

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Determinación de la prevalencia de *Campylobacter sp.* en ensaladas de verduras provenientes de mercados de la ciudad capital

Trabajo de investigación presentado por Alejandro de Paz Gúzman para optar al grado académico de Licenciado en Nutrición.

Guatemala,

2020



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Determinación de la prevalencia de *Campylobacter sp.* en ensaladas de verduras provenientes de mercados de la ciudad capital

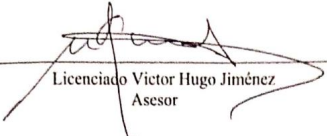
Trabajo de investigación presentado por Alejandro de Paz Gúzman para optar al grado académico de Licenciado en Nutrición.

Guatemala,

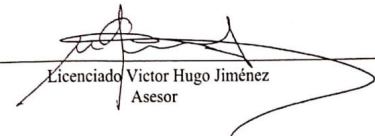
2020

HOJA DE APROBACIÓN

Vo. Bo.:

(f)   
Licenciado Victor Hugo Jiménez  
Asesor

Tribunal Examinador:

(f)   
Licenciado Victor Hugo Jiménez  
Asesor

(f)   
Licenciada Ana Isabel Rosal Martínez

(f)   
Licenciada Elva García Echeverría

Fecha de aprobación: Guatemala, 15 de Junio de 2020



## PREFACIO

La elaboración de este trabajo de graduación surgió del interés en conjunto de mi asesor y mi persona, de profundizar en las implicaciones del incumplimiento de las buenas prácticas de higiene y el riesgo de contraer enfermedades transmitidas por los alimentos al consumidor.

Por tal razón, y la suposición que la contaminación cruzada podría ser la causa de prevalencia de *Campylobacter sp.* (bacteria causante de enfermedades gastrointestinales), se llevó a cabo este estudio en lugares concurridos como lo son los mercados en la ciudad de Guatemala. Asimismo, debo señalar que el proceso de experimentación, instalaciones, disponibilidad de reactivos y uso de equipo fue posible gracias al departamento de Ingeniería en Alimentos, el Departamento de Nutrición de la Universidad del Valle de Guatemala, Distribuidora y procesadora de Alimentos S.A. y al Grupo DUWEST.

Por otra parte, me permito agradecer al Licenciado Victor Hugo Jiménez por sus asesorías en la delimitación de la presente tesis, así como la confianza que me otorgó durante todo el proceso desde su concepción, hasta su presentación. A mis padres, abuelos, familia amigos y al departamento de Nutrición, ya que fueron parte fundamental durante todo el proceso de mi carrera.

## CONTENIDO

<b>PREFACIO</b> .....	<b>IV</b>
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>SINOPSIS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>2</b>
<b>A. GENERAL</b> .....	<b>2</b>
<b>B. ESPECÍFICOS</b> .....	<b>2</b>
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	<b>3</b>
<b>IV. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>4</b>
<b>V. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>5</b>
<b>A. <i>CAMPYLOBACTER</i></b> .....	<b>5</b>
<b>1. Características generales</b> .....	<b>5</b>
<b>2. Campilobacteriosis</b> .....	<b>5</b>
<b>a. Epidemiología</b> .....	<b>6</b>
<b>b. Fuentes de contaminación</b> .....	<b>7</b>
<b>c. Diagnóstico de Campilobacteriosis</b> .....	<b>7</b>
<b>d. Síntomas y duración</b> .....	<b>7</b>
<b>e. Complicaciones</b> .....	<b>8</b>
<b>f. Tratamiento</b> .....	<b>8</b>
<b>g. Resistencia a antibióticos</b> .....	<b>8</b>
<b>B. MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE <i>CAMPYLOBACTER SP.</i></b> .....	<b>9</b>
<b>1. Composición de los medios de aislamiento</b> .....	<b>9</b>
<b>2. Medios de aislamiento</b> .....	<b>10</b>
<b>C. RELACIÓN <i>E. COLI</i> Y <i>CAMPYLOBACTER SP.</i></b> .....	<b>12</b>
<b>VI. METODOLOGÍA</b> .....	<b>13</b>
<b>A. TIPO DE ESTUDIO</b> .....	<b>13</b>
<b>B. MUESTRA</b> .....	<b>13</b>
<b>C. VARIABLES</b> .....	<b>14</b>
<b>D. INSTRUMENTOS</b> .....	<b>15</b>
<b>E. METODOLOGÍA</b> .....	<b>15</b>
<b>VII. RESULTADOS</b> .....	<b>16</b>

<b>VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>17</b>
<b>IX. CONCLUSIONES .....</b>	<b>19</b>
<b>X. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>20</b>
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>21</b>
<b>XII. ANEXOS.....</b>	<b>24</b>

## LISTA DE CUADROS

CUADRO 1: RESULTADOS DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS PROVENIENTES DE 5 MERCADOS.....	16
CUADRO 2: CAPACITACIÓN DE BUENAS PRÁCTICAS DE MANIPULACIÓN DE ALIMENTOS RECIBIDAS POR LOS DUEÑOS/TRABAJADORES DEL LOCAL .....	16
CUADRO 3 : CORRELATIVOS DE LA PRIMERA LECTURA DE MUESTRAS,. MERCADOS CENTRAL Y LA TERMINAL.....	25
CUADRO 4 : CORRELATIVOS DE LA SEGUNDA LECTURA DE MUESTRAS. MERCADOS LA PLACITA Y EL GUARDA.....	27
CUADRO 5 : CORRELATIVOS DE LA TERCERA LECTURA DE MUESTRAS. MERCADOS CENTRAL Y COLÓN.....	28
CUADRO 7 : SEGUNDA EXTRACCIÓN DE MUESTRAS MERCADOS PLACITA Y GUARDA.....	30
CUADRO 8: TERCERA EXTRACCIÓN DE MUESTRAS MERCADOS CENTRAL Y CENTRAL DE MAYOREO CENMA CENMA .....	31

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: DISTRIBUCIÓN DE MERCADOS MUESTREADOS, EN LA CIUDAD CAPITAL DE GUATEMALA. ....	24
FIGURA 2. ESQUEMA GENERAL DE LOS PROCEDIMIENTOS REALIZADOS PARA EL TRABAJO DE CAMPO.....	25
FIGURA 3. DIAGRAMA DE FLUJO DE METODOLOGÍA ESPECÍFICA DE EXPERIMENTACIÓN .....	34

## SINOPSIS

Para el año 2016, en Guatemala, se reportaron un total de 583,698 casos de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS), en la población. Para un país en vías de desarrollo como Guatemala, se ha encontrado que hasta un 40% de los niños de una muestra portan *Campylobacter sp.*, el cuál es la principal causa de enfermedad intestinal bacteriana en humanos identificada en muchos países.

El objetivo principal de este estudio es la determinación de la prevalencia de *Campylobacter sp.* en muestras de ensaladas de verduras provenientes de mercados de la ciudad Capital de Guatemala. Aunado a lo anterior, se planteó la existencia de la correlación entre *Campylobacter sp.* y *E. coli* siendo la cuantificación de dicha relación otro objetivo planteada para el presente trabajo.

Para responder a dicho planteamiento, se realizó el análisis de reacción en cadena de polimerasa (PCR) en 90 muestras de ensaladas provenientes de cinco mercados distintas, ubicados en la ciudad de Guatemala, para determinar dicha prevalencia. Obteniendo como resultado una prevalencia menor al 1% en las muestras analizadas. En el estudio se evidenció que las prácticas de higiene y manipulación de alimentos son suficientes para evitar el desarrollo de *Campylobacter sp.* en el tipo de muestras analizadas.

También, cabe destacar que no se puede afirmar y tampoco descartar la hipótesis planteada que hace referencia a la relación entre la coexistencia entre *E. coli* y *Campylobacter sp.* debido al error humano con la manipulación de medios para dicha prueba.

## I. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) la tasa de aislamiento de *Campylobacter sp.* en niños menores de 5 años es del 12%. Debido a que su aislamiento requiere de un medio de cultivo, y condiciones de incubación especiales, su búsqueda no se efectúa rutinariamente. Es por ello que se determinó la prevalencia de dicha bacteria, haciendo uso de técnicas de aislamiento e inoculación microbiológicas con medios selectivos para su identificación.

Para su determinación, se aplicó el método de análisis de reacción en cadena de polimerasa (PCR), utilizando cinco mercados como puntos de muestreo y un análisis de 90 muestras de ensaladas de vegetales. Al analizar los resultados se determinó que la prevalencia de aislamiento obtenida fue menor al 1%, estableciendo que se cumple el supuesto de la hipótesis nula planteada, ya que no existe prevalencia de *Campylobacter sp.* en las muestras analizadas.

Por tal razón, se demuestra que, a pesar de que las condiciones de higiene en los mercados de Guatemala en otros estudios han presentado deficiencias, las prácticas de manipulación adoptadas por los dueños de los puestos analizados, son influyentes para evitar el desarrollo de *Campylobacter Sp.* en el tipo de muestras analizadas.

Por lo que se recomienda utilizar un radio de muestreo de mercados más amplio, y por lo tanto mayor cantidad de muestras a analizar para establecer una estadística más representativa. Además de hacer uso de la correlación entre la presencia de *E. coli* y prevalencia de *Campylobacter sp.* para tener un panorama más claro y acertado en cuanto a los resultados encontrados en el análisis, y poder determinar otras fuentes de contaminación en las muestras analizadas

## II. OBJETIVOS

### A. General

Determinar la prevalencia de *Campylobacter Sp.* en ensaladas de verduras en un mercado municipal de la ciudad de Guatemala.

