



Búsqueda de *Campylobacter* spp. termotolerantes
en pollos parrilleros en la ciudad de Córdoba

Autor: Oscar Javier Jacome

Tesis para optar al título de posgrado:
Magister en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Córdoba, 2020

Director: Dr. Martín G. Theumer (mgttheumer@unc.edu.ar)

Co-directora: Dra. Verónica S. Mary (vmary@unc.edu.ar)

Miembros del tribunal examinador de tesis:

M. Sc. Georgina Oberto. Facultad de Ciencias Médicas. UNC.

M. Sc. Ricardo Toselli. CEQUIMAP. Facultad de Ciencias Químicas. UNC.

M. Sc. Daniela Lombardo. Fac. Cs. Exactas, Físico-Químicas y Naturales, UNRC. (Evaluador externo).

DEDICATORIA

El presente trabajo lo dedico, a mi pequeñin Emi, que todos los días me acompaña y está presente; a Maxi y Manu, mis dos razones que cada día me ayudan a ponerme de pie. Al aguante que me tuvieron en los años de cursado de la Maestría, es por ellos todo el esfuerzo que me llevaron a culminar esta carrera.

A mi compañera Olga, por todo el apoyo, por el empujón a comenzar, transitar y terminar el cursado y desarrollo de la tesis.

A mis padres, por enseñarme a no bajar los brazos y gracias por darme la oportunidad de estudiar lo que me gusta. A mi hermana, por estar presente y alegrarse por mis logros.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por el apoyo incondicional. Sin ellos no hubiese podido realizar esta maestría.

A la Dra. Verónica Mary y Martin Theumer. Gracias por haberme dirigido en la realización de esta tesis.

Al Dr. Martín Theumer por brindarme todo su conocimiento, tenerme paciencia y acompañarme en toda la ejecución de la tesis. Muchas Gracias!

A mi jefa del Laboratorio de Alimentos, Alina Rondini, por brindarme la posibilidad con los horarios para poder cursar la maestría, por todo el apoyo y confianza que me brinda cada día, gracias por darme la posibilidad de realizar la tesis.

Al grupo de “los del fondo”: Ro, Dani Ruth, gracias por siempre tirarme buenas ondas y alentarme a seguir.

A mis compañeros de maestría por hacer los días de cursado más ameno, divertidos, gracias por las charlas, horas de estudio. A mi compañero de banco José, que me daba animo a rendir las materias.

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTAS DE TABLAS	ix
RESUMEN	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
INTRODUCCIÓN	
1.1 Enfermedades transmitidas por alimentos	1
1.2 <i>Campylobacter</i> spp., características generales	2
1.3 Relación de <i>Campylobacter</i> y los alimentos	5
1.3.1 Reservorio	5
1.3.2 Mecanismos de transmisión	5
1.4 Relación de <i>Campylobacter</i> y la salud	6
1.5 Diagnóstico Microbiológico	9
1.6 Legislación Alimentaria	13
2 Hipótesis	15
3 Objetivos	15
3.1 General	15
3.2 Específicos	15
MATERIALES Y MÉTODOS	
4 Materiales y métodos	15
4.1 Microorganismo	17
4.1.1 Preparación de suspensión bacteriana para la contaminación experiemetal	17
4.2 Elaboracion de alimento contaminado artificialmente	17
4.2.1 Contaminación experiemetal	17
4.3 Análisis de contaminación de alimentos comercializados en la ciudad de Córdoba con <i>Campylobacter</i> spp. termotolerantes	17
4.3.1 Alimentos, muestreo, transporte y conservación	18
4.4 Cultivo de <i>Campylobacter</i> spp. termotolerantes según la Metodología oficial: BAM-FDA 2001	18
4.4.1 Preparación de los homogenatos	18
4.4.2 Pre-enriquecimiento	18
4.4.3 Enriquecimiento	18
4.4.4 Diluciones del caldo enriquecido	18
4.4.5 Cultivo	18
4.5 Evaluacion de la eficacia de los medios de cultivos y procedimientos alternativos para la detección de <i>Campylobacter</i> spp.	19
4.5.1 Agar cromogénico CHROMagar®.	19
4.5.2 Método de filtración en membrana	19
RESULTADOS	

5 Resultados	20
<i>DISCUSION Y CONCLUSIONES</i>	
6.1 Discusión	31
6.2 Conclusiones	34
ANEXO	36
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Imagen de microscopia electrónica de *Campylobacter jejuni*. (página 3)

