santa Rosa para los años 2007-2008.....	12
Cuadro 8. Causas de morbilidad general.....	12
Cuadro 9. Panorama del mercado mundial de los productos lácteos .....	18
Cuadro 10. Indicadores de la oferta y la demanda de los productos lácteos .....	19
Cuadro 11. Alimentos más consumidos en Guatemala para el año 2000. ....	19
Cuadro 12. Valor (CIF) de las importaciones de la leche y productos lácteos.....	20
Cuadro 13. Valor (CIF) de las importaciones de queso en el año 2007.....	20
Cuadro 14. Valor (FOB) de las exportaciones de la leche y productos lácteos .....	21
Cuadro 15. Valor de las exportaciones de queso en el año 2007.....	21
Cuadro 16. Clave de pruebas bioquímicas para distinguir entre <i>Campylobacter jejuni</i> y <i>C. coli</i> .....	46
Cuadro 17. Resultados de pruebas bioquímicas para el aseguramiento de la pureza de <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33291.....	48
Cuadro 18. Número de quesos frescos positivos por el método de VIDAS CAM y la prueba estándar de oro (BAM).....	50
Cuadro 19. Valor de $p_1$ y $p_2$ para el método de VIDAS CAM y BAM .....	51
Cuadro 20. Resultado de la prueba Z aplicado a los diferentes métodos utilizados. ....	51
Cuadro 21. Formulario de muestreo .....	64

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principio de ELFA .....	25
Figura 2. Estandarización del inóculo comparándolo con un tubo 0.50 del patrón de McFarland .....	37
Figura 3. Procedimiento de la técnica enzimática VIDAS CAM .....	40
Figura 4. Tinción de Gram de <i>Campylobacter jejuni</i> aislado de queso fresco .....	43
Figura 5. Reacción de catalasa de <i>Campylobacter jejuni</i> aislado de queso fresco en agar CCDA .....	44
Figura 6. Reacción de catalasa de <i>Campylobacter jejuni</i> aislado de queso fresco .....	45
Figura 7. Prueba de hidrólisis del hipurato .....	46
Figura 8. Crecimiento de <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33291 en agar sangre suplementado .....	47
Figura 9. Crecimiento de <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33291 en agar CCDA .....	48

## RESUMEN

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) son causa de millones de casos de personas enfermas y miles de muertes en todo el mundo. Tienen diversos orígenes y en su mayoría se encuentran asociadas a diversos microorganismos. En Guatemala, no es posible conocer el detalle de las ETAs, pues los registros epidemiológicos del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala (MSPAS) son limitados.

*Campylobacter jejuni* es uno de los agentes causales de ETAs. Este enteropatógeno está asociado frecuentemente a cuadros clínicos de diarrea complicada o diarrea persistente. En su transmisión está involucrado el contacto con heces de animales domésticos y de granja.

El propósito de este trabajo es implementar la técnica enzimática de VIDAS CAM para la detección de *Campylobacter jejuni* en queso fresco artesanal inoculado experimentalmente en el Laboratorio Nacional de Salud (LNS) y compararla con la metodología del estándar de oro (BAM). Para este estudio se utilizaron 43 muestras de queso fresco artesanal las cuales fueron inoculadas con  $1 \times 10^8$  UFC/mL aproximadamente. De éstas se encontraron 33 muestras de las 43 muestras totales contaminadas con *C. jejuni* ATCC 33291 fueron positivas para ambos métodos utilizados. Se determinó que no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos usando tanto la técnica de VIDAS CAM como la prueba de estándar de oro (BAM) para el diagnóstico de *C. jejuni* en queso fresco artesanal inoculado experimentalmente (Prueba Z,  $\bar{p} = 0.7674$ ).

## ABSTRACT

Foodborne Diseases (FD) are known to be the cause of millions of cases of disease in people and thousands of deaths in the world. These diseases have different origins and have been associated with several microorganisms. Epidemiological data of the Ministry of Public Health and Social Assistance in Guatemala is limited such that there is no registry of the FD's.

*Campylobacter jejuni* is known to be one of the causal agents of foodborne diseases. This enteropathogen has been associated to different clinical symptoms of persistent and complicated diarrhea. Domestic and farm animals feces have been involved in its transmission.

The purpose of this study is to implement the enzymatic technique of VIDAS CAM for the detection of *Campylobacter jejuni* in handmade cheese experimentally inoculated in the National Laboratory of Health and to compare it with the gold standard test (BAM). For this study 43 samples of handmade cheese were inoculated with approximately  $1 \times 10^8$  UFC/mL. It was found that 33 of 43 total samples contaminated with *C. jejuni* ATCC 33291 were positive for *Campylobacter jejuni* with both methods. There was no significant difference between the results of the VIDAS CAM technique and the gold standard test (BAM) for the detection of *Campylobacter jejuni* in handmade cheese inoculated experimentally (Z Test,  $\bar{p} = 0.7674$ ).

## I. INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) son causa de millones de casos de personas enfermas y de miles de muertes en todo el mundo. Estos constituyen un importante problema de salud pública por su magnitud, tendencia creciente, emergencia y reemergencia; además de la aparición de nuevos escenarios epidemiológicos y formas de transmisión, incremento de la resistencia antimicrobiana e impacto social y económico (Koopers *et al.*, 2009). Las ETAs tienen diversos orígenes y en su mayoría se encuentran asociadas a diversos microorganismos.

El queso es uno de los principales productos agropecuarios a nivel mundial. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), en el 2008 se produjeron en el mundo más de 89 millones de toneladas de este producto lácteo. Esta cantidad es superior a la producción anual de granos de café, hojas de té, granos de cacao y tabaco juntos (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009).

No es posible conocer el detalle de las ETAs en Guatemala, pues los registros epidemiológicos del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala (MSPAS) se limitan principalmente a la incidencia de las diarreas sin detallar el agente etiológico ni el alimento implicado en la transmisión de la enfermedad. Sin embargo, las diarreas son el segundo problema en importancia como causa de muerte entre lactantes y niños en nuestro país (Koopers *et al.*, 2009).

*Campylobacter jejuni* es uno de los agentes causales de ETAs, se ha demostrado que existe una relación entre la enteritis causada por *C. jejuni* y el procesamiento y consumo de alimentos crudos y mal cocidos. Este enteropatógeno está asociado frecuentemente a cuadros clínicos de diarrea complicada o diarrea persistente en menores de un año que requieren

hospitalización. En su transmisión está involucrado el contacto con animales domésticos y de granja, siendo encontrada la bacteria en heces de aves de corral, perros, gatos, vacas y ovejas (Konkel *et al.*, 2007).

La campilobacteriosis es una zoonosis de distribución mundial. Muchos de los casos de enteritis humana han sido asociados al contacto con animales, agua contaminada o alimentos de origen animal. En países desarrollados, la diarrea por *Campylobacter* es más frecuente en los meses de verano, siendo afectados todos los grupos étnicos de ambos sexos. Se considera que un alto porcentaje de infecciones es provocado por consumo de carne de ave mal cocida. En países en vías de desarrollo la enfermedad parece ser más frecuente en niños de corta edad.

Con este estudio se pretende implementar y comparar las metodologías de VIDAS CAM y del estándar de oro (BAM), para la detección de bacterias del género *Campylobacter* en muestras de queso fresco artesanal inoculadas experimentalmente en el Laboratorio Nacional de Salud (LNS). La prueba de VIDAS CAM es un sistema automatizado que utiliza la técnica de Enzyme-Linked Fluorescent Assay (ELFA) que permite la detección rápida de *Campylobacter* en muestras de alimentos. Para ello se contaminaron 43 muestras de queso fresco artesanal con 1 mL de  $1 \times 10^8$  UFC/mL de *Campylobacter jejuni*.

Se estableció un protocolo adecuado para el aislamiento de la bacteria a partir de queso fresco artesanal. Una vez analizadas las muestras de queso por la metodología de VIDAS CAM, y la metodología estándar de oro descrita por el Bacteriological Analytical Manual (BAM) se llevó a cabo un aislamiento y caracterización morfológica de la bacteria recuperada de las muestras para poder realizar la comparación de proporciones independientes de dos poblaciones.

## II. ANTECEDENTES

### A. Historia

Los primeros aislamientos de especies del género *Campylobacter* fueron realizados en el área de microbiología veterinaria, en 1909 y 1913. MacFadyean, Stockmann y posteriormente Smith en 1918 establecieron la participación de una bacteria microaerófila en el aborto del ganado bovino y ovino, de morfología similar a las especies del género *Vibrio*, por lo que Smith la denominó *Vibrio fetus* (Moore *et al.*, 2005).

La primera asociación entre estas bacterias curvas y diarrea en el hombre fue sugerida por Levy en 1946, quien realizó un estudio en un brote de gastroenteritis sobre 357 pacientes en dos establecimientos penales en Illinois, observando en exámenes directos la presencia de formas bacterianas semejantes a *Vibrio* en el 20% de las muestras. En 1957, Elizabeth King, estudiando las características de estos vibrios aislados de diferentes fuentes, estableció que no todos correspondían a *Vibrio fetus*, determinando dos grupos con características serológicas y bioquímicas diferentes. Mientras algunos eran capaces de crecer a 25 y 37°C, otros lo hacían a 42°C. A estos últimos se les consideró como vibrios relacionados sugiriendo que eran agentes de diarrea aguda (Moore *et al.*, 2005).

En 1963, Sébald y Veron proponen la creación del género *Campylobacter* para incluir estas bacterias. En la década de 1970, Butzler, Skirrow, Bolton, Robertson, Blaser y Col, desarrollaron medios selectivos que permitieron aislar estos microorganismos con relativa facilidad y establecer su participación en diferentes cuadros infecciosos en el hombre (Moore *et al.*, 2005).

### B. Taxonomía

Las primeras especies de este género fueron identificadas hace más de 90 años en animales, pero no fue sino hasta 1970 cuando se reconoció como

patógeno humano. Debido a que presentan diferencias fundamentales con relación a la constitución del ADN y por su incapacidad de fermentar los hidratos de carbono, fueron agrupados en un nuevo género bacteriano *Campylobacter* (*campylo*: curvo y *bacter*: bacteria) (Arturo, 2007).

Actualmente se ha incorporado nuevas especies y se ha creado la familia *Campylobacteriaceae*, la cual está compuesta por dos géneros: *Campylobacter* y *Arcobacter*, y un género de afiliación incierta *Helicobacter*. *Campylobacter* presenta características fenotípicas similares a los otros géneros. No metabolizan carbohidratos, emplean procesos de oxidación de aminoácidos e intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) para obtener su energía (Hinton, 2006).

#### C. Descripción de las características microbiológicas de *Campylobacter*

El género *Campylobacter* pertenece a la familia *Campylobacteriaceae*. Es una bacteria Gram negativo, no esporo formadora, microaerofílica, en forma de espiral y móvil, presentando un flagelo polar único en uno o ambos extremos que le confiere motilidad. Estas bacterias son patógenas o comensalistas que se agrupan en bacilos Gram negativos pequeños (0.30-0.60  $\mu\text{m}$  de diámetro, 0.50-5.00  $\mu\text{m}$  de ancho) (Arturo, 2007).

La microscopia se caracteriza con una forma distintiva curva o en espiral o en forma de S, con aspecto de vibrio, cuando se observan a partir de cultivos jóvenes; con más de 48 horas de incubación o tras una prolongada exposición al aire adoptan una forma cocoide. En cultivos de más de tres días degeneran en formas esféricas u ovoides que han perdido su viabilidad (Arturo, 2007).

#### D. Morfología en Cultivo

Las colonias de *Campylobacter jejuni* en el Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar (Agar carbón cefoperaxona desoxicolato, CCDA) son

colonias grises de conformación redonda, elevación plana, bordes irregulares y aspecto mucoso (University of Idaho, 2009).

La mayoría de estas bacterias crecen a una temperatura de 37°C, a excepción de *C. jejuni* que crece a 42°C. Son microaerófilos capaces de crecer en una atmósfera de 5% de oxígeno, 10% de dióxido de carbono y 85% de nitrógeno. Su velocidad de desarrollo es más lenta que la de otras bacterias de la flora normal entérica, por lo que para su aislamiento a partir de materias fecales se requieren medios de cultivo selectivos que inhiban esta flora. *Campylobacter* son organismos de crecimiento lento (Arturo, 2007).

#### E. Toxinas y su función

Un mecanismo importante por medio del cual bacterias enteropatógenas pueden inducir diarrea es a través de la producción de toxinas. Las toxinas bacterianas, en general han sido clasificadas como dañinas para la membrana plasmática de las células eucariotas. Se conoce que *C. jejuni* puede producir por lo menos dos exotoxinas: una enterotoxina (toxina citotónica) y una citotoxina (todas las toxinas de origen proteico) (Walker, 1986).

Los aislamientos de *C. jejuni* también poseen proteínas de adhesión, llamadas adhesinas, las cuales promueven la unión del organismo a las células epiteliales. La habilidad de *C. jejuni* de adherirse a células epiteliales que recubren el tracto gastrointestinal se atribuye a la virulencia de esta bacteria. La capacidad de *C. jejuni* de unirse a los receptores celulares en el intestino de las aves es necesario para la colonización de esta bacteria (Konkel *et al.*, 2007). La enteritis por *Campylobacter* puede presentar una gran variedad de síntomas que pueden ir desde la diarrea acuosa hasta una disentería. Se cree que una o ambas toxinas pueden ser responsables de estos síntomas (Walker, 1986).