### B. Específicos

1. Detectar la presencia de *Campylobacter sp.* en muestras de ensaladas de verduras provenientes de un mercado municipal de la ciudad de Guatemala.
2. Establecer la relación que existe entre la presencia de *E. coli* y la prevalencia de *Campylobacter sp.* ensaladas de frutas y verduras de un mercado municipal de la ciudad de Guatemala.

## II. HIPÓTESIS

Hipótesis de investigación: Las ensaladas de verduras provenientes de un mercado municipal de la Ciudad de Guatemala analizadas presentan *Campylobacter sp.*

Hipótesis nula: En las ensaladas de verduras provenientes de un mercado municipal de la Ciudad de Guatemala analizadas, no hay presencia de *Campylobacter sp.*

Hipótesis de investigación: Sí hay presencia de *E. coli*, por lo tanto, existe presencia de *Campylobacter sp.* en ensaladas de verduras provenientes de un mercado municipal de la Ciudad de Guatemala.

Hipótesis nula: No existe una relación entre la presencia de *E. coli* y la presencia de *Campylobacter sp.* en ensaladas de verduras provenientes de un mercado municipal de la Ciudad de Guatemala.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

Para el año 2016, en Guatemala, se reportaron un total de 583,698 casos de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS), en la población total del país. Siendo la tasa de incidencia para el año 2017 de 3,525 casos de ETAS por cada 100,000 habitantes . (Aldana, 2017). Para un país en vías de desarrollo como Guatemala, se ha encontrado que hasta un 40% de los niños de una muestra portan *Campylobacter Sp*, la cual es la principal causa de enfermedad intestinal bacteriana en humanos identificada en muchos países. (Álvarez, 2007)

De acuerdo con la OMS la tasa de aislamiento de la bacteria en niños menores de 5 años es del 12%. Debido a que su aislamiento requiere de un medio de cultivo, y condiciones de incubación especiales, su búsqueda no se efectúa rutinariamente, lo cual debería hacerse debido a su importancia epidemiológica. Sin embargo, existe una relación entre la prevalencia *Campylobacter sp.* y la presencia de *E. Coli*, lo cual supondría una metodología más accesible de realizar debido a que la segunda es más factible de aislar en alimentos listos para consumo de venta callejera, como lo son las ensaladas de frutas y verduras que previenen de mercados municipales de la ciudad capital.

Actualmente la población guatemalteca, adquiere alimentos listos para consumo (ensaladas de fruta o verduras) provenientes de algún lugar con mucha afluencia de personas. Dichos establecimientos son los mercados, cuentan con escasas o nulas prácticas de higiene y sanitación de los alimentos, lo cual puede ser considerado un foco de infección para la población que consume alimentos de la procedencia de dichos establecimientos.

El proyecto propuesto es de carácter técnico y cuantificable, con resultados reproducibles obteniendo como resultado una base de datos de prevalencia de *Campylobacter sp.* en ensaladas y su relación de presencia o ausencia cuando se analiza en conjunto con *E. coli*.

## V. MARCO TEÓRICO

### A. *Campylobacter*

*Campylobacter sp.* pertenece a la familia *Campylobacteriaceae*. La cual, a su vez incluye los géneros *Campylobacter sp.*, *Arcobacter sp.* y *Sulfospirillum*. Dentro del género *Campylobacter* se encuentran diversas especies, sin embargo, las bacterias enteropatógenas más importantes para humanos son *Campylobacter Sp.* y *Campylobacter coli* (Soto, 2011).

#### 1. Características generales

Se conoce como una bacteria no formadora de esporas, Gram negativos, con una morfología en forma de bastón curvado (FDA, 2012). Miembros del género *Campylobacter* son microaerofílicos, ya que estos crecen a niveles de oxígeno inferiores al de la atmósfera. Crecen en concentraciones de 3 a 5 % de oxígeno. Condiciones que afectan a *Campylobacter sp. son*: calor, congelamiento, desinfectantes y condiciones ácidas (Soto, 2011).

La temperatura óptima para el crecimiento de *Campylobacter sp.* es de 42°C, a pesar de su carácter termófilo, se ha encontrado que la muerte celular ocurre a 56-57°C. También se ha determinado que el rango de pH óptimo para el desarrollo de dicha bacteria es de 6.5 a 7.5. Sin embargo puede crecer en un rango de 4.9 a 9, no existe estudios en donde se demuestre que *Campylobacter sp.* Crece en ambientes más ácidos que 4.9 (Soto, 2011).

#### 2. *Campilobacteriosis*

*Campilobacteriosis* se describe como cualquier enfermedad causada por bacterias del género *Campylobacter sp.* la única forma de *Campilobacteriosis* de interés en salud pública es la enteritis causada por *Campylobacter sp.* y *C.coli*. *Campylobacter sp.* es una de las bacterias más comúnmente aisladas en desechos fecales de infantes en países en vías de desarrollo. Dicha infección es el resultado del consumo de agua o comida contaminada; sin embargo programas de vigilancia en países en vías de desarrollo no existen como tal (Coker, et al. 2002).

La dosis necesaria a consumir para causar una infección es de 10,000 células de *Campylobacter sp.* Sin embargo, en algunos estudios se ha encontrado que se necesita una cantidad tan pequeña como 500 células para causar la enfermedad. Anuado a lo anterior, existen varios factores que pueden condicionar dicha cantidad. Estos pueden ser el estado de salud en general de la persona y el alimento ingerido (FDA, 2012).

Para *Campylobacter sp.*, el tiempo de incubación desde el periodo de exposición a la dosis infecciosa se encuentra en un rango de 2 a 5 días, en los cuales se puede apreciar la sintomatología característica de la infección por *Campylobacter jejuni* (FDA, 2012).

Infantes menores de 5 años de edad y adultos de 15 a 29 años son las poblaciones en las cuales la gastroenteritis por *Campylobacter sp.* es lo más común. La tasa de incidencia de infección más alta se encuentra en infantes de 6 a 12 meses de edad. *Campylobacter sp.* también afecta a las mujeres embarazadas, lo cual lleva a una infección en el feto, llegando a ser causa de abortos espontáneos. La incidencia de infección se estima que es de 40 veces más grande en personas que padecen de VIH/Sida (Cardinale, *et al.* 2003).

#### a. Epidemiología

Los seres humanos con infección activa por *Campylobacter sp.* son fuente de infección. En Estados Unidos los portadores son poco frecuentes. Sin embargo en países en vías de desarrollo hasta un 40% de los niños de una muestra portan *Campylobacter sp.* sin aparente sintomatología característica.

*Campylobacter sp.* es considerado la tercera causa más abundante de enfermedades transmitidas por alimentos en Estados Unidos. Con un estimado de 845,024 casos anuales, de acuerdo a 2011 Centros de Control y Prevención de enfermedades (CDC). La incidencia de casos reportados por la CDC en 2008 fue de 12,68 por cada 100,000 individuos. Se estima que, por cada caso reportado de *campylobacteriosis*, 30 casos no son reportados (FDA, 2012).

Aunque son escasos los reportes con respecto a la incidencia de dicho microorganismo en alimentos, un estudio realizado por Quiñones *et al.*, (2000) en el que se analizaron un total de 100 muestras de tacos de pollo asado, manifiestan la prevalencia de este patógeno en el 27% de las muestras.

En 2007 los investigadores del Departamento de Salud Pública de la Universidad de Guadalajara, realizaron una búsqueda de *Campylobacter sp./coli* en carne cruda de pollo en Guadalajara y Zapopan, Jalisco, México. Los resultados mostraron que la carne independientemente del punto de venta ( 42 mercados, 19 pollerías y 12 carnicerías), presentaba una tasa alta de contaminación con especies de *Campylobacter*. Del total, 70 (71,4%) estuvieron contaminadas con *Campylobacter sp.* (Soto, 2011).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), en Guatemala la tasa de aislamiento de esta bacteria en niños menores de 5 años es de 12,1%, tasa similar a la encontrada hace 20 años por cruz y torres en diferentes lugares del país. Estos resultados son comparables con otros estudios similares en Latinoamérica. La frecuencia mundial de aislamientos a partir de coprocultivos varía del 4 al 30% (Alvarez, 2007).

## b. Fuentes de contaminación

*Campylobacter sp.* se encuentra en varios productos alimenticios de origen animal. Lo cual implica que la carne, leche sin pasteurizar y aves de corral como pollos, son fuentes de contaminación para el ser humano (Alterkruse, *et al.* 1999).

Un reporte epidemiológico mostró un 98% de aislamiento de dicha bacteria presente en carne de pollo ( Friedman, *et.al.* 2004). En otro estudio realizado con leche de vaca no pasteurizada, proveniente de una granja de lácteos al este de Tennessee Estados Unidos, se encontró que el 12% se encontraba contaminada, algunas fuentes de contaminación para dicho producto son las heces bovinas y mastitis debido al proceso de extracción. (Alterkruse, *et al.* 1999).

Los mecanismos de la patogenia por *Campylobacter sp.* todavía no han sido completamente descritos. Usualmente se basan en la virulencia presente en la cepa de *Campylobacter sp.* en particular. En general, *Campylobacter sp.* es causante de infecciones por medio de la invasión y colonización del tracto gastrointestinal. (Blaser, 1997).

## c. Diagnóstico de *Campilobacteriosis*

Las muestras habitualmente usadas en los procedimientos diagnósticos son las heces o hisopos rectales. Las muestras deben ser manejadas apropiadamente y examinadas lo más pronto posible. Es posible hacer un diagnóstico presuntivo de enteritis por *Campylobacter sp.* si se observan las siguientes características en la muestra analizada: Formas curvas, gram negativa, forma de S, forma en ala de gaviota o en largas espirales cuando se observan bajo un microscopio. En fresco se debe poder observar la movilidad del microorganismo debido al flagelo polar que posee. La visión de abundantes leucocitos junto a bacilos gram negativos pequeños y curvos sugiere la existencia de una enteritis por *Campylobacter sp.* (Pumarola, *et al.* 1987).