Figura 2: Imagen de tinción de *Campylobacter* spp. con fucsina 0,5%. (página 4)

Figura 3: Características macroscópicas de colonias de *Campylobacter* termotolerantes desarrolladas en agar cromogénico CHROMagar®. (página 10)

Figura 4: Técnica de Filtración con membrana de celulosa para la detección de *Campylobacter* spp. en heces. (página 11)

Figura 5: Flujograma de preparación y siembra de muestras de alimentos y agua. (página 13)

Figura 6: Esquema experimental desarrollado en este trabajo de tesis. (página16)

Figura 7: Características de las colonias del *Campylobacter jejuni* utilizado para la contaminación experimental de carne de ave, a las 48 horas de cultivo en agar suplementado con 5% de sangre de carnero. (página 20)

Figura 8: Coloración con fucsina (Aumento 1000X). (página 21)

Figura 9: Reacciones bioquímicas del microorganismo usado para la contaminación experimental de la carne de ave. (página 21)

Figura 10: Siembra de diluciones decimales del caldo enriquecido de alimento contaminado experimentalmente con *Campylobacter jejuni*. (página 22)

Figura 11: Desarrollo de *Campylobacter* termotolerantes en agar selectivo libre de sangre suplementado con antibióticos. (página 23)

Figura 12: Desarrollo de *Campylobacter* termotolerantes en agar cromogénico. (página 24)

Figura 13: Desarrollo de *Campylobacter* termotolerante en agar Brucella con 5% de sangre de carnero. (página 24)

Figura 14: Mapa geo-referenciado de los establecimientos de expendio de las muestras de pollo. (página 27)

Figura 15: Técnica de filtración empleando membrana de filtro de 0,45 µm. (página 27)

Figura 16: Prevalencia de *Campylobacter* spp en muestra de pollo. (página 28)

Figura 17: Análisis en el periodo de seis meses de búsqueda de *Campylobacter* spp en alimentos derivados (página 29)

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de *Campylobacter* spp. (página 2)

Tabla 2: Principales especies de *Campylobacter* encontradas en asociación con procesos infecciosos del ser humano. (página 7)

Tabla 3: Frecuencia de aislamiento de *C. jejuni* en materias fecales diarreicas de niños en países de América del Sur. (página 9)

Tabla 4: Características fenotípicas de colonias de especies termotolerantes de *Campylobacter* en el medio cromogénico. (página 10)

Tabla 5: Sensibilidades del medio de cultivo especificado en el método BAM-FDA 2001 y de los métodos de cultivo alternativos. (página 25)

Tabla 6: Composición de los medios de cultivos evaluados en este trabajo de tesis. (página 26)

RESUMEN

Las especies de *Campylobacter* están ampliamente distribuidas en la mayoría de animales de sangre caliente, fundamentalmente en aves destinadas al consumo humano. Algunas producen gastroenteritis en humanos, siendo la

transmisión alimentaria una de las formas más comunes de infección. Sin embargo, no hay datos que reflejen la contaminación por *Campylobacter* spp. en alimentos a base de carne de aves comercializados en la ciudad de Córdoba.

En este trabajo se evaluó comparativamente la eficacia del medio de cultivo propuesto por la técnica oficial (BAM-FDA 2001), un medio cromogénico, y el método de filtración por membrana y cultivo en agar Brucella sin sangre, para aislar *Campylobacter* spp. termotolerantes a partir de homogenatos de alimentos contaminados experimentalmente con *C. jejuni*, y enriquecidos de acuerdo a la metodología oficial. Posteriormente, se analizó la prevalencia de *Campylobacter* spp. termotolerantes en pollos parrilleros y alimentos derivados comercializados en la ciudad de Córdoba.

La técnica de filtración por membrana presentó la mayor sensibilidad para detectar la contaminación experimental, por lo que fue utilizada para el estudio de los alimentos comerciales. Las prevalencias de *Campylobacter* spp. termotolerantes fueron de 69,2% (18/26) en pollos parrilleros y de 80% (4/5) en menudencias. En alimentos derivados, las prevalencias fueron de 5,7% (3/ 53) en milanesas y 16,7% (1/6) en hamburguesas, mientras que no se detectaron en arrollados de pollo.

Los resultados de este trabajo muestran que la sensibilidad del método oficial para la detección de *Campylobacter* spp. termotolerantes puede ser mejorada mediante métodos alternativos de cultivo del caldo enriquecido, y sugieren que la inclusión de criterios microbiológicos sobre estos microorganismos en la legislación, tendría un impacto muy favorable para mejorar la seguridad alimentaria.