1. Enterotoxina: Estudios han comprobado que las cepas de *Campylobacter* aisladas de pacientes con diarrea acuosa produce una enterotoxina similar a la citotoxina. Esta toxina induce la secreción de diarrea mediante la estimulación de la actividad de la adenil ciclasa en la mucosa intestinal y la interrupción del transporte de iones en los enterocitos. A pesar de no haber sido caracterizada completamente, entre sus características se pueden mencionar que es una proteína con un peso molecular de 60,000-70,000 que puede ser inactivada a 56°C por 1 hora o a 96°C por 10 minutos. Esta toxina se encuentra parcialmente inactivada a un pH de 4 y puede considerarse destruida a un pH de 2 y 8. Tiene la capacidad de causar cambios citotónicos en las líneas celulares induciendo la elongación de las células Ovario de Hámster Chino (Chinese Hamster Ovary, CHO) (Walker, 1986).

2. Citotoxina: Estudios indican que esta toxina es producida por *C. jejuni* y puede ser tóxica para distintas líneas celulares de mamíferos (células Hela, células del epitelio intestinal y mucosa intestinal), incluyendo el riñón de bovino. Es una toxina lábil al calor (100°C por 30 minutos), estable a una temperatura de 60°C por 30 minutos y sensible a la tripsina (Walker, 1986).

#### F. Epidemiología

*C. jejuni* es una de las causas más comunes de infecciones por alimentos en los países en desarrollo (Callicott *et al.*, 2008). Es frecuentemente encontrado en la flora intestinal de los animales, especialmente en las aves. Los productos alimenticios inadecuadamente preparados son una causa importante de las infecciones causadas por estas bacterias. En la actualidad *C. jejuni* es responsable del 95% de los casos humanos de campilobacteriosis. *C. jejuni* está actualmente identificado como la causa principal de enfermedades bacterianas en los países desarrollados y en vías de desarrollo (Hinton, 2006).

La mayoría de casos de campylobacteriosis se encuentran asociados con la ingestión de alimentos crudos y mal cocinados. Las fuentes de riesgo de

contraer *Campylobacter* por alimentos puede dividirse en tres áreas: la higiene en la cocina, prevalencia y contaminación. En el caso de la higiene al cocinar, esta debe de abordarse a través de la educación. A diferencia de ésta la prevalencia y contaminación son importantes para la regulación de la seguridad alimentaria. La prevalencia debe ser utilizada para indicar la presencia o ausencia entre parvadas de gallinas. Sin embargo, este método es considerado como inadecuado cuando la prevalencia de *Campylobacter* es alta, debido a que únicamente se indica presencia-ausencia en el caso de existir contaminación (Callicott *et al.*, 2008).

La mayoría de casos de campylobacteriosis son de naturaleza esporádica. Estudios epidemiológicos, han demostrado que existe una relación entre la enteritis causada por *C. jejuni* y el procesamiento y consumo de alimentos crudos y mal cocidos. Esta relación ocurre debido a que la mayoría de aves de corral de 2 a 3 semanas de edad se encuentran colonizadas por *Campylobacter jejuni* (Konkel *et al.*, 2007). *Campylobacter fetus* subsp *jejuni* se considera como una causa importante y frecuente asociadas a las enfermedades entéricas en el hombre. Estudios recientes realizados en diversos países han demostrado que este microorganismo es responsable del 3 al 11% de los casos de diarrea en países desarrollados (McNaughton, 1982).

1. Enfermedades causadas por *Campylobacter*: Las bacterias patógenas que son contraídas por el hombre a través de los animales representan un gran peligro a nivel mundial. Es de mucha importancia entender la ecología de estos patógenos en el huésped (Skånseng *et al.*, 2007).

*Campylobacter* es considerado como uno de los principales patógenos que afectan al hombre (Hinton, 2006). *C. jejuni* es la causa más común de enfermedades por alimentos, específicamente las enfermedades diarreicas y gastroenteritis en el hombre (Taylor, 1982; Konkel *et al.*, 2007; Skånseng *et al.*, 2007 y Endtz, 1991). *C. jejuni* es considerado como uno de los patógenos

responsables de bacteremia, artritis séptica, aborto séptico y otras infecciones extraintestinales. El síndrome de Reiter, síndrome de Guillan-Barré y la pancreatitis por lo general se presentan después de la enterocolitis. *Campylobacter* es una causa importante de las enfermedades diarreicas (Peterson, 1994).

a. Enterocolitis. La enteritis por *Campylobacter* o campylobacteriosis, comúnmente resultan de 1 a 7 días después de una ingesta de 500-10,000 células (dosis infectiva), en función de la cepa (Konkel *et al.*, 2007 y Peterson, 1994). Esta se caracteriza por fiebre, dolores abdominales y diarrea. Las muestras de heces de individuos contaminados con *C. jejuni* frecuentemente contienen exudados celulares, pus o mocos y leucocitos. Las ulceraciones mucosas y absceso en criptas también se han observado (Konkel *et al.*, 2007).

La manifestación más común por enterocolitis causada por *C. jejuni* son las enfermedades diarreicas, las cuales se acompañan por dolor abdominal (Cuadro 1). Es importante mencionar que las enfermedades diarreicas causadas por *C. jejuni* son similares a las enteritis causada por *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* (Peterson, 1994).

Se ha demostrado que algunas cepas de *C. jejuni* producen una enterotoxina que presenta ciertas similitudes con la toxina del cólera (CT) (Peterson, 1994). Al invadir la pared del intestino delgado, la toxina CT promueve la secreción del cloro y agua por las células de la cripta intestinal. Por lo cual el paciente puede desarrollar una diarrea acuosa que puede provocar la deshidratación (Lafuente *et al.*, 2006). A pesar de la producción de esta toxina, la patogénesis de *C. jejuni* en la mucosa intestinal es causado en por la invasión bacteriana (Peterson, 1994).

Cuadro 1. Manifestaciones comunes de enteritis por *Campylobacter jejuni* en países desarrollados

Síntomas o signos	% Pacientes afectados
Diarrea	75-100
Cólicos o dolor abdominal	55-97
Malestar general	73-95
Fiebre	52-91
Anorexia	83-90
Dolor de cabeza	12-82
Náusea	30-76
Escalofríos y sudor	29-75
Mialgia	19-69
Vómitos	19-55
Heces con sangre	6-57

(Peterson, 1994)

Los pacientes inmuno comprometidos se encuentran predispuestos a padecer enterocolitis crónica o recurrente por *C. jejuni*. Las infecciones recurrentes o crónicas han sido reportadas en pacientes con hipogammaglobulinemia y en personas que padecen del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Peterson, 1994).

b. Otras manifestaciones gastrointestinales. *C. jejuni* ha sido aislado de la bilis de pacientes que han sido sometidos a algún tratamiento quirúrgico para la colecistitis. Se ha asociado, además la pancreatitis aguda con la enteritis debido a *C. jejuni*. Como también ha sido considerado como una de las causas de peritonitis bacteriana en pacientes con cirrosis y ascitis debido al alcoholismo (Peterson, 1994).

c. Síndrome de Guillain-Barré (Guillain-Barré síndrome, GBS). *C. jejuni* también se ha implicado en el desarrollo del Síndrome de Guillain-Barré o polineuritis aguda post-infecciones. El GBS es un trastorno de desmielinización que da lugar a una parálisis neuromuscular aguda (Konkel *et al.*, 2007 y Altekruse *et al.*, 1999). Se estima que hay 1 caso de GBS por cada 1000 casos de campilobacteriosis. Aproximadamente 20% de los pacientes con GBS presentan una discapacidad y aproximadamente 5% muere. El dolor y la

incapacitación que se presentan pueden durar meses o volverse crónicas. Se cree que el GBS es una respuesta autoinmune estimulada por la infección (Altekruse *et al.*, 1999).

d. Aborto séptico y pérdida. En casos de aborto séptico, *Campylobacter* ha sido aislado tanto del feto como de la sangre materna. Como también ha sido aislado en la sangre materna en casos de abortos involuntarios. Se ha observado también que algunos pacientes con gammaglobulinemia que sufren abortos recurrentes puede deberse a infección por *C. jejuni* (Peterson, 1994).

2. Cifras en Guatemala: Los registros epidemiológicos del MSPAS se limita principalmente a la incidencia de las diarreas sin detallar el agente etiológico ni el alimento implicado en la transmisión de la enfermedad. Las diarreas son el segundo problema en importancia como causa de muerte entre lactantes y niños (Cuadro 2 y 3), después de la neumonía. Igualmente está en la segunda posición entre las enfermedades infecciosas, después de las infecciones respiratorias agudas. La mayoría de los estudios han enfocado el desarrollo de enfermedades diarreicas en la población guatemalteca como causa de la contaminación del agua (Kopper *et al.*, 2009).

Cuadro 2. Causas de morbilidad de 1 a 4 años.

Causa	No. Casos	%
Diarreas	4,406	32.77
Parálisis Flácida Aguda	1	0.01

(Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 2008)

Cuadro 3. Causas de mortalidad en menores de 7 días, 1 año y de 1 a 4 años.

Causa	>7 días		> 1 año		>1 a 4 años	
	No. Muertes	%	No. Muertes	%	No. Muertes	%
Diarreas	2	1.63	17	3.01	9	2.66
Meningitis no especificada	2	1.63	5	0.71	-	-

(Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 2008)

Dentro de las gastroenteritis infecciosas, un conjunto importante se debe al consumo de agua contaminada con agentes diarreogénicos que se originan generalmente cuando las lluvias arrastran materia fecal de personas enfermas o animales portadores a las fuentes de agua que abastecen a las poblaciones. La distribución de los casos de diarrea se asocia con factores económicos y sociales así como con el saneamiento ambiental, íntimamente relacionado con la pobreza, el analfabetismo y la desnutrición crónica (Kopper *et al.*, 2009).

Los Cuadros 4 al 6 presentan un resumen de los datos epidemiológicos del MSPAS para los años 2007 a 2009 relacionados con las enfermedades transmitidas por *Campylobacter*, específicamente la enteritis. Los datos proporcionados por el MSPAS únicamente cubren a los departamentos de Huehuetenango, Guatemala, Quetzaltenango, Santa Rosa y Zacapa. En los casos de enteritis predominan en jóvenes adultos, adolescentes y niños menores a 4 años.

Cuadro 4. Enteritis debido a *Campylobacter* en mujeres en el departamento de Huehuetenango para el año 2009.

Departamento	2meses-1año	1-4 años	15-19 años
Huehuetenango	3	10	1

(Ministerio de Salud Pública, 2009)

Cuadro 5. Enteritis debido a *Campylobacter* en mujeres en los departamentos de Guatemala, Quetzaltenango y Zacapa para los años 2007-2008.

Departamento	2007			2008
	15-19 años	25-39 años	50-59 años	10-14 años
Guatemala	0	0	0	1
Quetzaltenango	2	1	1	0
Zacapa	0	0	1	0

(Ministerio de Salud Pública, 2009)

Cuadro 6. Enteritis debido a *Campylobacter* en hombres en el departamento de Huehuetenango, Guatemala y Zacapa para los años 2007-2009.

Departamento	2007	2008	2009		
	60-64 años	5-9años	2meses-1año	1-4años	5-9 años
Huehuetenango	0	0	2	12	1
Guatemala	0	1	0	0	0
Zacapa	1	0	0	0	0

(Ministerio de Salud Pública, 2009)

El Cuadro 7 muestra los casos de enteritis ocasionadas por *Campylobacter* reportadas en Santa Rosa. La mayor incidencia se debe a *C. jejuni*, con 54% de muestras positivas. El 41% de los casos fueron originados por *C. coli*; el restante 5% no fue tipificado. A diferencia de los cuadros anteriores, este no discrimina por grupo etáreo.

Cuadro 7. Diarreas debido a *Campylobacter* en Cuilapa, Santa Rosa para los años 2007-2008.

Patógeno	Hospital		Centro y puestos	
	Muestras	%	Muestras	%
<i>Campylobacter coli</i>	0	0	15	41
<i>Campylobacter jejuni</i>	1	1	20	54
<i>Campylobacter spp.</i>	0	0	2	5

(Arvelo & López, 2008)

Las enfermedades transmitidas por alimentos están presentes entre las diez primeras causas de hospitalización. Las enfermedades diarreicas agudas el cuarto lugar y el parasitismo intestinal el décimo lugar (Kopper *et al.*, 2009). En el Cuadro 8 se presenta un resumen de los datos epidemiológicos del MSPAS para el 2008, relacionados con las enfermedades transmitidas por alimentos, específicamente las diarreas. Es notable el papel predominante que tienen las diarreas, sin señalar el agente.

Cuadro 8. Causas de morbilidad general.

Causa	Frecuencia Masculino	%	Frecuencia Femenino	%	Total
Diarreas	4,004	3.97	4,541	3.26	8,545

(Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social)

## G. Desarrollo de la infección

1. Dosis Infecciosa (DI). La infección por *Campylobacter spp* ocurre debido a la ingestión de alimentos y agua contaminada. El vehículo de transmisión representa un factor importante en las infecciones causadas por *Campylobacter*, ya que este puede sobrevivir durante 2 a 5 semanas en agua o leche con una temperatura de 4°C. Los vehículos más comunes de transmisión incluyen la leche no pasteurizada, aves de corral y agua contaminada. Es importante mencionar que no todas las personas expuestas tienden a desarrollar síntomas gastrointestinales (Walker *et al.*, 1986).

2. Motilidad y quimiotaxis. Al pasar la barrera gástrica, el patógeno debe colonizar la superficie mucosa, para que pueda dar inicio a la infección. La motilidad dirigida por estímulos quimiotácticos puede aumentar la eficiencia de la colonización de la mucosa. Estudios realizados han demostrado que *C. jejuni* posee un comportamiento quimiotáctico positivo hacia L-fucosa, L-aspartato, L-cisteína, L-glutamato y L-serina. También posee cierta afinidad por el piruvato, citrato, citrato y  $\alpha$ -cetoglutarato (Walker *et al.*, 1986).