## d. Síntomas y duración

La mayoría de los casos de infecciones por *Campilobacteriosis* no duran mucho tiempo. Usualmente duran entre 2 a 10 días de evolución (FDA, 2012). La sintomatología que está presente en personas que se encuentran infectados por *Campilobacteriosis* se destaca por (Perales, *et al.* 2002):

- Fiebre
- Diarrea
- Calambres abdominales
- Debilidad muscular
- Cefalea
- Vómitos
- Heces muco-sanguinolentas.

#### e. Complicaciones

Generalmente no hay complicaciones posteriores. En un 15-20% de los casos se pueden producir recaídas y en un porcentaje mucho menor algunas secuelas más graves. Algunas complicaciones son:

Artritis reactiva: es un proceso que se presenta en un 1 a 7% de infecciones por *Campylobacter sp.* Se trata de un proceso post-infeccioso que se manifiesta normalmente entre los 7 y 14 días después del comienzo de los síntomas. La duración de la artritis oscila desde varias semanas hasta un año (Soto, 2011).

Síndrome de Guillain-Barré: se describe como una neuropatía caracterizada por parálisis muscular acompañada por sensación de ardor, dolor y debilidad muscular. La complicación por el síndrome de Guillain Barré es rara, ya que ocurre en 1 de cada 1000 casos de Campilobacteriosis. Sin embargo en hallazgos recientes de serología y cultivos indican que del 30 al 40% de los pacientes que cursan con el síndrome, tuvieron una infección por *C. jejuni*. (Allos, 1997).

#### f. Tratamiento

El uso de antibióticos es controversial, algunos estudios muestran que la eritromicina elimina rápidamente *Campylobacter sp.* de las heces sin afectar la duración de la enfermedad. Aunque su uso imprudente ha provocado un creciente desarrollo de resistencia microbiana. Los estudios en niños con disentería debida a *Campylobacter sp.* han mostrado el beneficio del tratamiento temprano con eritromicina (250 mg/6 horas). Los síntomas severos pueden responder a un tratamiento con antibióticos como azitromicina o fluoroquinolona. Estos pueden acortar la sintomatología si se administran después de manifestarse la enfermedad (Camas, 2006).

Para evitar la deshidratación por diarrea se sugiere el uso de soluciones de electrolitos que ayuden a rehidratar a la persona. Las personas que no puedan ingerir líquidos por la vía oral debido a las náuseas pueden necesitar administración de líquidos por vía intravenosa (Camas, 2006).

#### g. Resistencia a antibióticos

Un agente antimicrobiano se describe como cualquier sustancia que pueda inhibir o matar microorganismos. Estos pueden ser sintéticos, semisintéticos o antibióticos. Estos últimos se describen en la actualidad como cualquier sustancia producida por otro microorganismo que pueda tener el mismo efecto de inhibitorio de crecimiento de otro microorganismo. (Murray *et al.*, 2009).

La *Campylobacteriosis* frecuentemente es una enfermedad auto limitante. En algunos casos el uso de agentes antimicrobianos es justificado cuando dicha enfermedad afecta a personas ancianas o con inmunidad comprometida. En otro caso en el que se encuentra justificado el uso de antimicrobianos es cuando los síntomas se prolongan por varios días. Usualmente el antimicrobiano de elección es la eritromicina que se encarga de la inhibición de la síntesis proteica de microorganismos, inhibiendo su crecimiento y matándolos por falta de sustratos para sobrevivir. Sin embargo en la actualidad se han reportado cepas resistentes a tales sustancias. (Murray *et al.*, 2009).

La FDA reporta que el uso de antimicrobianos usados para la alimentación de animales destinados para consumo humano supera las 100 millones de libras anuales. La resistencia a los antimicrobianos por parte de bacterias patógenas no es poco común. A menudo dichas sustancias son utilizadas en piensos de animales destinados a consumo, de forma desmesurada (Angulo *et al.*, 2004).

Se ha reportado que *Campylobacter sp.* ha alcanzado niveles de resistencia a macrólidos como la eritromicina y a otras sustancias como fluoroquinolonas. Se ha reportado resistencia, coresistencia (resistencia a ambos antibióticos) y multiresistencia (resistencia a antibióticos adicionales). La resistencia a macrólidos es más prevalente en *Campylobacter sp.* aislados de animales ya que se han relacionado como promotores de crecimiento en cerdos (Gibreel and Taylor, 2006).

## B. Métodos de aislamiento de *Campylobacter sp.*

Aunque actualmente no exista una metodología estándar aceptada para el aislamiento de *Campylobacter sp.* a partir de muestras de alimentos, heces o muestras ambientales, se han publicado algunos protocolos para realizar dicho cometido. Tal es el caso del método propuesto por la ISO (International Standard Organization) y la administración de drogas y alimentos (FDA) de Estados Unidos. Es por ello que desde hace muchos años, una variedad amplia de medios de enriquecimiento y cultivo han sido propuestos para el aislamiento de *Campylobacter sp.* (Donnison, 2003).

### 1. Composición de los medios de aislamiento

#### a. Fuente de nutrientes

Debido a que *Campylobacter sp.* es incapaz de poder fermentar carbohidratos, es que se agregan compuestos como peptona la cual funciona como fuente de energía. Dentro de esta categoría encontramos diferentes caldos como lo son el caldo Preston y Exeter, los cuales en su formulación incluyen peptona y extracto de carne como sustratos energéticos. (Bolton and Robertson, 1982).

## b. Sangre

La mayoría de medios usados para el aislamiento de *Campylobacter sp.* contienen una relación 5-7% v/v de sangre. Con el propósito de poder eliminar compuestos tóxicos del oxígeno como el peróxido de hidrógeno, los cuales se forman cuando los medios se exponen a la luz. Aunque normalmente se utiliza sangre lisada de caballo, también es factible la utilización de sangre de cabra para el mismo fin ( Bolton *et al.*, 1984).

## c. Antibióticos

La utilización de dichas sustancias es una práctica muy sugerida para propiciar un ambiente que permita el crecimiento de *campylobacte sp.* Entre los agentes que se han incorporado a la formulación de medios de aislamiento se encuentran: Vancomicina, polimixina B, cicloheximida, nistatina, anfotericina y cefoperazona. Todas las sustancias antes mencionadas son utilizadas con el propósito de disminuir el crecimiento de microorganismos contaminantes, mas no inhiben el crecimiento de *Campylobacter sp.* (Line *et al.* 2002).

Anuando a lo anterior, la adición de antibióticos puede potenciar la recuperación de cepas termotolerantes de *Campylobacter sp.* en algunos protocolos, los caldos inoculados se incuban durante 4 horas a 37 centígrados seguido de la adición de antibióticos y luego se transfieren a microaerofilia a 42 centígrados durante 44 horas (Wallace, 1997).

## 2. Medios de aislamiento

### a. Medios aeróbicos

Las opciones de medios selectivos para el aislamiento de *Campylobacter*, ha aumentado. Ya que de forma paulatina se ha ido incorporando a la formulación: eliminación o adición de sangre, agentes secuestradores de oxígeno y variación de antibióticos. Sin embargo, la mayoría de estos medios necesitan de un ambiente microaerofílico para la incubación lo cual aumenta el costo de la identificación de este microorganismo ( Shimada y Tsuji , 1986).

Debido a ello, se empezaron a formular caldos que no necesitaran de este tipo de atmósfera y permitieran una incubación aeróbica. En 1986 Shimada y Tsuji desarrollaron un cultivo para la recuperación de *Campylobacter sp.* el cual en su formulación se encontraban presentes sangre de caballo, caldo brucella, carne cocida, acompañado de la suplementación con vancomicina, polimixina B, trimetropim y anfoetricina B. Este permitía la incubación de microorganismos, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas y microaerofílicas.

Posteriormente en 1995, Tran realizó estudios con la incorporación de Oxirasa al medio CEB (*Campylobacter enrichment broth*) con el propósito de la recuperación de *Campylobacter sp.* en

alimentos artificialmente contaminados (leche cruda, ostras, cangrejos y champiñones). Los resultados de dicho estudio indicaron que no había una diferencia significativa entre el medio enriquecido con oxirasa y el medio tradicional (CEB) sin dicho compuesto. Sin embargo, el medio enriquecido fue posible de utilizar en medio de incubación anaeróbica, a diferencia del primero que debía ser en microaerofilia. Añadido a esto el medio enriquecido representó una disminución de recursos como: tiempo de incubación y menor costo económico (Tran, 1995).

#### *b. Reacción en cadena de polimerasa (PCR)*

Uno de los principales objetivos en el desarrollo de tecnologías rápidas para la detección de microorganismos, es la disminución del tiempo total invertido en el ensayo. Las técnicas moleculares como el uso de PCR, han sido altamente efectivos para la detección de patógenos en alimentos entre los cuales se encuentran *Yersinia spp*, *s. aureus*, *Listeria spp* y *E. coli* (Kawasaki *et al.*, 2009).

En general, los métodos basados en la detección de ADN de las bacterias, especialmente de *Campylobacter* poseen ciertas ventajas si son comparados con los métodos tradicionales. algunas de las ventajas incluyen : disminución del tiempo de ensayo, capacidad de identificar las diferentes formas de *Campylobacter sp.* y la capacidad de poder identificar diferentes genes del microorganismo. La metodología con PCR también permite la detección de formas no cultivables de *Campylobacter sp.* Para *Campylobacter* los métodos de PCR han mostrado ser altamente específicos y sensibles para la detección de dicho microorganismo en alimentos que son contaminados de forma natural ( Katzav *et al.*, 2008).