Palabras clave:

Campylobacter spp., medio de cultivo, pollo parrillero, ciudad de Córdoba, prevalencia.

ABSTRACT

Campylobacter species are widely distributed in most warm-blooded animals, mainly in birds intended for human consumption. Some cause gastroenteritis in

humans, with food transmission being one of the most common forms of infection. However, there are no data reflecting contamination by *Campylobacter spp.* in food based on poultry meat commercialized in the city of Córdoba.

In this work, the efficacy of the culture medium proposed by the official technique (BAM-FDA 2001), a chromogenic medium, and the membrane filtration method, to isolate *Campylobacter spp.* thermotolerant from homogenates of food contaminated experimentally with *C. jejuni*, and enriched according to the official methodology. Subsequently, the prevalence of *Campylobacter spp.* thermotolerant in broiler chickens and derived foods marketed in the city of Córdoba.

The membrane filtration technique presented the highest sensitivity to detect experimental contamination, therefore, it was used for the study of commercial foods. The prevalences of *Campylobacter spp.* thermotolerant were 69.2% (18/26) in broilers chickens and 80% (4/5) in chickens giblets. In derived foods, the prevalences were 5.7% (3/53) in breaded meat and 16.7% (1/6) in hamburgers, while they were not detected in chicken wraps.

The results of this work show that the sensitivity of the official method for the detection of *Campylobacter spp.* thermotolerant can be improved by alternative methods of growing the enriched broth, and suggest that the inclusion of microbiological criteria on these microorganisms in the legislation would have a very favorable impact to improve food safety.

Keywords:

Campylobacter spp., culture medium, broiler chickens, city of Córdoba, prevalence.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

BAM: Bacteriological Analytical Manual

CAA: Código Alimentario Argentino

CCDA: Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar

CDC: Center Disease Control

ETA: enfermedad transmitida por alimentos

FAO: Food and Agriculture Organization

FDA: Food and Drug Administration

HACCP: Hazard Analysis and Critical Control Points

OMS: Organización Mundial para la Salud

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)

Son producidas por el consumo de aguas o alimentos contaminados con microorganismos o parásitos, o bien por las sustancias tóxicas que aquellos producen (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica [ANMAT], s.f) (Center Disease Control [CDC], s.f.). Constituyen un problema importante de salud a nivel mundial (Organización Mundial de la Salud - Enfermedades de transmisión alimentaria.).

Reportes desde la Organización Mundial de la Salud (OMS) estiman que la región de las Américas tiene la segunda carga más baja de enfermedades de transmisión alimentaria a nivel mundial. Sin embargo, 77 millones de personas todavía se enferman anualmente al consumir alimentos contaminados, causando alrededor de 9.000 muertes al año. De los que se enferman, 31 millones son menores de 5 años, causando más de 2.000 decesos anuales en este grupo etario (OMS, 2015).

Por otro lado, el CDC (siglas en inglés de: *Centers for Disease Control and Prevention*) estima que todos los años aproximadamente 48 millones de personas se enferman por una afección transmitida por los alimentos, 128.000 son hospitalizados y 3.000 mueren (ANMAT - Enfermedades Transmitidas por Alimentos).

De acuerdo a lo publicado por ANMAT, se sugiere que la preparación y manipulación de los alimentos son puntos críticos en el desarrollo de las ETA; según las estadísticas elaboradas por el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmitidas por Alimentos aproximadamente el 40% de los brotes de ETA reportados en la Argentina ocurren en el hogar (Ministerio de Salud - Manual de Manipulación de Alimentos - Provincia de Buenos Aires).

Las ETA pueden deberse a intoxicaciones o infecciones: en el caso de las enfermedades producidas por infecciones se debe a la ingestión de alimentos que contienen microorganismos vivos perjudiciales para la salud, como virus, bacterias y parásitos, por ej.: *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., virus de la hepatitis A, *Trichinella spirallis*, entre otros. En cambio, la intoxicación causada por alimentos se produce por la ingestión de toxinas o venenos que se encuentran presentes en el alimento ingerido, y que se han sido producidos por hongos o bacterias, entre otros; aunque éstos ya no se hallen en el alimento (ej.: toxina botulínica, enterotoxina de *Staphylococcus aureus*).