3. Adherencia. A pesar de no tener fimbrias para su adhesión al epitelio, *C. jejuni* emplea proteínas de membrana, lipopolisacáridos y glucocálix. A pesar de esto, *C. jejuni* emplea distintas sustancias que causan interferencia al momento de la adhesión a las células epiteliales. Estudios también han demostrado que existe una inhibición parcial al unirse con los siguientes carbohidratos: glucosa, galactosa, manosa, N-acetilgalactosamina y N-acetilglucosamina entre otras. La inhibición parcial de la adhesión sugiere que pueden existir una variedad de receptores en cuanto a la adhesión (Walker *et al.*, 1986).

## H. Prevención y tratamiento

El principal tratamiento para la mayoría de pacientes con campilobacteriosis, es la ingesta de fluidos y electrolitos (Altekruse *et al.*, 1999). La mayoría de

pacientes únicamente requieren un tratamiento de apoyo. Se ha demostrado que la mayoría de antidiarreicos impiden que la infección continúe y aumentan la probabilidad de necesitar un tratamiento con antibióticos antimicrobianos (Peterson, 1994). Las infecciones por *Campylobacter* generalmente son autolimitadas, la terapia con antibióticos puede ser prudente para pacientes con fiebre alta, diarrea con sangre y que hayan tenido 8 diarreas en un trascurso de 24 horas (Altekruse *et al.*, 1999). Cuando se requiere de antibióticos antimicrobianos, la eritromicina es el fármaco de elección para tratar la enterocolitis (Altekruse *et al.*, 1999 y Peterson, 1994).

Estudios han demostrado que en países desarrollados que *Campylobacter* presenta una resistencia de 0.50-8.40%. Sin embargo, la resistencia a la eritromicina es mucho más común en *Escherichia coli* que en *C. jejuni*. Algunos fármacos en los cuales *Campylobacter* presenta sensibilidad se puede mencionar: gentamicina, tetraciclina, doxociclina, furozolidona y ciprofloxacina. Entre los fármacos que pueden emplearse como alternativa a la eritromicina, se encuentra la ciprofloxacina, gentamicina y a la tetraciclina. Sin embargo se ha observado que existe cierta resistencia a los fármacos que presentan entre sus ingredientes a las quinolonas (Peterson, 1994).

#### I. Reservorios

Posee la capacidad de colonizar la mucosa intestinal de la mayoría de animales de sangre caliente. Sin embargo, el ambiente adecuado para su reproducción es el intestino de las aves (aves silvestres, pollos, pavo, patos y avestruces). Éste coloniza a las aves como un organismo comensal, con excepción del avestruz. Es asumido que *Campylobacter* contamina a las aves de corral durante el procesamiento de las aves (Newell, 2003).

Las aves de corral son consideradas el principal reservorio para la transmisión al hombre. *C. jejuni* es capaz de colonizar el tracto gastrointestinal del reservorio

sin causar ninguna enfermedad. Se localiza principalmente en la parte inferior del tracto gastrointestinal, especialmente en el ciego (Skånseng, *et al.*, 2007).

#### J. Relación con alimentos

La contaminación de los alimentos puede proceder de su origen o ser introducida durante su procesamiento y preparación (Quiñones *et. al.*, 2007). La transmisión alimentaria pueden ser de dos tipos; las infecciones alimentarias (producidas por la ingestión de microorganismos) y las intoxicaciones alimentarias (producidas como consecuencia de la ingestión de toxinas bacterianas producidas por microorganismos presentes en los alimentos). En ciertos casos, pueden producirse alergias alimentarias causadas por la presencia de microorganismos (Universidad Pública de Navarra, 2002).

Los alimentos presentan siempre microorganismos en su superficie o en su interior. Estos microorganismos pueden ser, atendiendo a su origen, endógenos (presentes en el interior de las estructuras del alimento) o exógenos (se incorporan al alimento durante su manipulación y procesado). En cualquier caso, los alimentos son una vía importante de transmisión de microorganismos que pueden causar infecciones e intoxicaciones que, por lo general tienen un tiempo de incubación corto (2 a 10 horas) y suelen cursar con síndromes gastrointestinales. Puesto que algunas de estas patologías tienen una DMI (dosis mínima infectiva) muy baja es muy necesaria la higiene de los alimentos y de los procesos de elaboración (Universidad Pública de Navarra, 2002).

#### K. Queso

La Food and Agriculture Organization (FAO) define al queso como un producto fresco o madurado obtenido por drenaje tras la coagulación de la leche, nata, leche desnatada o parcialmente desnatada, grasa de la leche o combinación de estos ingredientes. Es un alimento sólido fresco o madurado elaborado a partir de leche de vaca, cabra, oveja, búfala o camella. Este es

obtenido al separar la cuajada del suero la leche utilizando cuajo o algún sustituto (Robinson, 2002).

1. Clasificación de queso: Puesto que existe una extensa variedad de quesos, su clasificación es complicada. En la actualidad se conocen en todo el mundo unos 2,000 nombres de tipos diferentes de quesos que, en parte, presentan características muy distintas y que requieren para su elaboración una serie de procedimientos más o menos diferenciados (Spreer, 1991). Hay características propias de cada queso que ayuda a clasificarlo según su tamaño, forma, peso, color, aspecto externo, contenido de grasa, contenido de sal y tipo de leche de la que proviene. Los ingredientes generales del queso son leche, cultivos, colorantes, aditivos y coagulantes. Estos varían dependiendo de la especificación de cada queso (Robinson, 2002).

Los aspectos que deben de considerarse para la clasificación del queso, son los siguientes (Spreer, 1991):

- Características de fabricación (quesos naturales, quesos de elaboración mixta, quesos de leche ácida, quesos fundidos). Consistencia (quesos de pasta dura, de pasta firme y de pasta blanda).
- Tipo de leche (de vaca, de cabra, de oveja, etc.).
- Composición (contenido de calcio, extracto seco, contenido de agua y contenido de grasa).
- Proceso de maduración (queso frescos y queso madurados).
- Sabor.

Se puede establecer una clasificación general de los quesos en tres grandes grupos (Spreer, 1991):

- Quesos al cuajo o naturales: se obtienen directamente de la leche empleando enzimas proteolíticos (cuajo) y ácido.
- Quesos no madurados (quark, quesos frescos, queso blanco): se obtienen de forma parecida que los anteriores, pero con una elevada

proporción de ácido y sin que se desarrolle una fermentación intensamente proteolítica.

- Quesos de larga conservación (quesos fundidos): se elaboran en su mayoría con quesos al cuajo, que se someten para su conservación a un tratamiento térmico.

En Guatemala se elaboran varios quesos como requesón, queso fresco, queso de capas y queso seco. La mayoría de estos (a excepción del queso seco) son quesos de tipo blando y con altos contenidos de agua (Varnam, 1994).

Estos quesos son fabricados por coagulación ácida y son tecnológicamente sencillos. Su proceso típico de fabricación es el del queso láctico y generalmente se fabrican con cultivos iniciadores mesófilos como *Lactobacillus lactis* y *Lactobacillus cremoris*. Algunos se fabrican a partir del lactosuero restante de la fabricación de quesos de pasta dura y son acidificados solamente con zumo de limón (Varnam, 1994).

2. Queso Fresco: Los quesos frescos son resultado de una coagulación lenta de la leche por acción de la acidificación combinada o no con la acción de una pequeña cantidad de cuajo. Los quesos frescos presentan una gran diversidad según el grado de desuerado del coágulo y el contenido en materia grasa de la leche empleada.

Estos se caracterizan por (Mahaut *et al.*, 2003):

- Cuajada no prensada y un elevado contenido de agua.
- Débil sensación ácida y corto periodo de conservación.
- Producto que se consume sin período de maduración.

Según su país de origen, se conocen bajo el nombre de queso blanco, petit suisse, neufchâtel, quark, cream cheese, queso cottage, ricotta, entre otros. Los quesos frescos presentan características nutritivas importantes, en cuanto a

concentrado de proteínas y a un contenido en calcio no despreciable. Cualquiera que sea la categoría, el contenido en glúcidos permanece idéntico (Mahaut *et al.*, 2003).

3. Importancia económica del queso: Según la FAO la producción mundial de todos los tipos de queso se ha elevado de 4.934 millones de toneladas en 1963 a 89 millones de toneladas en el 2008. Esta cantidad es superior a la producción anual de granos de café, hojas de té, granos de cacao y tabaco juntos (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009). La panorámica es que la producción de queso continuará aumentando y que, junto a las leches fermentadas, serán los principales productos derivados de leche líquida no requerida para consumo directo ver Cuadro 9 (Robinson, 2002).

El aumento anual en la producción de queso, sin embargo, no solo depende de la disponibilidad de leche sino también de la capacidad de la industria para vender el queso, teniendo en cuenta el impacto de factores tales como las condiciones económicas prevalentes, los cambios del mercado ocasionados por los hábitos de consumo y la disponibilidad de alimentos ricos en proteína alternativos.

Cuadro 9. Panorama del mercado mundial de los productos lácteos  
(Millones de toneladas (equiv. Leche))

Balanza Mundial	2007	2008	2009 (pronóstico)
Producción total de leche	676.10	687.70	699.00
Leche desnatada en polvo	24.10	24.60	25.00
Leche entera en polvo	30.80	31.60	32.10
Mantequilla	60.30	62.30	64.00
Queso	85.90	87.90	89.80
Otros productos	475.10	481.30	488.00
Comercio total	39.40	39.70	39.40

(Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009).

Como se presenta en el Cuadro 10, el queso es un producto importante del mercado mundial. Idealmente, los países en desarrollo deberían incrementar su

consumo, pues el queso juega un papel importante como suplemento alternativo de calcio; afortunadamente, el consumo va en alza (Robinson & Wilbey, 2002).

Cuadro 10. Indicadores de la oferta y la demanda de los productos lácteos (kg/año)

Consumo humano anual per cápita	2007	2008	2009 (pronóstico)
Mundial	102.40	103.10	103.60
Desarrollados	245.40	246.90	249.60
En desarrollo	64.00	65.50	66.90
Comercio- cuota de producción	5.80%	5.80%	5.60%

(Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009b)

4. Comercio nacional del queso: Se hace evidente la importancia de los productos lácteos en la dieta del guatemalteco. En el Cuadro 11, de los 9 alimentos presentados, hay 3 productos lácteos, siendo el queso el de mayor consumo.

Cuadro 11. Alimentos más consumidos en Guatemala para el año 2000.

Alimento	% uso
Huevos de gallina	81
Frijoles en grano	77
Carne de pollo	55
Tortillas y similares	38
Queso	32
Leche fluida	24
Salchicha, jamón y similares	23
Crema	22
Jugos de frutas y similares	15

(Kopper *et. al*, 2009).

a. Importaciones en Guatemala. Respecto al valor de las importaciones de leche y productos lácteos a nuestro país, la tendencia es una alza sostenida que va desde un 8.8% entre el 2002 y 2003, hasta un 27.8% entre 2006 y 2007. En los primeros 6 meses de 2009, las importaciones casi igualaron el valor total de 2002, Cuadro 12.

Cuadro 12. Valor (CIF) de las importaciones de la leche y productos lácteos.  
(Cifras en miles de US dólares).

Año	Valor (CIF)
2002	74,983.60
2003	82,235.00
2004	93,161.90
2005	120,327.30
2006	125,559.60
2007	173,979.60
2008	188,662.20
2009 (enero-junio)	74,670.00

(Banco de Guatemala, 2009)

En el Cuadro 13, se hace notar que el queso más importado en el año 2007 fue el Mozzarella, utilizado para la preparación de pizza y alimentos de restaurante.

Cuadro 13. Valor (CIF) de las importaciones de queso en el año 2007  
(Cifras en US dólares).

Producto	Valor
Queso fresco (sin madurar), incluido el del lactosuero y requesón	704,172
Tipo "Cheddar", deshidratado	249,043
Otros	1,647,199
Queso fundido, excepto el rallado o en polvo	1,707,770
Queso de pasta azul y demás quesos que presenten ventas producidas por <i>Penicillium roqueforti</i>	34,151
Tipo mozzarella	7,548,817
Tipo cheddar, en bloques o barras	1,656,947
Otros	8,105,381
Total	21,653,480

(SIECA, 2009)

b. Exportaciones de Guatemala. El comportamiento de las exportaciones de leche y productos lácteos no muestra una tendencia. En el Cuadro 14, se ve que en los años 2003, 2005 y 2007 hubo un crecimiento significativo con respecto al año anterior. Esto no ocurrió en los años 2004 y 2006, cuando se reportaron mermas que incidieron en cifras negativas en el comercio de este rubro.

Cuadro 14. Valor (FOB) de las exportaciones de la leche y productos lácteos  
(Cifras en miles de US dólares).

Año	Valor (FOB)
2002	11,642.60
2003	13,102.70
2004	12,434.90
2005	17,682.60
2006	15,389.70
2007	21,052.30
2008	22,604.60
2009	11,436.30
(enero-junio)	
(Banco de Guatemala, 2009)	

En el Cuadro 15, se nota que los quesos procesados son los que aportan la mayor cantidad en las exportaciones, los fundidos y tipo Cheddar aportan cerca del 33% de las exportaciones nacionales en ese rubro.

Cuadro 15. Valor de las exportaciones de queso en el año 2007.  
(Cifras en US dólares, volumen en kilogramos).