En estudios actuales como el caso de Pitkanen *et al.*, 2009 , se utilizó un sistema llamado Portable Microbe Enrichment Unit (PMEU) para el enriquecimiento de condiciones microaerofílicas y lo comparó con el método estándar ISO 1795, el cual utilizaba el caldo Bolton y Preston. Con ello se logró el desarrollo de un método útil para el enriquecimiento de *Campylobacter sp.* para muestras de agua. Obteniendo como resultado la disminución del tiempo de incubación a 5 horas para ser detectado por PCR. sin embargo como una desventaja que pudiese ser descrita para este sistema, radica en la manipulación de la muestra, ya que dicha técnica involucra la utilización de jeringas y bombas. Además ha sido usado únicamente para la búsqueda de *Campylobacter sp.* en muestras de agua (Pitkanen *et al.*,2009).

### C. Relación *E. coli* y *Campylobacter sp.*

El trabajo de Roccato ,2018. Describe la posibilidad de usar *E. coli* como indicador de contaminación de *campylobacter* utilizando muestras de pollo destinado para consumo. De acuerdo a los resultados recabados de dicha investigación, existe hasta un 70% de probabilidad de identificar una contaminación de *Campylobacter sp.* cuando los conteos de unidades formadoras de colonias fuesen mayores a  $3 \log 10$  CFU/g para *Campylobacter sp.* y los conteos de *E.coli* fuesen de al menos  $4 \log 10$  CFU/g.

De acuerdo con el estudio anterior, la cuantificación de *E. coli* representa una herramienta útil y plausible en la industria alimentaria, ayudando a identificar lotes de pollo destinado para consumo. En caso de encontrar altos conteos de *E. Coli*, sería una indicación de pobres prácticas de higiene adoptadas por los rastros, criaderos y mataderos de animales destinados para consumo humano. Por lo que se deben instaurar sistemas de acciones correctivas y preventivas en la cadena de procesamiento en dichos establecimientos ( Roccato,2018)

Según el estudio de Habib *et al.* (2012) el 80% de los lotes de pollo con conteos altos de *Campylobacter sp.* (mayor a  $3 \log 10$  CFU/g) podían ser detectados mediante el monitoreo de *E. coli* y tomando acciones correctivas si el conteo de *E.coli* excedía  $3 \log 10$  CFU/g. (Habib *et al.* 2012). En otro estudio realizado, se mostró una reducción de conteos, tanto de *Campylobacter sp.* como de *E. coli*, después de un proceso térmico de enfriamiento en dos de tres mataderos analizados. Sin embargo el proceso de enfriamiento mostró reducir mayormente los conteos de *E.coli* en comparación a los conteos de *Campylobacter sp.* De hecho *Campylobacter sp.* logra una buena supervivencia en pollo para consumo en temperaturas de enfriamiento (Georgsson *et al.* 2006; Sampers *et al.* 2010).

## VI. METODOLOGÍA

### A. Tipo de estudio

Diseño cuasi experimental :

Aunque las muestras se pueden aleatorizar, sigue habiendo un proceso de exclusión ya que no se estudiaron otras bacterias que no sean *Campylobacter sp.* ni *E. coli*

### B. Muestra

El análisis se realizó adquiriendo y analizando 90 muestras de ensaladas de verduras, las que se seleccionaron de forma aleatoria en los primero 90 puestos que vendían dicho producto de los mercados Central, La terminal, Mercado la Placita, El Guarda y Central de mayoreo Cenma (como se observa en la Fig.1).

Aunque el objetivo de este trabajo indique que el muestreo se iba a realizar en un solo mercado (Mercado Central), se decidió tener mayor representatividad escogiendo los mercados antes mencionados. Esto debido a que en el Mercado Central solo se encontraron 30 puestos de muestreo, es por ello que teniendo en cuenta el supuesto de la aleatoriedad y no repetición de puestos muestreados, se decidió utilizar cinco establecimientos en lugar de uno.

#### 1. Criterios de inclusión

- a. Ensaladas de verduras
- b. Ensaladas frescas listas para consumo
- c. Ensaladas cuya base de preparación sea lechuga
- d. Ensaladas servidas en platos plásticos, duroport o bandejas

#### 2 Criterios de exclusión

- a. Ensaladas de frutas
- b. Ensaladas que son preparadas en el mismo lugar
- c. Ensaladas que incluyan alimentos previamente preparados ej. Pre cocido.
- d. Ensaladas servidas en bolsas.

### C. Variables

A continuación se muestra el desglose de las variables en relación a las hipótesis planteadas:

Problemas específicos	Objetivos específicos	Hipótesis específicas	Variables	Operación de variables
¿Cuál es la prevalencia de <i>Campylobacter sp.</i> en las ensaladas de frutas y verduras en un mercado municipal de la ciudad de Guatemala?	Detectar la presencia de <i>Campylobacter sp.</i> en muestras de ensaladas de frutas y verduras provenientes de un mercado municipal de la ciudad de Guatemala.	Hipótesis de investigación: las ensaladas de frutas y verduras cuentan con la presencia de <i>Campylobacter sp.</i>  Hipótesis nula: En las ensaladas de frutas y verduras no hay presencia de <i>Campylobacter sp.</i>	independiente: <i>Campylobacter sp.</i>  Dependiente: presencia o ausencia de <i>Campylobacter sp.</i>	<i>Campylobacter sp.</i> bacteria patógena, gram negativa causante de enteritis gástrica. Inoculable con medios de cultivos selectivos secundarios a una confirmación por métodos moleculares.
¿Existe una relación proporcional de la prevalencia de <i>Campylobacter sp.</i> con la presencia de <i>E.coli</i> en ensaladas de frutas y verduras obtenibles de un mercado municipal de la ciudad de Guatemala?	Establecer la relación que existe entre la presencia de <i>E. coli</i> y la prevalencia de <i>Campylobacter sp.</i> en ensaladas de frutas y verduras obtenibles de un mercado municipal de la ciudad de Guatemala.	Hipótesis de investigación: si hay presencia de <i>E. coli</i> por lo tanto existe presencia de <i>Campylobacter sp.</i> en ensaladas de frutas y verduras.  Hipótesis nula: no existe una relación entre la presencia de <i>E.coli</i> y la presencia de <i>Campylobacter sp.</i> en ensaladas de frutas y verduras.	Independiente: presencia de <i>E.coli</i> y <i>campylobacter sp. en ensaladas de frutas y verduras.</i>  Dependiente: causalidad entre la presencia de <i>Campylobacter sp.</i> y <i>E.coli</i>	<i>Campylobacter sp.</i> bacteria patógena causante de enteritis, encontrada en heces fecales. <i>E.coli</i> bacteria patógena aislada en heces fecales, presente cuando hay un pobre proceso higiénico en la manipulación de alimentos. Aislamiento mediante un medio selectivo que cuente con los sustratos necesarios para poder inocular ambas bacterias.

#### D. Instrumentos

El instrumento, que se utilizó para la recopilación de datos que permitan identificar la prevalencia de *Campylobacter sp.* se observa en el Anexo 1.

#### E. Metodología

##### 1. Para la recolección de muestras:

Se visitaron cinco mercados donde se seleccionó al azar 90 puestos en los que se compró una muestra de ensalada de acuerdo con los criterios de inclusión. (Incluir los mercados).

##### 2. Transporte de la muestra.

Las muestras se colocaron en una hielera, con bolsas de hielo para asegurarse de que estén mantengan una cadena de frío, para que su análisis sea en un estado lo más fresco posible del producto.

##### 3. Análisis de la muestra.

Posteriormente se pesaron e incubaron en anaerobiósis con el objetivo de brindar las condiciones ideales para su crecimiento. Finalmente, cada muestra fue colocada en tubos individuales los cuales se identificaron con un código y se analizaron haciendo uso del programa de biología molecular para computadora, en donde las celdas positivas quedaban marcadas con una cruz verde y las negativas con un guión rojo. (Ver anexos 2 y 3 de la metodología detallada).

##### 4. Análisis de resultados.

Se contabilizó el número de resultados positivos (cruz verde) y los negativos (cruz roja) para estimar la prevalencia de *Campylobacter sp.*

## VII. RESULTADOS

De acuerdo con la metodología establecida, se analizaron las 90 muestras de ensaladas cumpliendo la metodología PCR para la determinación de la prevalencia de *Campylobacter sp.* en las muestras provenientes de 5 mercados. (Ver anexo 2, figura 3.)

Como se observa en el Cuadro 1, ninguna muestra dio positiva a la presencia de *Campylobacter sp.*

Cuadro 1: Resultados de las muestras analizadas provenientes de 5 mercados.

<b>Mercado</b>	<b>Número de muestras analizadas</b>	<b>Presencia de <i>Campylobacter sp.</i></b>
Central	30	0
La Terminal	15	0
La Placita	20	0
El Guarda	10	0
Central de mayoreo Cenma	15	0

Aunque no era un objetivo del estudio se investigó sobre la capacitación de los dueños de los locales con relación a buenas prácticas de higiene (ver Cuadro 2).

Cuadro 2: Capacitación de buenas prácticas de manipulación de alimentos recibidas por los dueños/trabajadores del local.

<b>Mercado</b>	<b>Número de puestos analizados</b>	<b>¿Recibió alguna capacitación previa?</b>	
		<b>No</b>	<b>Sí</b>
Central	30	28	2
La Terminal	15	15	-
La Placita	20	13	7
El Guarda	10	10	-
Central de mayoreo Cenma	15	11	4

## VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El objetivo principal del presente trabajo, fue determinar la prevalencia de *Campylobacter sp.* en muestras de ensaladas preparadas en cinco distintos mercados de la ciudad de Guatemala. Los mercados en los que se realizó el muestreo fueron el Mercado Central, La Terminal, Mercado la Placita, El Guarda y Central de mayoreo CENMA.