Para que ocurra una ETA, el patógeno y/o su/s toxina/s deben estar presentes en el alimento. Sin embargo, la sola presencia del patógeno no significa que la enfermedad ocurrirá. En la mayoría de los casos el patógeno debe estar presente en cantidad suficiente como para causar una infección (dosis infectiva) o para producir toxinas. Por su parte, el alimento debe tener características favorables para permitir el crecimiento de los patógenos, y/o debe permanecer en la zona de peligro de temperatura durante tiempo suficiente como para que el organismo patógeno se multiplique y eventualmente produzca toxinas (Enfermedades transmitidas por alimentos [ETA] - Inocuidad de Alimentos - Control Sanitario - HACCP, s.f.).

Los microorganismos peligrosos pueden llegar a los alimentos en cualquier momento, desde que son producidos en el campo hasta que son servidos. Cuando sobreviven y se multiplican pueden causar enfermedades en los consumidores. La contaminación es difícil de detectar, ya que generalmente no se altera el sabor, el color o el aspecto del producto alimenticio (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura - Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico, s.f.).

1.2 *Campylobacter* spp., características generales

Según la décima edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, *Campylobacter* spp. se clasifica de la siguiente manera (Bergey):

Tabla 1. Clasificación de *Campylobacter* spp.

Reino	Bacteria
Filo	Protobacteria
Clase	Epsilonbacteria
Orden	Campylobacterales
Familia	Campylobacteraceae

Actualmente se reconocen 25 especies de *Campylobacter*, incluidas *C. fetus* (especie y tipo), *C. hyointestinalis*, *C. lanienae*, *C. sputorum*, *C.*

mucosalis, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. rectus*, *C. gracilis*, *C. showae*, *C. hominis*, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. insulaenigrae*, *C. canadensis*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus* (Habib, De Zutter, & Uyttendaele, 2019), sumándose *C. avium* (Rossi , Hänninen , Revez , Hannula , & Zanoni, 2008) y *C. cuniculorum* (Zanoni, Debruyne, Rossi, Revez, & Vandamme, 2009); como así también *C. ureolyticus*, debido a su reclasificación en el 2011 (Kaur, y otros, 2011).

El género *Campylobacter* proviene del griego: *kampulos*: curvo; *bacter*: bacteria, está constituido por especies de naturaleza zoonótica y de distribución ecológica diversa. Son capaces de colonizar al hombre y a los animales y su morfología microscópica conserva las características generales de los miembros de la familia (Crushell, Harty, Sharif, & Bourke, 2004).

Morfológicamente son bacilos Gram negativos curvos, en forma de S itálica o espiralados. Miden de 0,2 a 0,9 μm de espesor por 0,5 a 5 μm de longitud (Figuras 1 y 2).

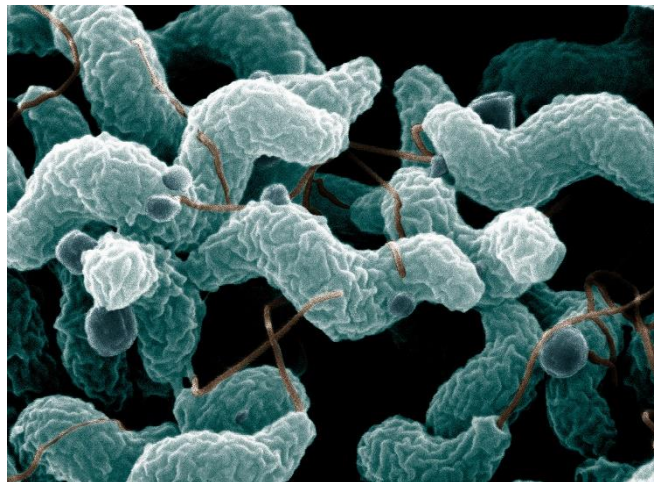


Figura 1: Imagen de microscopia electrónica de *Campylobacter jejuni* (Public Domain) (Autor: De Wood, Pooley, USDA, ARS, EMU. Fuente: Agricultural Research Service (ARS) is the U.S. Department of Agriculture's chief scientific research agency. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ARS_Campylobacter_jejuni.jpg)