Producto	Valor	Volumen
Queso fresco (sin madurar), incluido el del lactosuero y requesón	21,091	11,551
Otros	53,625	12,706
Queso fundido, excepto el rallado o en polvo	469,857	118,526
Tipo mozzarella	169,415	26,678
Tipo cheddar, en bloques o barras	242,077	40,665
Otros	778,642	174,970
Total	1,734,707	385,096

(SIECA, 2009)

L. Pruebas para la detección e identificación de *Campylobacter*.

1. Detección microbiológica y bioquímica de *Campylobacter* utilizando la metodología del BAM:

*Campylobacter* es una bacteria fastidiosa que necesita de algunos requerimientos nutricionales para crecer. No metaboliza carbohidratos, por lo cual obtiene su energía mediante la oxidación de aminoácidos y la obtención de productos intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA). El crecimiento de *Campylobacter* en distintos medios basales, depende en su mayoría por la adición de suplementos a estos. La sangre lisada suele ser el suplemento de

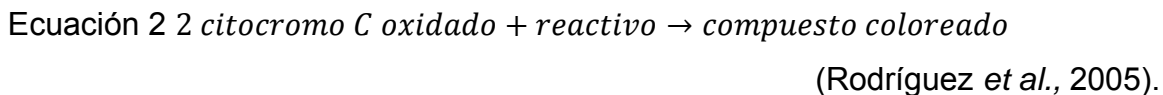
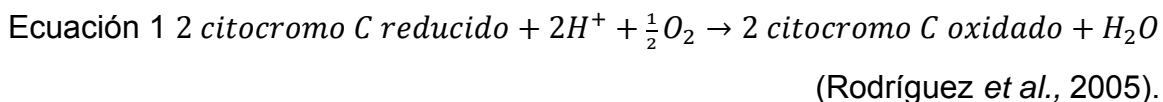
preferencia en la mayoría de medios para *Campylobacter*. Como también la mayoría de estos medios contienen carbono, sulfato ferroso, metabisulfito de sodio, piruvato de sodio para proteger a las bacterias contra los efectos tóxicos de oxígeno (Hinton, 2006).

a. Catalasa. La catalasa es una enzima hemoproteica, que se caracteriza por poseer una estructura tetramérica, en la cual cada subunidad contiene un grupo Hem ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Está presente en la mayoría de las bacterias aerobias, facultativas y anaerobias aerotolerantes, como por ejemplo *Campylobacter*. La catalasa manifiesta actividad de peroxidasa. Cataliza la oxidación de sustratos acoplada a la reducción de peróxido de hidrógeno para formar agua y oxígeno molecular. En la prueba de catalasa la reacción se efectúa con dos moléculas de peróxido de hidrógeno, una de las cuales actúa como sustrato reducido y la otra como donador de átomos de hidrógeno; esto resulta en la formación de agua (sustrato reducido) y oxígeno (donador oxidado). El peróxido de hidrógeno es muy tóxico para las bacterias. Generalmente los microorganismos que carecen de citocromos, también carecen de catalasa, así la mayoría de las bacterias anaerobias no la poseen (Rodríguez *et al.*, 2005).

b. Hidrólisis del hipurato. El hipurato es un compuesto orgánico aromático que puede ser hidrolizado enzimáticamente originando benzoato y glicina. Esta prueba es utilizada para diferenciar especies de *Streptococcus*.

c. Oxidasa. La oxidasa, también conocida como citocromo C oxidasa o indofenol oxidasa, activa la oxidación del citocromo C reducido, por acción del oxígeno molecular. Esta enzima se encuentra en una gran variedad de seres vivos, incluso algunas bacterias, por lo que su determinación es de interés taxonómico en bacteriología. La mayor parte de las bacterias Gram positivas son oxidasa negativas. La prueba de oxidasa determina indirectamente la presencia del citocromo C oxidasa. Esta cataliza la oxidación del citocromo C

reducido (Ecuación 1). El que a su vez oxida el reactivo empleado, dando un complejo coloreado (Ecuación 2) (Rodríguez *et al.*, 2005).



d. Agar Hierro Tres Azucares (Triple Sugar Iron Agar, TSI). El medio fue diseñado para determinar la habilidad de las bacterias de fermentar hidratos de carbono y producir sulfuro de hidrógeno ( $\text{SH}_2$ ). El medio contiene 1 parte (0.10%) de glucosa y 10 partes (1.00%) de lactosa y sacarosa. El indicador de pH es el rojo fenol y el sulfato ferroso pone en evidencia la formación de  $\text{SH}_2$ . Si el microorganismo fermenta glucosa, tanto la punción como la estría aparecerán de color amarillo. Si el organismo fermenta lactosa y/o sacarosa, la estría permanecerá ácida (amarilla). Si no fermenta lactosa, la estría se vuelve alcalina (roja). Los organismos que no fermentan glucosa no producen cambios en el pH del medio o producirán productos alcalinos y el medio TSI permanecerá rojo. La producción de  $\text{SH}_2$  se manifiesta por un ennegrecimiento del medio (Caffer *et al.*, 2007).

2. Detección enzimática de *Campylobacter* utilizando el sistema de ensayo de diagnóstico inmunológico Vitek (VIDAS, Vitek Immuno Diagnostic Assay System) *Campylobacter* (CAM) (BioMérieux Industry®).

El VIDAS CAM Assay es un sistema automatizado que utiliza la técnica de Ensayo por fluorescencia ligado a enzimas (ELFA, Enzyme-Linked Fluorescent Assay), utilizado para la detección de *Campylobacter spp.* Este método permite la detección rápida de *Campylobacter* en muestras de alimentos, como de ambiente después de una etapa previa de enriquecimiento. Los resultados

positivos deben ser confirmados por los métodos microbiológicos. ELFA es una variante de la técnica de ELISA, la cual ha sido utilizada para la detección de anticuerpos virales IgG en muestras clínicas (Figura 1), (Jacobs-Reitsma *et al.*, 2005).

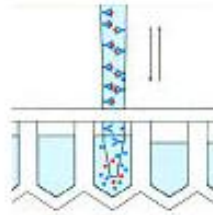
La tecnología ELFA utiliza un principio de determinación que asocia el marcaje por una enzima y una medida de fluorescencia. Es decir que la fase sólida de uso único (cono) hace las veces de aguja para toma de muestras este concepto elimina potencialmente la contaminación intermuestras. En cada etapa el cono aspira y expulsa varias veces el reactivo; las cinéticas de las reacciones aumentan y los tiempos de incubación se acortan. La intensidad final de la reacción se mide en el pocillo de lectura. Este principio permite la utilización de VIDAS para la determinación de numerosos análisis: detección de inmunoglobulinas, detección de antígenos (bacterianos, virales y proteicos entre otros) y la detección de haptenos (como las hormonas) (BioMérieux Industry, 2005).

La técnica ELFA es 100 veces más sensible que la técnica ELISA o radioinmunoensayo. Además, es una técnica simple, confiable y un método de extrema sensibilidad que puede detectar una pequeña cantidad de antígenos virales. Entre sus desventajas puede mencionarse que se requiere de un espectrofluorómetro, por lo cual los resultados no pueden leerse visualmente, debido a que utiliza un sustrato que produce una fluorescencia en lugar de un producto visible al ocurrir la interacción con la inmunoglobulina que se encuentra ligada a la enzima (Yolken *et al.*, 1979).

## Figura 1. Principio de ELFA

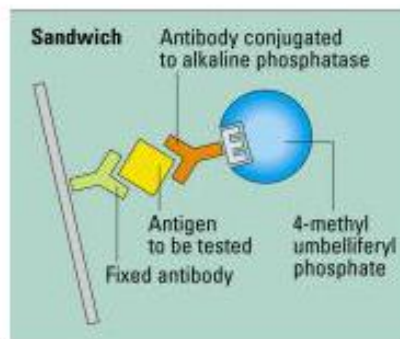
### Antigen capture

The antibody captures the target pathogen.



### Sandwich Assay

A second antibody conjugated with an enzyme fixes itself to the captured antigen.



### Detection

The intensity of the fluorescence is interpreted by the system.



(BioMérieux Industry, 2010).

### III. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son causa de millones de casos de personas enfermas y de miles de muertes en todo el mundo. Por lo tanto, es de suma importancia la relación de las ETAs con los alimentos procesados y productos lácteos producidos en el país, como el queso.

El queso es uno de los principales productos agrícolas a nivel mundial. En Guatemala, la leche y productos lácteos representan una rama importante del sector agroindustrial. Las exportaciones de leche y productos lácteos representan para la economía guatemalteca, USD 11,436.30.

El 30% de los guatemaltecos consume queso como parte de su dieta diaria y por esta razón se considera importante investigar a los microorganismos causantes de muchas enfermedades gastrointestinales. Uno de estos microorganismos es *Campylobacter jejuni*, el cual es responsable de infecciones que se originan principalmente por consumo de alimentos de origen animal elaborados bajo condiciones no sanitarias. Estudios en países industrializados y en desarrollo han demostrado en los últimos años que las infecciones causadas por *Campylobacter* en humanos se deben en su mayoría a esta especie.

Sin embargo, a pesar de las cifras proporcionadas por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS) indican prevalencia de enteritis causada por *Campylobacter* en 4 de los 22 departamentos del país, la caracterización de las infecciones diarreicas en el país no especifica el agente causal.

Por tal razón, con el objeto de proporcionar una nueva metodología igualmente confiable que la metodología estándar para determinar la presencia de *C. jejuni*, se decidió implementar la metodología de VIDAS CAM en muestras de queso fresco artesanal inoculados experimentalmente con *C. jejuni* en el

Laboratorio Nacional de Salud. Con esta metodología se pretende lograr identificar esta bacteria y contar con una técnica novedosa y rápida para la detección de *C. jejuni* a nivel nacional. Se comparó la metodología VIDAS CAM con la metodología del estándar de oro (BAM) para determinar la factibilidad de identificar con el nuevo método la presencia o ausencia de *Campylobacter jejuni* en queso fresco artesanal inoculado experimentalmente.

## IV. OBJETIVOS

### A. General

Implementar la metodología de VIDAS CAM y comparar con la metodología del estándar de oro (BAM), para la detección de *Campylobacter* en muestras de queso fresco artesanal inoculadas experimentalmente en el Laboratorio Nacional de Salud (LNS).

### B. Específicos

1. Caracterizar morfológica y bioquímicamente las colonias aisladas de *Campylobacter jejuni* a partir de muestras de queso fresco artesanal, utilizando el método tradicional (BAM).

2. Realizar la comparación entre la metodología VIDAS CAM y la metodología del estándar de oro (BAM) para la detección de *Campylobacter jejuni* utilizando como matriz queso fresco artesanal.

## V. HIPÓTESIS

### A. Hipótesis nula ( $H_0$ )

No existe diferencia en la detección de *Campylobacter jejuni* por el método de VIDAS CAM en comparación con el método de estándar de oro (BAM).

### B. Hipótesis alternativa ( $H_a$ )

Existe diferencia en la detección de *Campylobacter jejuni* por el método de VIDAS CAM en comparación con el método de estándar de oro (BAM).

## VI. METODOLOGÍA

### A. Prueba de viabilidad de la cepa

Se utilizó la cepa de referencia *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 y se verificó su viabilidad mediante su crecimiento en agar sangre suplementado con sulfato ferroso, metabisulfito de sodio y piruvato de sodio (suplemento líquido específico para *Campylobacter*). Además se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: catalasa, oxidasa, TSI e hidrólisis del hipurato para su confirmación. Las cepas se conservaron en agar sangre suplementado a 4°C por una semana, realizando una resiembra cada semana.

#### 1. Materiales

- Cepa ATCC 33291
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (3 g de peróxido de sodio en 100 mL de H<sub>2</sub>O)
- Agar TSI
- Tira bactident oxidasa (Merck, Cat. No. 1.13300.0001, lote HC827682)
- Ninhidrina (3.5 g de ninhidrina en 100 mL de una mezcla 1:1 acetona y butanol).
- Tubos con hipurato de sodio al 1% (2.5 g de caldo infusión corazón, 1 g de hipurato de sodio en 100mL de agua)

#### 2. Procedimiento.

a. Se tomó un vial de la cepa y se sembró en agar CCDA y agar sangre, los cuales fueron incubados a 42°C durante 48 horas.

b. Pasado el periodo de incubación se procedió a realizar una coloración de Gram e identificación bioquímica de la cepa, realizando las pruebas de oxidasa, catalasa, TSI e hidrólisis del hipurato.

c. Luego de estas pruebas, se realizó un repique en agar sangre suplementado, para el trabajo diario y así mantener la cepa en fase exponencial.

## B. Control de calidad de los medios de cultivo

Para la detección de *C. jejuni* en muestras de queso fresco artesanal contaminadas con *C. jejuni* se utilizaron los medios de cultivo caldo Bolton y agar CCDA. El control de calidad de los medios de cultivo consistió llevar a cabo un control de esterilidad y un control de selectividad y eficacia de los medios utilizados.

### 1. Control de esterilidad

#### a. Materiales

- Cepa *C. jejuni* ATCC 33291
- Caldo Bolton
- Agar CCDA

#### b. Procedimiento

1) Los medios de cultivo sólido se sirvieron en cajas Petri y en un erlenmeyer de 50 mL, tomando 10% de cada medio para su respectivo análisis. En el caso de los medios de cultivo líquidos y agua peptonada estos se sirvieron en tubos de ensayo y en un erlenmeyer de 50 mL.

2) Se incubaron a 37°C durante 48 horas. Pasado el tiempo de incubación, se verificó el pH y que no hubiera crecimiento de ningún tipo de microorganismo en los medios.

### 2. Prueba de selectividad y eficacia

#### a. Materiales

- Cepa *C. jejuni* ATCC 33291
- Cepa *Escherichia coli* ATCC 25922
- Agar CCDA
- Caldo Bolton

#### b. Procedimiento

1) Se utilizó una asada de *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 ya sembrada en agar sangre suplementado y una suspensión de *Escherichia coli* ATCC 25922 en caldo tripticasa soya obtenidas del cepario del LNS, las cuales fueron inoculadas en el caldo Bolton. En el caso del agar CCDA, se inoculó una asada de las suspensiones de caldo Bolton previamente inoculadas.