Como se puede observar en el Cuadro 1, del total de muestras analizadas, no se tuvo ningún caso positivo para *Campylobacter sp.* según la prueba de biología molecular realizada, con una tasa de aislamiento para dicho experimento menor al 1%. Cabe mencionar que el resultado obtenido, concuerda con el estudio realizado por *Mederiros et al. 2008*, en el que se muestren ensaladas listas para consumo (42 muestras) ninguna de las muestras analizadas fue positiva para *Campylobacter sp.* es posible que el resultado obtenido puede deberse a que no hubo suficiente exposición a contaminación cruzada y que la higiene superficial utilizando únicamente agua fue suficiente para obtener dicho porcentaje de aislamiento.

Sin embargo, en un estudio realizado en México por *Quiñones et al., (2000)* obtuvo como resultado un 27% de aislamiento en 100 muestras analizadas, cabe aclarar que dichas muestras fueron en tacos de pollo, siendo el pollo el vehículo más frecuente de transmisión de dicha bacteria, por lo que la contaminación cruzada no fue un factor determinante para el hallazgo de *Campylobacter sp.* en muestras de ensalada a pesar de la utilización de una metodología bastante sensible como lo es la biología molecular.

Cabe destacar también que se realizó una consulta sobre proceso de formación y capacitación recibida con relación a buenas prácticas de manipulación de alimentos, utilizando el formulario de preguntas observado en el anexo 1. Como se observa en el Cuadro 2 de la sección de resultados, solo 13 puestos del total analizados (90) cuentan con alguna capacitación acerca de la higiene para manipular alimentos. Esto posiblemente se debe a falta de interés de los dueños en general o a falta de personal que atienda sus puestos durante la ausencia para atender dichos seminarios.

Sin embargo se encontró que los dueños de los locales que indicaron recibir información, dicha es proveniente de terceros y no de una institución formal, siendo la principal fuente sus familiares y vecinos (9 personas) de las personas que respondieron de forma afirmativa. Y las otras 5 personas, indican haber recibido consejos de lavado de manos y de alimentos previos a su preparación, en puestos de salud.

También cabe destacar que ninguno de los puestos de venta, tenía acceso a sanitarios en al menos 100 mt de radio, además solo 10 puestos provenientes del mercado central, contaban con un lavamanos que se presume utilizaba agua potable. Sin embargo, los demás puestos utilizaban agua que se encontraba empacada en bolsas plásticas para el lavado del producto ofrecido.

Por lo que podemos afirmar que, aunque no haya una capacitación formal en cuanto al tema de buenas prácticas de higiene, los dueños utilizan técnicas de limpieza, que a pesar de no ser las óptimas, influyeron en el resultado negativo de la prevalencia de *Campylobacter sp.* en las muestras analizadas.

El hecho que no haya presencia de *Campylobacter sp.* no es indicativo de la ausencia de coliformes que también son una fuente de contaminación, por lo que se infiere que la presencia de dichos microorganismos pudo desarrollarse mejor en las muestras analizadas, no dejando suficientes recursos a las bacterias de *Campylobacter* para poder crecer de forma oportunista. Por lo que se considera apropiado realizar el respectivo análisis, para poder establecer una relación cuatificable de coexistencia entre dichos microorganismos.

Finalmente se hace mención que, por motivos del funcionamiento de un medio o error humano, no se pudo llevar a acabo la sección de correlación *entre E. coli y Campylobacter sp.* por lo que el objetivo que establecía comprobar la correlación no fue posible medirla.

## IX. CONCLUSIONES

1. La prevalencia de *Campylobacter sp.* en las muestras analizadas fue menor al 1%.
2. A pesar de que las condiciones de salud en los mercados de Guatemala, son básicas las medidas adoptadas por los dueños de los puestos, son suficientes para evitar el desarrollo de *Campylobacter sp.* en el tipo de muestras analizadas.
3. Se acepta la hipótesis nula que hace mención a que no existe prevalencia de *Campylobacter sp.* en las muestras analizadas.
4. No se puede afirmar y tampoco descartar la hipótesis planteada que hace referencia a la relación *E. coli* y *Campylobacter sp.* debido al error humano con la manipulación de medios para dicha prueba.

## X. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda, utilizar un radio de muestreo de mercados más amplio, y por lo tanto mayor cantidad de muestras a analizar para establecer una estadística más representativa.
2. Se recomienda hacer uso de la correlación entre la presencia de *E.coli* y prevalencia de *Campylobacter sp.* para tener un panorama más claro y acertado en cuanto a los resultados encontrados en el análisis, y poder determinar otras fuentes de contaminación en las muestras analizadas.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Aldana, A. 2017. *Análisis de la situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por agua y alimentos en Guatemala*. 2016. Extraído de:  
<http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/Publicaciones%202017/ETAS/AN%C3%81LISIS%20DE%20LA%20SITUACI%C3%93N%20EPIDEMIOLOGICA%20DE%20LAS%20ETAS%202016.pdf>. consultado el 29/07/2018.
2. Allos, B. M. (1997). Association between *Campylobacter* infection and Guillain-Barré syndrome. *Journal of Infectious Diseases*, 176(Supplement\_2), S125-S128.
3. Altekruze, S. F., Stern, N. J., Fields, P. I., & Swerdlow, D. L. (1999). *Campylobacter jejuni*—an emerging foodborne pathogen. *Emerging infectious diseases*, 5(1), 28,
4. Alvarez Privado, C. S. (2007). *Determinación de actividad contra Campylobacter jejuni por extractos etanolicos de cinco palntas utilizadas popularmente para el tratamiento de afecciones gastrointestinales en regiones cálidas de Guatemala* (Vol. 06 ). Guatemala: usac.
5. Angulo FJ, Baker NL, Olsen SJ, Anderson A, Barrett TJ. (2004). Antimicrobial Use in Agriculture: Controlling the Transfer of Antimicrobial Resistance to Humans. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*. 15(2):78-85.
6. Anna Roccato, M. M. (2018). *Usefulness of indicator bacteria as potencial marker of campylobacter contamination in broiler carcasses* (Vols. 276 (63-70)). *journal of food microbiology*.
7. Blaser, M. J. (1997). Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *Journal of Infectious Diseases*, 176(Supplement\_2), S103-S105.
8. Bolton FJ, Coates D, Hutchinson DN. 1984. *The ability of Campylobacter supplements to neutralize photochemically induced toxicity and hydrogen peroxide*. *Journal of Applied Bacteriology*. 56:151-157.
9. Bolton FJ, Robertson L. 1982. *A selective medium for isolating Campylobacter jejuni/coli*. *Journal of Clinical Pathology*. 35:462–467.
10. Camas MA. Aislamiento e identificación de *Campylobacter spp.* en muestras de heces referidas al Laboratorio Nacional de salud, provenientes del área de salud del departamento de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, facultad de Ciencias químicas y farmacia) 2006. 59pp.
11. Cardinale, E., Gros-Claude, P., David, J., Tall, F., Cisse, M., Guèye, E. H. F., & Salvat, G. (2003). Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken carcasses in Senegal. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 56(1-2), 13-16.
12. Coker, A. O., Isokpehi, R. D., Thomas, B. N., Amisu, K. O., & Obi, C. L. (2002). Human *Campylobacteriosis* in developing countries 1. *Emerging infectious diseases*, 8(3), 237.
13. Donnison A. 2003. *Isolation of Thermotolerant Campylobacter- Review & Methods for New Zealand Laboratories*. Prepared for the Ministry of Health. Pg. 2-4.
14. FDA. 2019. *Reacción en tiempo real en cadena de polimerasa (PCR) para análisis de campylobacter jejuni/coli/lari*.

15. Food and Drug Administration. Bad Bug Book—Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. 2012. *Campylobacter jejuni*, 14-17
16. Friedman, C. R., Hoekstra, R. M., Samuel, M., Marcus, R., Bender, J., Shiferaw, B., ... & Carter, M. (2004). Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: a case-control study in FoodNet sites. *Clinical infectious diseases*, 38(Supplement\_3), S285-S296.
17. Georgsson, F., Þorkelsson, Á. E., Geirsdóttir, M., Reiersen, J., & Stern, N. J. (2006). The influence of freezing and duration of storage on *Campylobacter* and indicator bacteria in broiler carcasses. *Food microbiology*, 23(7), 677-683.
18. Gibreel A, and Taylor D. 2006. *Macrolide resistance in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 58:243-255.
19. Habib, I., Berkvens, D., De Zutter, L., Dierick, K., Van Huffel, X., Speybroeck, N., ... & Uyttendaele, M. (2012). *Campylobacter* contamination in broiler carcasses and correlation with slaughterhouses operational hygiene inspection. *Food microbiology*, 29(1), 105-112.  
infection. *Journal of Applied Microbiology*. 90:45S-56S.
20. Katzav M, Isohanni P, Lund M, Hakkinen M, Lyhs U. 2008. *PCR assay for the detection of Campylobacter in marinated and non-marinated poultry products*. *Food Microbiology*. 25:908–914.
21. Kawasaki S, Fratamico PM, Horikoshi N, Okada Y, Takeshita K, Sameshima T, Kawamoto S. 2009. Evaluation of a Multiplex PCR System for Simultaneous 136 Detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in Foods and in Food Subjected to Freezing. *Foodborne Pathogens and Disease* 6:81-89.
22. Line JE, Garrish JK, Glassmoyer P and Kirsten E. 2002. *Selective media for recovery and numeration of campylobacters*. Disponible en <http://www.patentstorm.us/patents/6368847.html> Accesado el 10 dic 2010.
23. Medeiros, D. T., Sattar, S. A., Farber, J. M., & Carrillo, C. D. (2008). Occurrence of *Campylobacter* spp. in raw and ready-to-eat foods and in a Canadian food service operation. *Journal of food protection*, 71(10), 2087-2093.
24. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2009. *In Medical Microbiology.USA: Mosby Elsevier*.
25. Perales, M., Camiña, M., & Quiñones, C. (2002). Infección por *Campylobacter* y *Shigella* como causa de Diarrea Aguda Infecciosa en niños menores de dos años en el Distrito de la Victoria, Lima-Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 19(4), 186-192.
26. Pitkänen, T., Bräcker, J., Miettinen, I. T., Heitto, A., Pesola, J., & Hakalehto, E. (2009). Enhanced enrichment and detection of thermotolerant *Campylobacter* species from water

- using the Portable Microbe Enrichment Unit and real-time PCR. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(7), 849-858.
27. Pumarola A, *et al.* *Microbiología y parasitología médica*. 2Ed España: Editorial Masson S.A. 1987. 466p.
  28. Quiñones-Ramírez EI, Vázquez-Salinas C, Rodas-Suárez OR, Ramos-Flores MO, Rodríguez-Montaño R. *Frequency of isolation of Campylobacter from roasted chicken samples from Mexico City*. *Journal of Food Protection*. 2000. 63:117-99.
  29. Sampers, I., Habib, I., De Zutter, L., Dumoulin, A., & Uyttendaele, M. (2010). Survival of *Campylobacter* spp. in poultry meat preparations subjected to freezing, refrigeration, minor salt concentration, and heat treatment. *International journal of food microbiology*, 137(2-3), 147-153.
  30. Shimada K, and Tsuji H. 1986. *Enrichment for detection of Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*. 23:887-890
  31. Soto, L. (2011). *Prevalencia y susceptibilidad a antimicrobianos de c. jejuni y c.coli aislados de alimentos mediante el desarrollo de un método rápido*. Nuevo León, México: Universidad Autónoma de Nuevo León .
  32. Tran TT. 1995. *Evaluation of Oxyrase enrichment method for isolation of Campylobacter jejuni from inoculated foods*. *Letters in Applied Microbiology*. 21:345-347.
  33. U.S. Food and Drug Administration. 2009. Isolation of *Campylobacter* Species from Food and Water. Extraído de:  
<https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm072616.htm>.  
Consultado el : 5/11/2018.
  34. Van Vliet AHM and JM Ketley. 2001. *Pathogenesis of enteric Campylobacter*.
  35. Wallace RB. 1997. *Campylobacter*. In: *Foodborne microorganisms of public health significance*, 5th Edition. Eds., Hocking, A.D., Arnold, G., Jenson, I., Newton, K. & Sutherland P. AIFST (NSW Branch) Food Microbiology Group, CSIRO Food Science & Technology, Trenear Printing Service Pty. Ltd, Tempe, NSW, Australia, Pp 267-284.

## XII. ANEXOS

Figura 1: Distribución de mercados muestreados, en la ciudad capital de Guatemala.



Figura 2. Esquema general de los procedimientos realizados para el trabajo de campo.



Cuadro 3: Correlativos de la primera lectura de muestras. Mercados Central y La Terminal

<b>Central</b>		<b>La Terminal</b>	
Local No. 32	321	Local No. 57	421
Local No. 09	322	Local No. 10	422
Local No. 07	323	Local No. 4	423
Local No. 5	324	Local No. 13	424
Local No. 50	325	Local No. 54	425
Local No. 46	326	Local No. 53	426
Local No. 47	327	Local No. 115	427
Local No. 12	328	Local No. 117	428
Comedor Tecpaneca	329	Comedor Marina	429
Comedor Flory	330	Comedor Lorena	430
Comedor Nohemy	331	Comedor Sarita	431
Comedor La nueva Esperanza	332	Comedor la Ceiba	432
Comedor Lucky	333	Comedor Velásquez	433
Comedor Dina	334	Comedor Julia	434
Local no. 25	335	Local No. 24	435

Cuadro 4: Correlativos de la segunda lectura de muestras. Mercados La Placita y El Guarda

<b>La Placita</b>		<b>El Guarda</b>	
Comedor Emmanuel	521	Local No. 121	621
Local No. 08	522	Local No. 11	622
Local No. 06	523	Local No. 25	623
Local No. 20	524	Local No. 13	624
Local No. 554	525	Local No. 54	625
Local No. 17	526	Local No. 14	626
Comedor Josselyn	527	Local No. 132	627
Local No. 12	528	Local No. 117	628
Comedor Shalom	529	Comedor Felicia	629
Comedor Esperanza	530	Comedor Don Daniel	630
Comedor Berlín	531		
Comedor doña Elena	532		
Comedor Tomasa	533		
Local No. 35	534		
Comedor doña Tonda	535		
Local No. 37	536		
Comedor don Rodrigo	537		
Comedor Arzabal	538		
Comedor Don Martín	539		
Local 72	540		

Cuadro 5: Correlativos de la tercera lectura de muestras. Mercados Central y Colón

<b>Central</b>		<b>Central de Mayoreo Cenma</b>	
Local No. 31	721	Local No. 30	821
Local No. 08	722	Local No. 10	822
Local No. 075	723	Local No. 3	823
Local No. 60	724	Local No. 23	824
Local No. 50	725	Local No. 63	825
Local No. 44	726	Local No. 54	826
Local No. 47	727	Local No. 135	827
Local No. 14	728	Local No. 127	828
Comedor Fermín	729	Comedor Morenita	829
Comedor marta	730	Comedor Claudia	830
Comedor doña Eulalia	731	Comedor Corina	831
Comedor Madrid	732	Comedor don Rafael	832
Comedor susan	733	Comedor carla	833
Comedor Leonor	734	Comedor doña maría José	834
Comedor Julianita	735	Comedor Don Alfonso	835

Cuadro 6: Codificación y secuencia de las muestras que se analizaron haciendo uso del programa de biología molecular para computadora, para las muestras provenientes de los Mercados Central – Terminal

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>A</b>	423	427	422	333
<b>B</b>	331	426	322	326
<b>C</b>	328	430	435	323
<b>D</b>	324	325	335	327
<b>E</b>	424	321	421	330
<b>F</b>	434	425	429	334
<b>G</b>	329	432	431	Control positivo 1
<b>H</b>	332	433	428	Control positivo 2

Cuadro 7: Codificación y secuencia de las muestras que se analizaron haciendo uso del programa de biología molecular para computadora, para las muestras provenientes de los Mercados Placita – Guarda

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>A</b>	523	529	536	623
<b>B</b>	522	531	540	626
<b>C</b>	521	530	537	630
<b>D</b>	524	533	621	624
<b>E</b>	525	532	629	627
<b>F</b>	526	535	628	538
<b>G</b>	528	534	622	-
<b>H</b>	527	539	625	-

Cuadro 8: Codificación y secuencia de las muestras que se analizaron haciendo uso del programa de biología molecular para computadora, para las muestras provenientes de los Mercados Central – Central de mayoreo CENMA

	1	2	3	4	5
<b>A</b>	835	731	825	727	Control positivo frasco 2
<b>B</b>	830	829	735	721	Control Positivo frasco 2
<b>C</b>	838	822	824	728	
<b>D</b>	831	725	732	727	
<b>E</b>	832	828	733	724	
<b>F</b>	827	826	734	723	
<b>G</b>	833	821	726	Control positivo frasco 1	
<b>H</b>	730	823	729	Control positivo frasco1	

Anexo 1: Formato de entrevista sobre buenas prácticas de higiene.

Formulario No.1

¿Alguna vez recibió capacitación sobre buenas prácticas de manipulación de alimentos?

- a. SÍ
- b. NO

Si su respuesta fue sí ¿dónde o quién le dio dicha información?

-----  
-----  
-----

\*La información presente será utilizada sin fines de lucro y con propósitos estrictamente académicos.

Anexo 2: Metodología utilizada para el análisis de muestras.

**Análisis para detección de *Campylobacter sp.***

**a. Preparación de la muestra.**

- i. Pesar 50 gramos de la muestra.
- ii. Colocar la muestra en una bolsa para digestión.
- iii. Agregar 50g de muestra 100 ml de caldo Bolton previamente enriquecido con el suplemento antibiótico reconstituido con 50%-50% de alcohol y agua y sangre lisada de caballo.
- iv. Colocar en stomacher por 2 minutos.

(FDA, 2009).

**b. Enriquecimiento**

- i. Incubar las muestras a 37 C. por 4 horas
- ii. Incubar a 42°C. por 48 horas

(FDA, 2009).

**c. Incubación**

- i. Para mantener estado de anaerobiosis usar 1 sobres de bbl campy pack

(Usar 1 sobre por cada frasco en donde se almacenen las muestras ).

(FDA, 2009).

**d. Detección**

- ii. Para el posterior análisis mediante la técnica de PCR, se siguió la siguiente metodología:
- iii. Se retiraron las muestras de la incubadora y se separaron los tubos clúster que se van a utilizar (en la primera extracción se utilizaron 30 muestras y en la segunda 60, sumando un total de 90 muestras).
- iv. Se hizo un cuadro como se observa en los cuadros 6,7 y 8 para poder distinguir de donde proviene la muestra (los correlativos se pueden encontrar en los cuadros 3,4 y 5).
- v. En los tubos clúster se colocó 200 ul de la mezcla de 150 ul de proteasa con 12 ml de reactivo de lisis.
- vi. Posteriormente se colocaron en cada tubo 5 ul de cada muestra.
- vii. Luego la bandeja que contenía los tubos se colocaron en cubos térmicos en la siguiente secuencia: 20 minutos a 37 centígrados, 10 minutos a 95 centígrados y 5 minutos en un bloque previamente congelado.