2) Estas suspensiones en caldo y sus aislamientos, se incubaron a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Pasado el tiempo de incubación, se verificó visualmente el agar para crecimiento de *C. jejuni* y ausencia de crecimiento de *E. coli*.

#### C. Control de ambientes

Se seleccionaron seis puntos de muestreo, éstos fueron: la mesa de trabajo, el área de pesado, la incubadora a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  y a  $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ , la refrigeradora donde se mantuvo refrigerada la cepa y la cámara fría en donde se encontraban los medios que se utilizaron. En cada punto se colocó una caja con agar PDA para el recuento de hongos y levaduras y una caja con agar nutritivo para el recuento de bacterias mesófilas, durante 15 minutos. Las cajas con agar nutritivo se incubaron a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas, y las cajas con agar PDA se dejaron a temperatura ambiente durante 5 días. Finalizado el periodo de incubación, se realizó el recuento de microorganismos.

#### D. Diseño del estudio

Este trabajo consistió en una investigación de tipo pre-experimental, estudio de caso de una sola medición, administrando un estímulo o tratamiento a un grupo (Hernández *et al.*, 2006). En este caso se inoculó queso fresco artesanal con 1 mL de  $1\times 10^8$  UFC/mL de *C. jejuni*. Se utilizó el método de VIDAS CAM comparándolo con la prueba estándar de oro (BAM) para determinar la presencia/ausencia de esta bacteria.

Esta última prueba se conoce como la prueba de oro (gold standard) o metodología del estándar de oro debido a que es una prueba o criterio utilizado para definir inequívocamente un diagnóstico (Altman, 2000). Por lo tanto la prueba de oro se utilizó con el fin de identificar definitivamente a los quesos frescos que contenían *Campylobacter jejuni*, debido a que es un requisito para examinar la utilidad diagnóstica de cualquier prueba nueva o no evaluada.

La variable independiente de este estudio es la concentración inoculada de *Campylobacter jejuni* en queso fresco artesanal. Las variables dependientes de este estudio son: la detección de *Campylobacter jejuni* por medio de la técnica enzimática VIDAS CAM y BAM. La comparación de ambos métodos fue de tipo concurrente, es decir fue un análisis que se llevó a cabo en el tiempo que duro el estudio.

El propósito de este estudio fue comparar la capacidad de detección de *Campylobacter jejuni* en queso fresco artesanal mediante la metodología VIDAS CAM versus la metodología del BAM. El trabajo fue realizado en el Laboratorio Nacional de Salud (LNS), en la unidad de Microbiología de Alimentos (MIA).

Se utilizaron 43 muestras de queso fresco artesanal, las cuales se compraron en una finca ubicada en el kilometro 160 en la comunidad de Mazatenango, Suchitepéquez. Los quesos se compraron en esta finca considerando que son exportados por lo que se asumió que contaban con mejores prácticas de manufactura que otros quesos. El número de muestras analizadas fue determinado por la disponibilidad de recursos del laboratorio para la implementación de la técnica de VIDAS CAM (60 pruebas) en el LNS. Estas muestras de queso fueron obtenidas al azar, fueron compradas en días diferentes y provenían de distintos lotes. Se utilizaron cuatro distintos lotes, los cuales estaban identificados como: 150410, 030510, 060510 y 100510, de cada uno se utilizaron 8, 10, 10 y 15 quesos respectivamente. Se pesaron dos muestras de 25 g de cada lote de queso y se inocularon simultáneamente con

1mL del cultivo cada una. Estas se procesaron en paralelo para realizar las dos pruebas a partir del mismo lote.

Para la recolección de muestras se utilizó el procedimiento descrito en el Bacteriological Analytical Manual (BAM) de la Food and Drug Administration. Para cada muestra recolectada se tomó la siguiente información: código, lugar, fecha y hora de toma, lote del cual proviene la muestra, fecha de vencimiento, características y alguna otra observación importante al respecto (ver Anexo). Las muestras de queso fresco, fueron transportadas al laboratorio en una hielera a 4°C para su análisis dentro de un período de tiempo no mayor a 24 horas (Hunt *et al.*, 2008).

1. Análisis estadístico. Para el análisis de comparación de los datos obtenidos con la técnica enzimática de VIDAS CAM y la prueba estándar de oro (BAM), se utilizó una comparación de proporciones independientes de dos poblaciones. Con esta prueba se comparó la presencia/ausencia de *Campylobacter jejuni* detectado en las muestras analizadas, utilizando los métodos de VIDAS CAM y BAM.

Para obtener la probabilidad de la existencia de diferencias significativas entre ambos métodos se utilizó la prueba Z, que se basa en la aproximación normal de la distribución binomial. Se realizó una comparación entre los resultados obtenidos por ambos métodos. Debido a que se quería comparar dos proporciones,  $p_1$  y  $p_2$ , observadas en dos grupos de un mismo tamaño  $n_1$  y  $n_2$ , respectivamente. Esta prueba se utiliza cuando los tamaños muestrales  $n_1$  y  $n_2$  son grandes ( $n \geq 30$ ), para poder aplicar el Teorema del Límite Central.

La prueba relativa a la diferencia entre las proporciones de dos poblaciones que se utiliza con más frecuencia es aquella en la que su diferencia es cero. Sin embargo, es posible probar que dicha diferencia es igual a algún otro valor. Cuando la hipótesis nula que va a probarse es  $p_1 - p_2 = 0$  está suponiéndose

que las proporciones de las dos poblaciones son iguales. Se utiliza esto como justificación para combinar los resultados de las dos muestras y llegar a una estimación conjunta de la proporción común supuesta. Si se adopta este procedimiento, se procede a calcular  $\bar{p}$ ,

$$\bar{p} = \frac{x_1 + x_2}{n_1 + n_2}$$

(Ecuación 3)

donde  $x_1$  y  $x_2$  son, respectivamente el número de la primera y segunda muestra que poseen la característica de interés (Daniel, 1987).

Esta estimación conjunta de  $p = p_1 = p_2$  se utiliza para calcular  $\hat{\sigma}_{\tilde{p}_1 - \tilde{p}_2}$  expresada como

$$\hat{\sigma}_{\tilde{p}_1 - \tilde{p}_2} = \sqrt{\frac{\bar{p}(1-\bar{p})}{n_1} + \frac{\bar{p}(1-\bar{p})}{n_2}}$$

(Ecuación 4)

por lo que la estadística de prueba se transforma en la prueba de Z (Daniel, 1987).

La prueba Z expresada como

$$Z = \frac{(\tilde{p}_1 - \tilde{p}_2) - (p_1 - p_2)}{\hat{\sigma}_{\tilde{p}_1 - \tilde{p}_2}}$$

(Ecuación 5)

se utiliza para probar la hipótesis  $H_0: p_1 = p_2$  con una probabilidad de error estándar ( $\alpha$ ), contra  $H_a: p_1 \neq p_2$  utilizando muestras de tamaño  $n_1$  y  $n_2$  provenientes de poblaciones las cuales tienen la probabilidad de ser o ser representación de  $p_1$  y  $p_2$ . Donde  $\tilde{p}_1$  y  $\tilde{p}_2$ , están expresados por:  $\tilde{p}_1 = p_1/n_1$  y  $\tilde{p}_2 = p_2/n_2$ .

La estadística de prueba sirve como un productor de decisiones, ya que la decisión de rechazar o no la hipótesis nula depende de la magnitud de la estadística de prueba. Todos los valores posibles de la estadística de prueba se

dividen en dos grupos: uno de los grupos constituye lo que se conoce como región de rechazo y el otro grupo forma la región de aceptación.

Los valores de la estadística de prueba que comprenden la región de rechazo son aquellos que tienen la menor probabilidad de suceder si la hipótesis nula es verdadera, mientras que los valores que forman la región de aceptación son los que tienen la mayor probabilidad de ocurrir si la hipótesis nula es verdadera (Daniel, 1987).

La regla de decisión señala que se rechace la hipótesis nula si el valor de la estadística de prueba que se calcule a partir de la muestra es uno de los valores de la región de rechazo, y que no se rechace (o acepte) la hipótesis nula si el valor calculado de la estadística de prueba es uno de los valores de la región de aceptación. Es decir, si la hipótesis nula es verdadera, la estadística de prueba está distribuida aproximadamente como la normal unitaria. De acuerdo a la prueba Z, la regla de decisión, sea  $\alpha = 0.05$ , el valor crítico de z es de 1.645. Por lo cual se rechaza la  $H_0$  si la z calcula es mayor que 1.645 (Daniel, 1987).

2. Almacenamiento de datos. Los datos fueron almacenados y analizados por medio del programa Microsoft Office Excel perteneciente al paquete de Windows Office 2007.

E. Protocolo para la contaminación de queso fresco artesanal<sup>1</sup>.

Para realizar la contaminación de queso fresco se realizó la estandarización del inóculo comparándolo con un tubo 0.50 del patrón de McFarland, para obtener una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/mL de *C. jejuni*.

#### 1. Materiales

- 25 g de queso fresco
- Solución salina

---

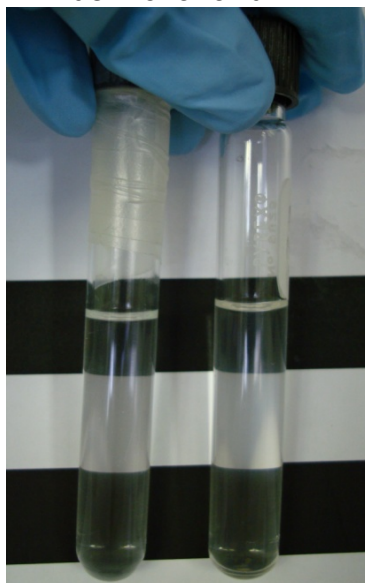
<sup>1</sup> (Lucero *et al.*, 2008)

- *Campylobacter jejuni* ATCC 33291

## 2. Procedimiento

- a. A partir de un cultivo fresco en placa se tomaron 3 o 4 colonias de *C. jejuni* ATCC 33291 y se resuspendieron en un tubo con 9 mL de solución salina.
- b. Se ajustó la suspensión por comparación visual hasta llegar a la misma turbidez del estándar de 0.5 de la escala de McFarland. Para ello, se visualizó ambos tubos contra un fondo blanco con una línea negra como contraste (Figura 2).
- c. Se agregaron 1000  $\mu$ L de suspensión a cada muestra de queso.

Figura 2. Estandarización del inoculo comparándolo con un tubo 0.50 del patrón de McFarland



- F. Metodología utilizada para la implementación de la metodología de VIDAS CAM mediante la inoculación de *C. jejuni* en queso fresco artesanal.

La prueba estándar de oro la metodología descrita por el Bacteriological Analytical Manual (BAM) para la detección de *Campylobacter spp.*, involucra principalmente, la combinación de distintas pruebas que permite identificar a

*Campylobacter* hasta el nivel de especie. Entre estas pruebas podemos mencionar: catalasa, oxidasa, hidrólisis del hipurato, etc.

1. Descripción de las muestras. Para cada análisis realizado se utilizaron los siguientes elementos:

a. Control negativo: 225 mL de Caldo Bolton sometido al mismo procedimiento analítico que las demás muestras.

b. Control positivo: 225 mL de caldo Bolton inoculado con 1000  $\mu$ L del inóculo y sometido al mismo procedimiento analítico que las demás muestras.

c. Muestras de queso no contaminadas: A estas muestras se les hizo una evaluación previa con el fin de comprobar que no presentarán presencia de *Campylobacter* ni de microorganismos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp* y *Listeria spp*) que pudieran afectar el crecimiento del mismo utilizando para ello la técnica de Petrifilm para coliformes/ *E. coli* y *S. aureus* y la técnica de VIDAS SAL y VIDAS LIS para *Salmonella* y *Listeria* respectivamente. Para la determinación de estos microorganismos las muestras fueron remitidas a la Unidad de Microbiología de Alimentos (MIA) del LNS. Para comprobar la presencia de *Campylobacter* se siguió el procedimiento descrito para el aislamiento utilizando la prueba de estándar de oro (inciso 3).

d. Muestras de queso contaminadas: A estas muestras se les adicionó 1000  $\mu$ L de *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 como se explicó en la sección anterior.

## 2. Aislamiento utilizando la metodología VIDAS CAM <sup>2</sup>

### a. Materiales

- 25 g de queso fresco artesanal
- Caldo de enriquecimiento Bolton
- Colonias bien aisladas e identificadas de *C. jejuni*

### b. Procedimiento

1) Se pesó asépticamente 25 g de queso fresco artesanal en una balanza semi-analítica. Se colocó la muestra en una bolsa ziploc con 225 mL de caldo Bolton. Se inoculó la muestra con 1000  $\mu$ L de *Campylobacter jejuni* ATCC 33291. Se colocó la bolsa en el Stomacher® durante un intervalo de 30 segundos para obtener una mezcla homogénea.