- viii. Posteriormente se los tubos se refrigeraron para su posterior análisis.
- ix. Para dicho proceso, se hidrataron las tabletas de PCR con 30 ul del contenido de los tubos clúster, para colocarlos en la cicladora por 1 hora y que el programa pudiera dar los respectivos resultados.
  - La metodología detallada se puede encontrar en el anexo 3 del presente documento.

Figura 3. Diagrama de flujo de metodología específica de experimentación



Anexo 3: Procedimiento de Biología molecular detallado



## BAX® System Real-Time PCR Assay

### Campylobacter jejuni/coliformi Part KIT2018 (D12683449)

#### KIT CONTENTS

- 96 PCR tubes with tablets (1 bag of 12 x 8 strips)
- 96 flat optical caps (12 x 8 strips)
- 1 bottle of protease (400 µL)
- 2 bottles of lysis buffer (12 mL)



#### INTENDED USE

Food processors and associated laboratories can use the BAX® System as a quick and reliable method for detecting *Campylobacter* in a variety of foods. This real-time PCR assay was designed to report yes/no results along with quantitative values\* for three species, *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari* at concentrations as low as 10<sup>4</sup> cfu/mL, with or without enrichment. With a processing time of approximately 70 minutes in the BAX® System Q7 instrument, the method returns results comparable to culture methods, but with a significantly faster time to result.

BAX® Systems are designed for use by qualified lab personnel who follow standard microbiology laboratory practices, including the safe handling and disposal of potentially pathogenic materials.

\*AOAC-RT has granted P/TM certification to this assay only for qualitative results on enriched samples.

**Field of use:** Data obtained from the BAX® System should not be used for human diagnostic or human treatment purposes. Equipment is not approved by the United States Food and Drug Administration or any other U.S. or non-U.S. regulatory agency for use in human diagnostics or treatment. The BAX® System should not be used as the sole basis for assessing the safety of products for release to consumers. The information generated is only to be used in conjunction with the user's regular quality assurance program. Not approved for clinical diagnosis. Use for research and development, quality assurance and quality control under supervision of technically qualified persons.

#### PRINCIPLE OF THE METHOD

See the BAX® System User Guide for an overview of how the BAX® System method uses automated, real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) technology.

BAX® System Q7 instruments are sold under licensing arrangement with Applied Biosystems for food testing. Use for research and development, quality assurance and liability before use. INS2015 REV04

#### MATERIALS

BAX® System Real-Time PCR Assay for *Campylobacter jejuni/coliformi* (Part KIT2018 [D12683449])  
BAX® System start-up package (equipment and supplies for up to 192 tests)

- BAX® System Q7 cycle/detector and computer workstation
- Heating blocks with inserts\* capable of maintaining 37±2°C and 95±3°C
- Cooling blocks with inserts\*
- PCR tube holder
- Capping/decapping tools
- Adjustable mechanical pipettes (5-50 µL; 20-200 µL)
- Repeating pipette
- Multi-channel pipette (8 channels – 5-50 µL)
- \*Cluster tubes with caps and racks
- \*Pipette tips with barriers\*\*
- \*Powder-free nitrile gloves
- \*The Automated Thermal Block (Catalog No. MCH2023 [D14614222]) can be used in place of heating and cooling blocks.

\*\*Filter tips recommended.

Stomacher with bags

Incubator capable of maintaining directed enrichment temperatures within ±2°C

Apparatus for microaerobic gassing (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>)  
Enrichment media (See BAX® System User Guide for details)

#### STORAGE AND SHELF LIFE

- Reagent packages should be kept refrigerated at 2-8°C. Do not freeze.
- Reagents should be used by the expiration date stamped on the individual labels.
- After protease has been added to the lysis buffer, shelf life of the solution is 2 weeks when stored at 2-8°C.

#### PRECAUTIONS

The BAX® System method includes sample enrichment procedures that nourish the growth of potential pathogens to detectable levels. Because pathogens can cause human illness, appropriate safety precautions must be taken when handling samples, media, reagents, glassware and other supplies and equipment that could be contaminated with potentially pathogenic bacteria.

Reagents used with the BAX® System assays should pose no hazards when used as directed. Before using this

product, please review the Safety Data Sheets (SDS) included with your BAX® System purchase and also available at [www.hygena.com](http://www.hygena.com). Refer to your site practices for safe handling of materials at extreme temperatures.

#### SOFTWARE REQUIREMENTS

Before using this assay for the first time, install the most current version of the BAX® System software, then run a calibration report to check that "Real Time *Campylobacter*" appears in the list of calibration files. See "Troubleshooting Calibration" in the BAX® System User Guide for details.

If the report list does not contain "Real Time *Campylobacter*", you must recalibrate the Q7 instrument to load the required dyes. Be sure to allow enough time to complete the calibration (about 1.5 to 2 hours) before starting the assay. For instructions and tips on calibrating the instrument, see the BAX® System User Guide.

#### ENRICHMENT PROTOCOL

1. **Prepare Enrichment Broth**  
Prepare enrichment broth according to the manufacturer's instructions. See the BAX® System User Guide for common enrichment media recipes.

#### 2. Collect and Enrich Samples

##### Method Approved by AOAC

- **Poultry carcass rinses:** Homogenize sample 1:1 with pre-warmed (42°C) double strength Bolton broth with supplement (no blood). Volume prepared should be sufficient to allow < 2.5 mm headspace from the top of air-tight tube or other air-tight container. Incubate at 42°C for 24-48 hours.
- **Processed turkey:** Homogenize 25 g sample with 225 mL pre-warmed (42°C) single strength Bolton broth with supplement (no blood). Incubate under microaerobic\* conditions at 42°C for 24-48 hours.

\*Note: *Campylobacter* are microaerophilic and therefore susceptible to environmental stresses, such as exposure to air, drying, low pH and prolonged storage. Sample preparation usually requires a gassing step (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>) and incubation in a microaerobic atmosphere.

#### DIRECT (NON-ENRICHED) PROTOCOL

Some sample types, such as chicken carcass rinses, are expected to have high concentrations of *Campylobacter*. When low-level detection is not a concern, the enrichment step can be omitted.

**Method Approved by NordVal**  
• **Cloacae Swabs (>100 cfu/mL):** After collection of cloacae swab, place swab into vial containing 2 mL of 0.9% sodium chloride and 0.1% peptone. Proceed to BAX® lysis procedure.

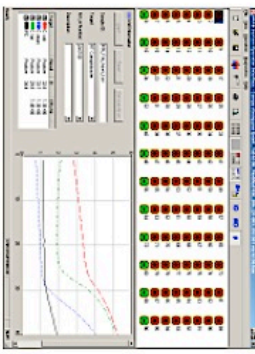
#### TEST PROTOCOL





3. **Prepare Equipment**
  - 3.1 Turn on the heating blocks to 37°C and 95°C\*.
  - 3.2 Make sure cooling blocks are chilled at 2-8°C\*.  
\*If using the Automated Thermal Block, follow the instructions in the Thermal Block User Guide for running the Gram Negative program.
- 3.3 Power on the Q7 instrument and launch the BAX® System application.
- 3.4 Create a rack file (see User Guide for details).
4. **Perform Lysis**
  - 4.1 Break cluster tubes apart.
  - 4.2 Label and arrange cluster tubes in rack according to the rack file.
  - 4.3 Prepare lysis reagent by adding 150 µL protease to one 12 mL bottle of lysis buffer.
  - 4.4 Transfer 200 µL lysis reagent to each cluster tube.
  - 4.5 Transfer 5 µL enriched sample to the corresponding cluster tube.
  - 4.6 Heat at 37°C for 20 minutes.
  - 4.7 Heat at 95°C for 10 minutes.
  - 4.8 Cool at 2-8°C for at least 5 minutes.
5. **Hydrate PCR Tablets**
  - 5.1 Initialize the instrument by selecting RUN FULL PROCESS from the OPERATION menu.
  - 5.2 Place a PCR tube rack onto a chilled (2-8°C) PCR cooling block.
  - 5.3 Arrange strips of PCR tubes according to your rack file.
  - 5.4 Remove the caps from the first strip of tubes with the decapping tool.
  - 5.5 Transfer 30 µL lysate (from step 4.8) into PCR tubes, then seal with flat optical caps.
  - 5.6 Repeat with remaining strips of PCR tubes until all PCR tablets have been hydrated.
6. **Amplify and Detect**
  - 6.1 At the "Ready for Rack Load" prompt, click the NEXT button and open the instrument drawer.
  - 6.2 Place the rack of PCR tubes over the wells in the drawer, and check that the tubes are seated correctly.
  - 6.3 Close the drawer, and click the NEXT button to begin automated processing.

BAX® System Q7 instruments are sold under licensing arrangement with Applied Biosystems for food testing. Use for research and development, quality assurance and quality control testing under supervision of technically qualified persons. Not approved for clinical use. Please read the limitation of Effective Date 26Mar2019

## 7. Review Results





Qualitative results are displayed as a grid of color-coded icons in the top half of the screen:



-  Green (-) = Negative for target organism
-  Red (+) = Positive for target organism
-  Yellow (?) = Indeterminate result\*
-  Yellow (?) with red slash = Signal error\*

\*Refer to the troubleshooting section in the User Guide for assistance.

Quantitative results are displayed in the bottom half of the screen when you click on a well:

Target	Result	CFU/ml
 C. coli	Positive	32.8 1.3E+06
 C. jejuni	Positive	33.7 1.3E+06
 C. ltri	Positive	29.8 1.4E+06
 IPC	Positive	34.4

- For each differentiated target, positive/negative results are reported, along with the cycle number at which the fluorescent signal reached the detection threshold (C<sub>t</sub>).
- The last column provides a value for the cell concentration that was present in the sample going into lysis. For non-enriched samples, this value is a good measure of raw contamination levels; otherwise, this value reflects the concentration level after enrichment.