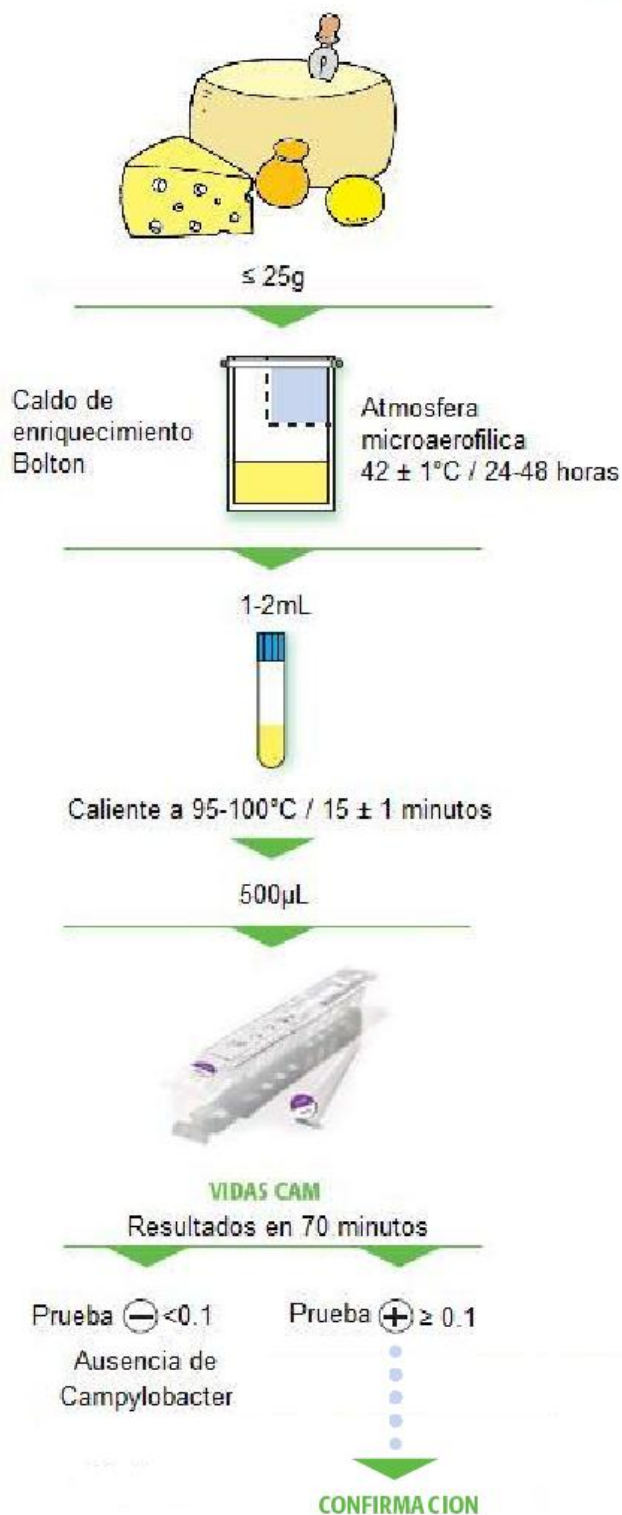
2) Se incubó la muestra durante 6 horas a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  bajo condiciones microaeróbicas (8%  $\text{CO}_2$ , 4%  $\text{O}_2$ , 80%  $\text{N}_2$  y 8%  $\text{H}_2$ ). Para garantizar las condiciones microaeróbicas se utilizó un sobre de CampyGen marca Oxoid, lote 818979. Después del periodo de incubación, se realizó una segunda incubación a una temperatura de  $42\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $42\pm 2$  horas bajo condiciones microaeróbicas.

3) A partir de la dilución original se tomaron 2 mL y se calentaron aproximadamente a  $95\text{-}100^{\circ}\text{C}$  durante  $15\pm 1$  minutos. Se recomienda guardar el resto de la muestra para confirmación del resultado. Utilizando una micropipeta, se tomaron 500  $\mu$ L y se realizó la prueba VIDAS CAM. El procedimiento se muestra en la Figura 3.

---

<sup>2</sup> (BioMérieux Industry, 2007) y (Jacobs-Reitsma *et al.*, 2005).

Figura 3. Procedimiento de la técnica enzimática VIDAS CAM



(basado en BioMérieux Industry, 2007).

### 3. Aislamiento utilizando la metodología del estándar de oro (BAM)<sup>3</sup>

#### a. Materiales

- 25 g de queso fresco artesanal
- Agua peptonada al 0.10% (1 g de en 1000 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>)
- Caldo Bolton
- Agar CCDA
- Colonias bien aisladas e identificadas de *C. jejuni*

#### b. Procedimiento

1) Se pesaron asépticamente 25 g de queso fresco artesanal en una balanza semi-analítica.

2) Se colocó la muestra en un bolsa con filtro con 25 mL de agua peptona al 0.10%. Se inoculó la muestra con 1000  $\mu$ L *Campylobacter jejuni* ATCC 33291. Se colocó la bolsa en el Stomacher® durante 30 segundos para obtener una mezcla homogénea.

3) Se escurrió por 5 segundos y procedió a centrifugar el filtrado a 20,000 x g por 40 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se disolvió en 5 mL de caldo Bolton y se transfirió a 45 mL del caldo Bolton.

4) Se incubó la muestra durante 4 horas a 37°C bajo condiciones microaeróbicas (8% CO<sub>2</sub>, 4% O<sub>2</sub>, 80% N<sub>2</sub> y 8% H<sub>2</sub>). Para garantizar las condiciones microaeróbicas se utilizó un sobre de CampyGen marca Oxoid, lote 818979. Después del periodo de incubación, se realizó una segunda incubación a una temperatura de 42 $\pm$ 1°C durante 48 $\pm$ 2 horas bajo condiciones microaeróbicas.

5) Luego de la incubación, se procedió a hacer una dilución 1:100 (0.05 mL a 4.95 mL de agua peptona al 0.1%) y se sembró por aislamiento en agar CCDA. Las placas se incubaron durante 48 $\pm$ 2 horas a 42 $\pm$ 1°C bajo condiciones microaeróbicas (8% CO<sub>2</sub>, 4% O<sub>2</sub>, 80% N<sub>2</sub> y 8% H<sub>2</sub>), utilizando un sobre de CampyGen.

---

<sup>3</sup> (Hunt *et al.*, 2008)

Es importante mencionar que el método VIDAS CAM solamente puede caracterizar hasta género, por lo que los microorganismos aislados de todas las muestras fueron caracterizados a nivel de especie por el método estándar de oro (BAM).

G. Protocolo para la confirmación a nivel microbiológico de *C. jejuni* para la técnica de VIDAS CAM y la prueba estándar de oro

1. Preparación y Tinción de Gram <sup>4</sup>

a. Materiales

- Cristal violeta 1% (1.0 g de cristal violeta en 100 mL de H<sub>2</sub>O)
- Solución yodada de Gram (1.0 g de cristales de yodo, 2.0 g de yoduro de potasio en 300 mL de H<sub>2</sub>O)
- Solución de alcohol acetona (10 mL de acetona en 20 mL de alcohol al 95%)
- Solución stock de safranina (0.50 g de safranina en 100 mL de etanol al 95%)
- Solución de trabajo de safranina (10 mL de solución stock de safranina en 90 mL de H<sub>2</sub>O)
- Etanol al 95% (fijación)

b. Procedimiento.

- 1) Se preparó y se fijo un frotis tomando una asada de la colonia seleccionada con el asa microbiológica.
- 2) Se tiñó con cristal violeta durante un minuto y luego se lavó con agua destilada.
- 3) Se aplicó como mordiente yodo (lugol) durante un minuto más.

---

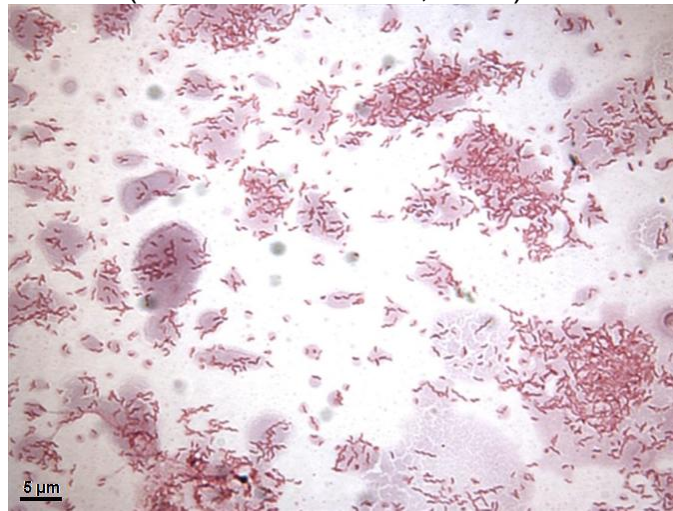
<sup>4</sup> (Álvarez, 1998.)

4) Se decoloró con alcohol-acetona hasta que ya no se observó decoloración. Se lavó con agua destilada.

5) Se tiñó con safranina diluida por un minuto. Se lavó con agua destilada y se dejó secando al aire.

6) Se observó el frote al microscopio con el lente de inmersión para su clasificación como Gram positivo o Gram negativo (Figura 4).

Figura 4. Tinción de Gram de *Campylobacter jejuni* aislado de queso fresco (Aceite de Inmersión, 100X)



2. Confirmación de colonias presuntivas por medio de la realización de pruebas bioquímicas

a. Agar TSI<sup>5</sup>

1) Materiales

- Colonias bien aisladas e identificadas de *C. jejuni*
- Agar TSI

---

<sup>5</sup> (Gini, 2007)

## 2) Procedimiento

a) A partir de una colonia pura y bien aislada, se tomó una asada, utilizando el asa en punta. Se picó el medio hasta el fondo solamente una vez y luego se estrió el inclinado o slant.

b) Se incubó a  $48 \pm 2$  horas a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  bajo condiciones microaeróbicas (8%  $\text{CO}_2$ , 4%  $\text{O}_2$ , 80%  $\text{N}_2$  y 8%  $\text{H}_2$ ), utilizando un sobre de CampyGen.

### b. Catalasa<sup>6</sup>

#### 1) Materiales

- Colonias bien aisladas e identificadas de *C. jejuni*
- $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% (3 mL de peróxido de hidrogeno en 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ )

#### 2) Procedimiento

a) Se colocó sobre un portaobjetos una gota de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30%.

b) Con un palillo de madera se transfirió una pequeña cantidad del cultivo puro o colonia sospechosa sobre la gota de agua oxigenada (Figura 5).

Figura 5. Reacción de catalasa de *Campylobacter jejuni* aislado de queso fresco en agar CCDA



---

<sup>6</sup> (Gini, 2007)

c. Oxidasa<sup>7</sup>

1) Materiales.

- Colonias bien aisladas e identificadas de *C. jejuni*
- Tira bactident oxidasa (Merck, Cat. No. 1.13300.0001, lote HC827682)

2) Procedimiento.

- a) Se colocó una porción de la colonia sobre la tira de Bactident Oxidasa (Merck) utilizando un palillo de madera.
- b) Se comparó la coloración obtenida con la escala de color provista, por el proveedor, luego de un período de espera de entre 20 a 60 segundos (Figura 6).

Figura 6. Reacción de catalasa de *Campylobacter jejuni* aislado de queso fresco



d. Hidrólisis del hipurato<sup>8</sup>

1) Materiales.

- Colonias bien aisladas e identificadas de *C. jejuni*
- Ninhidrina (3.5 g de ninhidrina en 100 mL de una mezcla 1:1 acetona y butanol).
- Tubos con hipurato de sodio al 1% (2.5 g de Caldo infusión corazón, 1 g de Hipurato de sodio en 100 mL de agua)

---

<sup>7</sup> (Gini, 2007)

<sup>8</sup> (Gini, 2007)

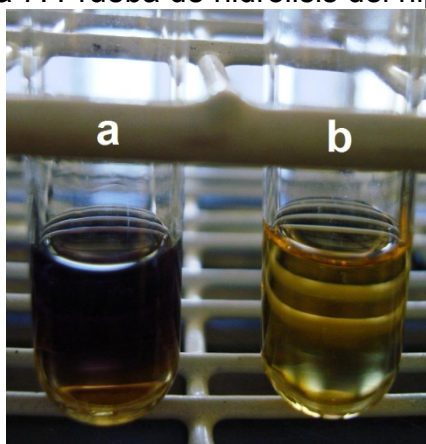
## 2) Procedimiento.

a) Se inoculó en un tubo con 1000  $\mu$ L de hipurato de sodio al 1% en agua destilada, con *C. jejuni* proveniente de un cultivo puro o de colonias bien aisladas; la suspensión final debe observarse turbia y lechosa. Se incubó por 2 horas a 36-37°C.

b) Se agregó 500  $\mu$ L del reactivo de ninhidrina al 3.5%. No debe agitarse. Se incubó nuevamente por 10 minutos.

c) Se leyó en el término de 30 minutos, pero no más, pues se producen falsos positivos. La aparición de una coloración azul-púrpura indica una reacción positiva que revela la presencia de glicina, producto final de la hidrólisis del hipurato (Figura 7).

Figura 7. Prueba de hidrólisis del hipurato



(a) control positivo y (b) control negativo

Cuadro 16. Clave de pruebas bioquímicas para distinguir entre *Campylobacter jejuni* y *C. coli*

Prueba	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
Glucosa (TSI)	-	-
Lactosa (TSI)	-	-
Sacarosa (TSI)	-	-
Gas (TSI)	-	-
Producción de H <sub>2</sub> S (TSI)	-	-
Catalasa	+	+
Oxidasa	+	+
Hidrólisis del hipurato	+	-

(Hunt *et al.*, 2008)

## VII. RESULTADOS

A continuación se muestran cuadros que ilustran en forma breve y concisa los resultados obtenidos en cada uno de los métodos utilizados.

### A. Prueba de viabilidad y pureza de la cepa de referencia

Macroscópicamente la cepa de *Campylobacter jejuni* ATCC 33291, presentó las siguientes características: colonias grises de conformación redonda, elevación plana, bordes irregulares y aspecto mucoide (Figura 8).

Figura 8. Crecimiento de *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 en agar sangre suplementado.



En la coloración de Gram se observó la presencia de bacilos Gram negativo y mediante la utilización de pruebas bioquímicas (Cuadro 17), se comprobó la identificación del microorganismo evaluado.