### CONFIRMATION

#### Method Approved by AOAC

If desired, BAX@ System results can be confirmed from the reference culture method appropriate for the sample type, such as:

- U.S. FDA Bacteriological Analytical Manual (BAM)

- USDA FSIS Microbiology Laboratory Guidebook (MLG)
- Health Canada Compendium of Analytical Methods PURPOSE OR THOSE ARISING BY LAW, STATUTE, USAGE OF TRADE OR COURSE OF DEALING. User assumes all risk and liability resulting from use of the BAX@ System Equipment, assays and media, whether used singly or in combination with other products.
- International Organization for Standardization (ISO)

### DISPOSAL

Decontaminate materials and dispose of biohazardous waste per your site practices and as required by federal, state and local regulations.

### VALIDATION

The BAX@ System Real-Time PCR Assay for *Campylobacter jejunicoliformis* has been certified by the AOAC Research Institute as Performance Test Method #040702. This test kit's performance was reviewed by AOAC-RI and was found to perform to the manufacturer's specifications. Validation studies for enriched foods demonstrated BAX@ System sensitivity and specificity equal to or better than the reference culture based methods.

The BAX@ System Real-Time PCR Assay for *Campylobacter jejunicoliformis* has been certified by Nordval International as fulfilling the requirements of the Nordval Validation Protocol (NordVal #039). This test kit's performance was reviewed by Nordval International and was found to perform to the manufacturer's specifications for direct testing of cloacae swabs (above 100 cfu/g). Validation studies for the swabs demonstrated BAX@ System sensitivity and specificity equal the reference culture based methods.

### TECHNICAL ASSISTANCE

For questions or comments, please contact your local distributor. You can also call 800-863-6842 in the U.S., 1-302-695-5300 outside the U.S., or email [diagnostics.support@hygienea.com](mailto:diagnostics.support@hygienea.com).

### LIMITATION OF WARRANTY AND LIABILITY

**NOTICE: READ THIS LIMITATION OF WARRANTY AND LIABILITY BEFORE USING THE BAX@ SYSTEM EQUIPMENT, ASSAYS, AND/OR MEDIA ("BAX@ SYSTEM").** If the terms are not acceptable, notify Hygienea immediately and arrangements will be made for return of the unused Equipment, assays, and/or media to Hygienea and for the refund of the purchase price, less shipping costs. USE OF BAX@ SYSTEM EQUIPMENT, ASSAYS AND/OR MEDIA CONSTITUTES AN ACCEPTANCE OF ALL TERMS AND CONDITIONS OF THIS LIMITATION OF WARRANTY AND LIABILITY. Any additional or different terms in Buyer's purchase form(s) are material alterations and hereby rejected. 1. BAX@ System Equipment should only be used with BAX@ System assays. 2. When used with BAX@ System assays, BAX@ System Equipment is warranted to be free of defects in materials, workmanship and design that may appear under normal and proper use within twelve (12) months from the installation date to the first and last user. BAX@ System assays are warranted to conform to the assay description under the conditions of use specified in the user documentation to the expiration date stamped on the label. BAX@ System media is warranted to meet standard specifications in effect on the date of shipment. HYGIENA MAKES NO OTHER WARRANTY, EITHER EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING:

WITHOUT LIMITATION, ANY WARRANTY AGAINST INFRINGEMENT. ANY WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR OF FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE OR THOSE ARISING BY LAW, STATUTE, USAGE OF TRADE OR COURSE OF DEALING. User assumes all risk and liability resulting from use of the BAX@ System Equipment, assays and media, whether used singly or in combination with other products.

3. BAX@ Software: Hygienea warrants that for a period of 60 days from the date of first date of use by the Customer/end user, BAX@ software media will be free from defect in materials and workmanship and that the BAX@ software will substantially perform in accordance with the accompanying BAX@ Software documentation. EXCEPT FOR THE EXPRESS WARRANTY ABOVE, HYGIENA MAKES NO OTHER WARRANTY, EITHER EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY WARRANTY AGAINST INFRINGEMENT, ANY WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR OF FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE OR THOSE ARISING BY LAW, STATUTE, USAGE OF TRADE, OR COURSE OF DEALING. User assumes all risk and liability resulting from use of the BAX@ software, whether used singly or in combination with other products.

4. The accuracy of the BAX@ System can be affected by factors over which Hygienea has no control, including, without limitation, the use of the Equipment, assays and/or media in a manner that is contrary to the conditions of use, the procedures or the instructions specified by Hygienea. Because of the large number of factors over which Hygienea has no control, Hygienea makes no promise or guarantee of the accuracy of or results obtained from the use of the BAX@ System. In particular, Hygienea disclaims any warranty or liability and assumes no responsibility whatsoever for the failure of the BAX@ System due, in whole or in part, to user's failure to: (a) properly maintain equipment, (b) maintain specified operating or storage conditions, (c) follow the specified instructions, or (d) use the proper microbiological techniques consistent with the standard of care accepted in the industry for the proper collection, storage, handling and preparation of the sample.

5. Externally caused failures, such as improper sample preparation, improper storage or handling of reagents, electrical outages, or out-of-specification environmental conditions are not covered under this warranty. Equipment failures caused by spills, abuse, misuse, negligence, or improper operation are not covered by this warranty. Modifications, service or repairs by parties other than Hygienea-authorized providers are not covered by this warranty and, in fact, void this warranty. Circumstances beyond the reasonable control of Hygienea, including fire, explosions, accidents, flood, labor trouble or shortage, war, act of or authorized by any government, inability to obtain suitable material, equipment, fuel, power or transportation, or acts of God are not covered under this warranty. 6. The BAX@ System is designed to test only for the presence of the target organisms specified in the particular assay. The BAX@ System has been tested against many, but not all, strains of the target within the sample types specified in the user documentation. Hygienea, therefore, cannot and does not make any representation or warranty that the BAX@ System is capable of detecting every organism in the target genus, species or serotype in any sample source.

Accordingly, the BAX@ System should not be used as the sole test for the release of user's products, nor should it be used as the sole basis for determining the safety of user's products. 7. CUSTOMER/USER ASSUMES ALL RISKS IN USING THE BAX@ SYSTEM AND HYGIENA OR ITS AFFILIATES, DISTRIBUTORS, ITS LICENSORS OR REPRESENTATIVES SHALL HAVE NO LIABILITY TO CUSTOMER/USER OR TO ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY INDIRECT, INCIDENTAL, SPECIAL, PUNITIVE, EXEMPLARY OR CONSEQUENTIAL DAMAGES WHATSOEVER, INCLUDING, BUT NOT LIMITED TO, LOSS OF REVENUE OR PROFIT, LOST OR DAMAGED DATA OR OTHER COMMERCIAL OR ECONOMIC LOSS EVEN IF CAUSED BY THE NEGLIGENCE OF HYGIENA OR ITS REPRESENTATIVES AND/OR IF HYGIENA HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES, AND/OR IF THEY ARE FORESEEABLE. 8. THE SOLE AND EXCLUSIVE REMEDY OF CUSTOMER/USER, AND THE SOLE AND EXCLUSIVE LIABILITY OF HYGIENA, ITS AFFILIATES, DISTRIBUTORS, LICENSORS OR REPRESENTATIVES FOR ANY AND ALL CLAIMS, INCLUDING BREACH OF WARRANTY, TORT, CONTRACT, STRICT LIABILITY, NEGLIGENCE OR OTHERWISE SHALL BE LIMITED TO THE

FOLLOWING: (a) Should Equipment fail to conform with the Paragraph 2 warranty, Hygienea shall, at its option: repair or replace the non-conforming Equipment with new or refurbished (repaired or rebuilt) functionally equivalent Equipment or refund the purchase price; (b) Should BAX@ Software fail to conform with the Paragraph 3 warranty, Hygienea will replace it free of charge. For all other claims, Hygienea may, at its option, refund the purchase price or replace the Equipment, assays or media; (d) In all cases, user is responsible for the repackaging and return of non-conforming Equipment, along with the replacement of new or refurbished Equipment; and (e) Equipment, assays or media shall not be returned without prior written permission from Hygienea, a then only in the manner prescribed by Hygienea. The maximum liability of Hygienea, its affiliates, distributors and licensors, and whether or not based on negligence, shall not exceed in the aggregate the amount equal to: (a) the purchase price of the BAX@ System assay or media for which damages are claimed; or (b) in the case of BAX@ Software, the amount paid for the software (licensed separately) or twenty-five thousand dollars (\$25,000.00USD). Customer/user shall notify Hygienea of any claim within thirty (30) days there and shall commence any action against Hygienea within one (1) year of the date of action or otherwise be barred from any remedy. Hygienea shall not be responsible for cost, loss or liability that arise from customer/user's operation of its business, and customer/user agrees to indemnify, defend and hold Hygienea and its representatives harmless from such cost, loss or liability.

### NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE 5' NUCLEASE PROCESS

This product is a Licensed 5' Nuclease Application Kit. Its purchase price includes a limited, non-transferable immunity from suit under U.S. Patents N 5,210,015, 5,487,972, 5,804,375, 5,079,552, and 6,127,155, and corresponding patent claims outside the United States, owned by Roche Molecular System Inc. or F. Hoffmann-La Roche Ltd (Roche), and under U.S. Patents Nos. 5,938,849, 5,723,591, 5,676,930, 6,030,787, and 6,256,569, and corresponding patent claims outside the United States, owned by Applied Biosystems, for 1 only this amount of the product in the practice of the 5' nuclease process for food testing. No right under any other patent claim (such as apparatus or system claims) and no right to use this product for any other purpose, is her granted expressly, by implication or by estoppel. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404 USA.