Con estos resultados se comprobó que la cepa utilizada de *C. jejuni* ATCC 33291 estaba completamente pura ya que no se evidenció la presencia de otros

microorganismos. Asimismo, se comprobó la viabilidad ya que se obtuvo crecimiento suficiente en el agar sangre suplementado.

Cuadro 17. Resultados de pruebas bioquímicas para el aseguramiento de la pureza de *Campylobacter jejuni* ATCC 33291

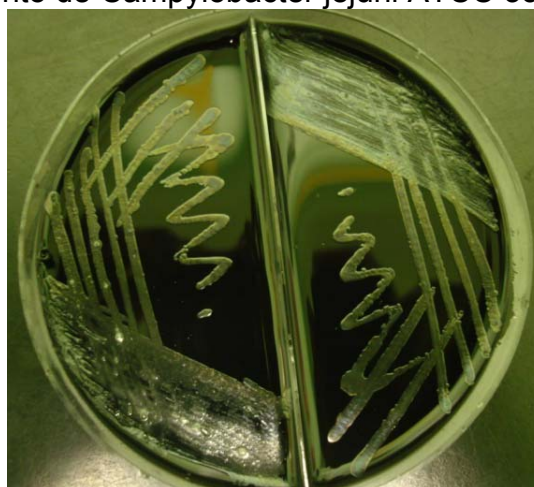
Prueba	Resultado
Catalasa	Positivo
Oxidasa	Positivo
TSI	Alcalino
Hidrólisis del hipurato	Positivo

#### B. Control de calidad de los medios de cultivo

Por medio del análisis del 10% de los medios de cultivo (agar CCDA y caldo Bolton) utilizados en el proceso de validación, se comprobó la esterilidad de cada uno, ya que no hubo crecimiento de ningún tipo de microorganismos, permitiendo así la utilización satisfactoria de cada medio.

Para comprobar la eficacia y selectividad de los medios Caldo Bolton y agar CCDA, se observó el crecimiento de la cepa *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 en los dos medios de cultivo utilizados, y ausencia de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922. Comprobándose que los medios de cultivo evaluados son altamente selectivos y eficaces, ya que permitieron solo el crecimiento de *C. jejuni* inhibiendo completamente el crecimiento de *E. coli* (figura 9).

Figura 9. Crecimiento de *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 en agar CCDA



### C. Control de ambientes

Los resultados obtenidos para el control de ambientes del área donde se realizó la validación del método, indican una baja carga de microorganismos, lo que permite inferir que se cumplen con buenas condiciones de limpieza y desinfección de esta área.

### D. Verificación de la presencia de *Campylobacter* u otras bacterias de origen en el queso fresco artesanal

Antes de proceder a comparar las metodologías del estudio se realizó la determinación de la flora microbiana del queso fresco artesanal. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: se encontró únicamente presencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* mediante la prueba de Petrifilm. No se detectó la presencia de *Listeria spp*, *Salmonella spp* mediante la metodología de VIDAS y *Campylobacter spp* mediante la metodología VIDAS y la metodología estándar de oro.

### E. Comparación de la metodología VIDAS CAM y la metodología estándar de oro

Se preparó una solución salina (1.5 mL de cloruro de sodio al 20% y 3.5 mL de agua desmineralizada) del estándar de McFarland 0.50 ( $1.0 \times 10^8$  UFC/ mL) para *Campylobacter jejuni*, de esta solución se tomó 1 mL el cual se inoculó en 225 mL de caldo Bolton para el método de VIDAS CAM e igualmente 1 mL del mismo estándar para 25 mL de agua peptonada 0.10% para el método BAM. A partir de esto se puede decir que se trabajó con  $1 \times 10^8$  UFC de *Campylobacter jejuni*, inoculado a los quesos en ambos métodos.

El Cuadro 18 muestra los resultados obtenidos, para las 43 muestras de queso fresco artesanal analizadas, de las cuales 33 fueron positivas para la detección de *Campylobacter jejuni* con ambos métodos. El cuadro muestra

también 10 muestras negativas para la detección de la presencia de *C. jejuni*, a pesar de que también fueron contaminadas con la bacteria.

Al obtener el resultado negativo con la metodología de VIDAS CAM y observar un crecimiento atípico con el método BAM, se procedió a aislar las colonias atípicas en agar sangre sin suplemento. El crecimiento obtenido fue enviado a la Unidad Central de Referencia para la Vigilancia Epidemiológica (UCREVE) del LNS para su caracterización. El resultado obtenido por medio de la prueba API-20NE indicó la presencia de un microorganismo no fermentador, *Pseudomona stutzeri*.

Cuadro 18. Número de quesos frescos positivos por el método de VIDAS CAM y la prueba estándar de oro (BAM).

		Prueba de Oro (BAM)		Total
		Positivo	Negativo	
Prueba en estudio VIDAS	Positivo	33	0	33
	Negativo	0	10	10
Total		33	10	43

A continuación se presentan los resultados obtenidos luego de realizar las pruebas bioquímicas para la identificación de los 33 presuntos aislados de *Campylobacter* a partir de las muestras ya analizadas con la metodología de VIDAS CAM. Los resultados de esta caracterización indicaron que estas muestras coincidían con las características morfológicas y bioquímicas de *C. jejuni*. Mientras que ocho de los 10 restantes aislados negativos presentaron morfología atípica, TSI ácido e hidrólisis hipurato negativo. Las dos muestras restantes negativas no presentaron crecimiento en el agar CCDA, por lo cual no se realizó la caracterización morfológica y bioquímica.

Para analizar los datos obtenidos luego del estudio, se utilizó la prueba de comparación de dos proporciones independientes de dos poblaciones. Esta prueba se utilizó para comparar los resultados positivos obtenidos a partir de dos métodos diferentes, VIDAS CAM y BAM.

Teniendo como supuesto que la diferencia en la proporción de estas dos poblaciones era cero ( $H_0$ ). Se procedió a calcular la estimación conjunta de la proporción común supuesta de probabilidad, dando como resultado 0.7674 con un valor Z de 0 (Cuadros 19 y 20). De acuerdo a estos resultados, se determinó que no existe una diferencia significativa en la detección de *Campylobacter* entre ambos métodos (VIDAS CAM y BAM). Esto indica que ambos métodos detectan igualmente la presencia de *Campylobacter jejuni* en queso fresco.

Cuadro 19. Valor de  $\tilde{p}_1$  y  $\tilde{p}_2$  para el método de VIDAS CAM y BAM

	$\tilde{p}_1$	$\tilde{p}_2$
VIDAS CAM	0.7674	-
BAM	-	0.7674

El valor de Z fue de cero debido a que la muestra utilizada por ambos métodos fue de 43, de estos 33 resultaron positivos para la detección de *Campylobacter* en ambos métodos.

Cuadro 20. Resultado de la prueba Z aplicado a los diferentes métodos utilizados.

Variable	Resultado
$\bar{p}$	0.7674
$\hat{\sigma}_{\tilde{p}_1 - \tilde{p}_2}$	0.0911
z	0.0000

## VIII. DISCUSIÓN

Para llevar a cabo el proceso de comparación e implementación de la técnica enzimática VIDAS CAM, fue necesario utilizar la prueba de oro (BAM) como prueba comparativa. Se utilizó la prueba de oro con el fin de identificar definitivamente los quesos frescos que contenían *Campylobacter jejuni*, debido a que es un requisito para examinar la utilidad diagnóstica de cualquier prueba nueva o no evaluada. Como también esta prueba fue utilizada para asegurarse y respaldar los resultados obtenidos por la prueba de VIDAS CAM. En donde se partió del supuesto, que al utilizar la técnica de VIDAS CAM era posible obtener un 100% de posibilidades de realizar un diagnóstico correcto de *C. jejuni*.

Se utilizó como muestra para este estudio, queso fresco artesanal. Comprado a una finca ubicada en el kilometro 160 en la comunidad de Mazatenango, Suchitepéquez. El motivo de su selección fue por sugerencia como matriz para el estudio, por parte del Laboratorio Nacional de Salud. Estos eran quesos de exportación por lo que se asumió su elaboración con altos estándares de calidad en su producción, además de su facilidad de obtención, la disponibilidad de recursos y las limitaciones del presupuesto del estudio.

Todas las muestras que se utilizaron en el estudio fueron analizadas previamente para asegurar que no estuvieran contaminados con: *Campylobacter*, *Salmonella*, *S. aureus*, *Listeria* y *E. coli*. Después de estos análisis se detectaron en las muestras de queso fresco artesanal la presencia de: *E. coli* y *S. aureus*. Estos resultados no eran esperados, debido a que de acuerdo con el productor, estos quesos artesanales son exportados, por lo que de acuerdo a esto deberían cumplir con altos estándares de producción y calidad. Sin embargo, y para fines de este estudio, se utilizaron ya que al realizar la inoculación con *Campylobacter*, las muestras utilizadas no lo traían como contaminación de origen.

Como describen los resultados, se detectó la presencia de un microorganismo no fermentador en las muestras negativas para *C. jejuni*. Este microorganismo pudo ser una fuente de competencia para el desarrollo de *C. jejuni*, y su caracterización dio como resultado un microorganismo no fermentador, siendo este *Pseudomona stutzeri*. Estudios llevados a cabo en muestras de pollo y gallinas en Colombia reportaron dificultades técnicas para aislar *C. jejuni* por la flora acompañante de *Pseudomona spp* (Castañeda, 2006), lo cual pudo ser el motivo para la no detección de *C. jejuni* en las muestras de queso fresco artesanal analizados.

El crecimiento elevado de la flora acompañante de *Pseudomona stutzeri*, hizo difícil la recuperación del microorganismo. La presencia de esta flora pudo deberse al procedimiento de enfriamiento utilizado para el transporte de las muestras. Como consecuencia de un mal procedimiento de almacenamiento en frío durante el transporte de este lote de muestras, se presentó el desarrollo y supervivencia de flora Gram negativa de tipo no fermentadora como fue el caso de *Pseudomona stutzeri*. Esto reitera la importancia del control de calidad en la toma y transporte de la muestra para su análisis en el laboratorio.

Para el análisis estadístico del estudio, se utilizó la prueba Z de comparación de proporciones independientes, utilizando la distribución normal como aproximación de la solución exacta de los intervalos de confianza para proporciones. Con esta prueba se comparó la detección de la presencia de *C. jejuni* utilizando un nuevo método para el diagnóstico (VIDAS CAM) versus la capacidad de detección de la presencia de *C. jejuni* del método tradicional (BAM). De esta manera se evalúa el valor binario de la variable (presencia/ausencia).

Se determinó que no existe una diferencia significativa en la detección de *Campylobacter* entre ambos métodos ya que se partió del supuesto que la diferencia en la proporción de estas dos poblaciones era cero ( $H_0$ ). Se obtuvo

como resultado de la estimación conjunta de la proporción común supuesta de 0.7674 (Ecuación 3) con un valor Z de 0 (Cuadro 20). Esto indica que ambos métodos pueden ser utilizados en el diagnóstico de *Campylobacter* en alimentos, aunque queda pendiente la verificación de la sensibilidad de ambos métodos. Como también que la hipótesis nula que va a probarse es  $p_1 - p_2 = 0$ , por lo que las proporciones de las dos poblaciones son iguales.

La prueba sustenta que los resultados obtenidos son estadísticamente significativos, y con una media  $p_2 - p_1 \leq 0$  y una desviación estándar de 0.0911 (Ecuación 4) cuando la hipótesis nula es verdadera y las estimaciones muestrales están de acuerdo. Debido a que la hipótesis nula es verdadera, la prueba Z está distribuida aproximadamente como la normal unitaria.

Una de las limitantes del estudio estuvo relacionada con la selección de muestras para la comparación de ambos métodos utilizados (VIDAS CAM y BAM). Esto radicó en que al utilizar un queso artesanal se debían tomar en cuenta diversas variables, dentro de ellas la presencia de cierto tipo de flora que podría haber afectado el crecimiento positivo de *Campylobacter* en las muestras de queso. Como también la disponibilidad del kit de VIDAS CAM, el cual se limitaba únicamente a un cierto número de tiras, lo cual redujo la cantidad de muestras a analizar y estas se encontraban sujetas al tiempo de calibración del equipo.

Los resultados obtenidos permitieron la comprobación de la hipótesis de nula, demostrando que no existe una diferencia significativa en la detección de *Campylobacter jejuni* en la concentración utilizada por el método de VIDAS CAM en comparación con el método de estándar de oro (BAM). Lo cual indica que la técnica de VIDAS CAM podría ser utilizada para el diagnóstico de *C. jejuni* en queso fresco artesanal y es una alternativa rápida que podría ser utilizada en la vigilancia epidemiológica de *Campylobacter*. Además de contribuir a garantizar la inocuidad de alimentos.

## IX. CONCLUSIONES

1. La técnica de VIDAS CAM en comparación con el método del BAM tienen la misma capacidad de detección para un inóculo *Campylobacter* de  $8 \times 10^8$  UFC/25g de queso artesanal.
2. Se caracterizaron morfológica y bioquímicamente las colonias aisladas de 33 muestras positivas como *Campylobacter jejuni* a partir de muestras de queso fresco, utilizando el método tradicional (BAM).
3. Para ambos métodos se obtuvo como resultado de la estimación conjunta de la proporción común supuesta un valor de  $\bar{p} = 0.7674$ .
4. Debido a que la hipótesis nula fue rechazada y el valor de Z igual a 0 con una desviación estándar de 0.0911, se encontró que no existe diferencia significativa entre la técnica de VIDAS CAM y la prueba de estándar de oro en el diagnóstico de *Campylobacter jejuni* en queso fresco inoculado experimentalmente.
5. Los resultados obtenidos a partir de la comparación de proporciones independientes de dos poblaciones utilizando la prueba Z, sugieren que la metodología VIDAS CAM puede ser utilizada como prueba diagnóstica para la detección de *Campylobacter* en queso fresco.

## X.RECOMENDACIONES

1. Se recomienda que para estudios posteriores, se utilice otro tipo de muestras; o se esterilicen las matrices a utilizar, para reducir de esta manera la contaminación externa introducida tanto en la elaboración como en el manejo de la muestra.

2. Se recomienda que se realice un estudio de validación, en donde se utilice un mayor número de muestras que permitan el cálculo de parámetros estadísticos de comparación entre metodologías tales como: la determinación del límite de detección, el límite de cuantificación, cálculo del límite de incertidumbre, precisión y exactitud, para asegurar una mayor confiabilidad en los resultados obtenidos.

3. Se recomienda que al realizar el estudio de validación, se utilicen distintas concentraciones y tratamientos en las muestras que permitan evaluar los parámetros estadísticos de sensibilidad y especificidad de la prueba.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

### ARTÍCULOS CONSULTADOS

Altekruse, Sean, *et al.* 1999. *Campylobacter jejuni*-An emerging foodborne pathogen. *Emerging Infectious Diseases*. 5 (1): 28-35.

Alter, Thomas, *et al.* 2006. *Influence of inoculation levels and processing parameters on the survival of Campylobacter jejuni in German style fermented urkey sausages*. *Food Microbiology*. 23: 701–707.

Callicott, Kenneth, *et al.* 2008. *Broiler Campylobacter contamination and human campylobacteriosis in Iceland*. *Applied and Environmental Microbiology*. 74 (21): 6483-6494.

Endtz, Hubert, *et al.* 1991. *Comparison of six media, including a semisolid agar, for the isolation of various Campylobacter species from stool specimens*. *Journal of Clinical Microbiology*. 29 (5): 1007-1010.

Hinton, Arthur. 2006. *Comparison of growth of campylobacteriaceae on media supplemented with organic acids and on commercially available media*. *International Journal of Poultry Science*. 5 (2): 99-103.

Jacobs-Reitsma, W, *et al.* 2005. *Evaluation of the VIDAS Campylobacter Assay for detection of Campylobacter in fresh poultry products after various enrichment methods*. *European Symposium on the quality of poultry meat*. (pp. 37-39). Doorweth, The Netherlands.

Jayarao, B. M, *et al.* 2006. *A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania*. *Journal of Dairy Science*. 89 (7): 2451–2458.

Jayaro, B. M y D. R. Henning. 2001. *Prevalence of Foodborne Pathogens in Bulk Tank Milk*. *Journal of Dairy Science*. 84 (10): 2157–2162.

- Konkel, Michael, *et al.*. 2007. *Campylobacter jejuni* strains compete for colonization in broiler chicks. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (8): 2297-2305.
- Lafuente, Sarah, *et al.* 2006. El Cólera. *Enfermedades Emergentes*. 8 (1): 10-15.
- McNaughton, R. D; R. Leyland; y L. Mueller. 1982. *Outbreak of Campylobacter enteritis due to consumption of raw milk*. *CMA Journal*. 126: 657-658.
- Moore, John, *et al.* 2005. *Campylobacter*. *Science*. 36: 351-382.
- Newell, D. G. y C. Fearnley. 2003. *Sources of Campylobacter colonization in broiler chickens*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (8): 4343-4351.
- Peterson, Michael. C. 1994. *Clinical aspects of Campylobacter jejuni infections in adults*. *The Western Journal of Medicine*. 161 (2): 148-152.
- Quiñones, Beatriz, *et al.* 2007. *Detection and genotyping of Arcobacter and Campylobacter isolates from retail chicken samples by use of DNA Oligonucleotide Arrays*. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (11): 3645–3655.
- Skånseng, Beate, *et al.* 2007. *Co-infection dynamics of a major food-borne zoonotic pathogen in chicken*. *PLOS Pathogens*. 3 (11): 1790-1797.
- Taylor, David, *et al.* 1982. *Campylobacter enteritis: A large outbreak traced to commercial raw milk*. *The Western Journal of Medicine*. 137 (5): 365-369.
- Walker, Richard, *et al.* (1986). *Pathophysiology of Campylobacter enteritis*. *Microbiological Reviews*. 50 (1): 81-84.
- Yolken, Robert y P. J. Stopa. (1976). *Enzyme-Linked fluoresce assay: ultrasensitive solid-phase assay for detection of human rotavirus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 10 (3): 317-321.

## COMUNICACIÓN PERSONAL

Ministerio de Salud Pública. 2009. *Enteritis debida a Campylobacter spp.* Guatemala: República de Guatemala.

SIECA. 2009. *Quesos: Importación y Exportación.* Guatemala: SIECA.

## LIBROS CONSULTADOS

Altman, Douglas. 2000. *Diagnostic tests.* En Altman, D. G; D. Machin; T. N. Bryant y M. J. Garder. *Statistics with confidence: Confidence intervals and statistical guidelines.* Segunda Edición. (105-109). British Medical Journals Books.

Daniel, Wayne. 1987. *Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud.* (M. Guzmán, Traducción). Editorial Limusa, S.A. de C. V. México D. F.

Gini, Gustavo. 2007. *Manual de Procedimientos para la identificación de las bacterias con importancia clínica.* Tercera edición. Editorial Universitaria. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

Hernández, Roberto; C. Fernández-Collado y P. Baptista. 2006. *Metodología de la investigación.* Cuarta Edición. McGraw-Hill Interamericana. México D.F.

Kopper, Gisella, *et al.* 2009. *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico: Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua.* Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

Mahaut, Michel; R. Jeantet y G. Brulé. 2003. *Introducción a la tecnología quesera.* (S. Ruiz Sáez, Traducción) Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España.

Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. 2008. *Memoria anual de vigilancia epidemiológica 2007*. Guatemala.

Murphy, Kenneth; P. Travers y M. Walport. 2008. *Janeway's Immunobiology*. Séptima edición. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. United States of America.

Moncada-Jiménez, José. 2005. *Estadística para ciencias del movimiento humano*. Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio.

Robinson, R. K y R. A. Wilbey. 2002. *Fabricación de queso, R. Scott*. Segunda edición. (A. Marcos Barado, Traducción) Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España.

Rodríguez-Cavallini, Evelyn, *et al.*. 2005. *Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio*. Editorial Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

Spreer, Edgar. 1991. *Lactología industrial*. Segunda edición. (O. D. Torres-Quevedo, Trans.) Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España.

Varnam, Alan y J. P. Sutherland 1994. *Leche y productos lácteos: tecnología, química y microbiología*. Editorial Acribia, S. A. Madrid, España.

#### PÁGINAS DE INTERNET CONSULTADAS

Banco de Guatemala. 2009. *Comercio Exterior de Guatemala clasificado por producto*. [Con acceso el: 21 de agosto del 2009]. [Web en línea: <http://www.banguat.gob.gt/inc/ver.asp?id=/estaeco/comercio/sac02-07/prod0207DB001.htm&e=73921>].

BioMérieux Industry. 2005. *BioFood: The international newsletter for bioMérieux agri-food partners*. (A. Mérieux, Ed.). Última actualización: Mayo 2010. [Con acceso el: 13 de mayo del 2010]. [Web en línea: <http://www.biomerieux-industry.com/upload/BIOFOOD1.pdf>].

- BioMérieux Industry. 2007. *VIDAS CAM: Detection and confirmation of Campylobacter in food products*. Última actualización: Mayo 2007. [Con acceso el: 17 de agosto del 2009]. [Web en línea: [http://www.biomerieux-industry.com/upload/VidasCAM\\_GB3.pdf](http://www.biomerieux-industry.com/upload/VidasCAM_GB3.pdf)].
- BioMérieux Industry. 2010. *VIDAS® Campylobacter*. Última actualización: Mayo 2010. [Con acceso el: 13 de mayo del 2010]. [Web en línea: [http://www.biomerieux-industry.com/servlet/srt/bio/industry-microbiology/dynPage?open=NDY\\_IND\\_FDA\\_PRD&doc=NDY\\_FDA\\_PRD\\_G\\_PRD\\_NDY\\_16&pubparams.sform=2&lang=en](http://www.biomerieux-industry.com/servlet/srt/bio/industry-microbiology/dynPage?open=NDY_IND_FDA_PRD&doc=NDY_FDA_PRD_G_PRD_NDY_16&pubparams.sform=2&lang=en)].
- Castañeda, S. 2006. *Prevalencia de Campylobacter jejuni en pollo y gallina en canal en Bogotá D.C. durante el mes de junio año 2006*. Última actualización: 2009. [Con acceso el: 13 de mayo del 2010]. [Web en línea: <http://190.25.230.149:8080/dspace/bitstream/123456789/202/1/PREVALENCIA%20DE%20CAMPYLOBACTER%20JEJUNI%20EN%20POLLO%20Y%20GALLINA.pdf>].
- De Mendoza Salcedo, Miguel. Hermoso. 2008. *Campylobacter, un inquietante desafío*. [Con acceso el: 5 de febrero del 2009]. [Web en línea: [http://www.wpsa-aecca.com/img/informacion/15\\_08\\_28\\_TEXTO\\_PONENCIA.pdf](http://www.wpsa-aecca.com/img/informacion/15_08_28_TEXTO_PONENCIA.pdf)].
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2009. *Perspectivas Alimentarias: Análisis de los mercados mundiales*. Última actualización: Junio 2009. [Con acceso el: 24 de Agosto del 2009]. [Web en línea: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012/ai482s/ai482s00.pdf>].
- Hunt, Jan; C. Abeyta y T. Tran. 2008. *BAM: Campylobacter*. Última actualización: Enero 2001. [Con acceso el: 3 de Abril del 2009]. [Web en línea: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm072616.htm#authors>].
- Labmaster Ltd. 2008. *Labmaster Troponin I ELISA*. [Con acceso el: 5 de Octubre del 2009]. [Web en línea: <http://www.labmaster.fi/products/elisakits/troponin-i.htm>].

Universidad Pública de Navarra. (2002). *Microbiología de Alimentos*. [Con acceso el: 26 de Junio del 2009]. [Web en línea: <http://www.unavarra.es/genmic/curso%20microbiologia%20general/001-introduccion%20micro%20alimentos%202.htm>].

University of Idaho. 2009. *Media Descriptions*. [Con acceso el: 21 de Agosto del 2009]. [Web en línea: [http://www.uiweb.uidaho.edu/micro\\_biology/250/Media%20Descriptions.pdf](http://www.uiweb.uidaho.edu/micro_biology/250/Media%20Descriptions.pdf)].

#### PRESENTACIONES CONSULTADAS

Arvelo, Wences. y B. López. 2008. *International Emerging Infections Program (IEIP). International Emerging Infections Program* (p. 24). Guatemala: Universidad del Valle de Guatemala-CES/Proyecto de Colaboración CDC-UVG.

#### PROTOCOLOS CONSULTADOS

Álvarez, Maricruz. 1998. *Laboratorio de Análisis Bacteriológico de Agua, UVG, Protocolos*. Guatemala: Universidad del Valle de Guatemala. Instituto de Investigaciones.

Caffer, María Inés; R. Terrago. y N. Binsztein. 2007. *Manual de procedimientos: diagnóstico y caracterización de Salmonella spp.* WHO Global Salm Surv.

Farace, María Isabel. y M. R. Viñas. 2007. *Manual de procedimientos para el aislamiento y caracterización de Campylobacter spp.* WHO Global Salm Surv.

Lucero, Maria Celeste. y M. Galas. 2008. *Manual de procedimientos: sensibilidad a los antimicrobianos en Campylobacter spp.* WHO Global Salm Surv.

#### TESIS CONSULTADAS

Arturo Canal, Vivian y F. Silva Páez. 2007. *Estudio para la implementación del análisis de Campylobacter spp según la metodología USDA/FSIS MLG capítulo 6 1998 en el laboratorio*

*LABSER de Rancagua, Chile.* Tesis. Pontificia Universidad Javeriana. Microbiología Industrial. Rancagua, Chile.

Paez-Sanabria, Lilian Jhisel. 2008. *Validación secundaria del método de filtración por membrana para la detección de coliformes totales y Escherichia coli en muestras de aguas para consumo humano analizadas en el laboratorio de salud pública del Huila.* Tesis. Pontificia Universidad Javeriana. Microbiología Industrial. Bogota, Colombia.



## A. Cálculos realizados para el análisis estadístico

Determinación de la estimación conjunta supuesta

$$\bar{p} = \frac{x_1 + x_2}{n_1 + n_2}$$

(Ecuación 3)

$$\bar{p} = \frac{33 + 33}{43 + 43}$$

$$\bar{p} = 0.7674$$

Determinación de  $\hat{\sigma}_{\tilde{p}_1 - \tilde{p}_2}$ 

$$\hat{\sigma}_{\tilde{p}_1 - \tilde{p}_2} = \sqrt{\frac{\bar{p}(1-\bar{p})}{n_1} + \frac{\bar{p}(1-\bar{p})}{n_2}}$$

(Ecuación 4)

$$\hat{\sigma}_{\tilde{p}_1 - \tilde{p}_2} = \sqrt{\frac{0.7674(1 - 0.7674)}{43} + \frac{0.7674(1 - 0.7674)}{43}}$$

$$\hat{\sigma}_{\tilde{p}_1 - \tilde{p}_2} = 0.0911$$

Prueba Z

$$Z = \frac{(\tilde{p}_1 - \tilde{p}_2) - (p_1 - p_2)}{\hat{\sigma}_{\tilde{p}_1 - \tilde{p}_2}}$$

(Ecuación 5)

$$Z = \frac{(0.7674 - 0.7674) - (33 - 33)}{0.0911}$$

$$Z = 0.000$$