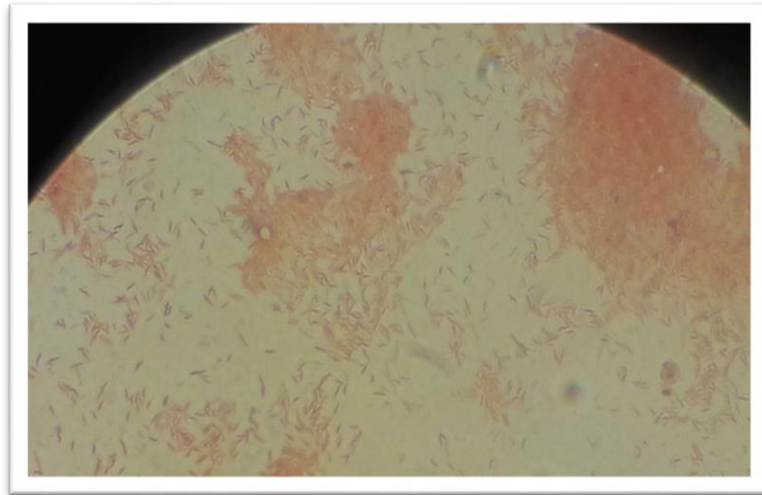


Figura 2: Imagen de tinción de *Campylobacter* spp. con fucsina 0,5% (Aumento: 1.000X).

No forman esporas, en cultivos viejos se observa al microscopio óptico la transformación de los bacilos curvos a cuerpos esféricos o cocoides, con pérdida de su viabilidad, conocidas como formas viables no cultivables. Poseen movilidad debido a la presencia de flagelos monótricos o anfítricos. La gran mayoría de las especies son microaerófilas estrictas. Algunas pueden crecer en aerobiosis y otras en anaerobiosis. Todas son oxidasa positiva e incapaces de fermentar u oxidar hidratos de carbono. Obtienen su energía de aminoácidos o de intermediarios del ciclo del ácido tricarbóxico que no deriven de hidratos de carbono (Edmons, y otros, 1987).

Todas las especies son capaces de desarrollar a 37 °C. Algunas tienen una temperatura óptima de crecimiento de 42 °C, por lo que es una práctica habitual en el laboratorio la incubación a esta temperatura con el fin de facilitar el aislamiento selectivo. Aquellas especies de *Campylobacter* que son capaces de crecer a 42 °C - 43 °C pero no a 25 °C son llamadas también termófilas o termotolerantes y corresponden a las especies y subespecies *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* y *C. upsaliensis* (Lopardo, Predari, & Vay, s.f).

1.3 Relación de *Campylobacter* spp. y los alimentos

1.3.1 Reservorio

La campylobacteriosis es una zoonosis mundial, la presencia de *Campylobacter* como comensal del tracto digestivo de los animales hace que el microorganismo esté difundido por todo el mundo (Platts Mills & Kosek, 2015).

Las especies de *Campylobacter* están ampliamente distribuidas en la mayoría de animales de sangre caliente; prevalentemente en los destinados al consumo, como aves de corral, vacunos, porcinos, ovinos; al igual que en especies salvajes (OMS, 2018; Gonzalez Ayala & Cecchini, 2001). Además de encontrarse en especies de animales silvestres y domésticas, entre ellas las aves son las más importantes (Lapierre, 2013).

Hay trabajos que describen su hallazgo en animales de compañía como perros y gatos (Misawa, Kawashima, & Kondo, 2001; TAMBORINI, y otros, 2012). Estudios realizados en la ciudad de Buenos Aires, Argentina; describieron la presencia de *Campylobacter* spp. con prevalencias del 16,96% en perros, del 20% en gatos y del 40% en aves (Lopez, y otros, 2003).

1.3.2 Mecanismos de transmisión

Campylobacter jejuni y *C. coli* son agentes causales de gastroenteritis en el hombre en países en vías de desarrollo. Habitualmente, estas bacterias habitan en el intestino de los animales que actúan como reservorios y se detectan con frecuencia en alimentos que derivan de ellos.

La transmisión de *Campylobacter* spp. en el hombre se produce en forma directa por contacto de personas con heces de animales que contengan este patógeno, o indirectamente por el consumo de alimentos de origen animal (principalmente de origen aviar) poco cocidos y/o por contaminación cruzada de alimentos crudos con alimentos elaborados (Platts Mills & Kosek, 2015).

El consumo de alimentos y agua contaminados con desechos animales o humanos no tratados representa el 70% de las enfermedades relacionadas con *Campylobacter* cada año. Los alimentos incluyen leche no pasteurizada, carnes, aves, mariscos, frutas y verduras (Mathewson, 1983). Además, existen datos en la bibliografía sobre brotes por aguas potables con escaso nivel de cloro residual (Godoy, y otros, 2002).

La transmisión alimentaria es una de las formas más comunes de infección humana. Se estima que más del 50% de los casos esporádicos de enteritis por

Campylobacter spp. están asociados al consumo de pollos o a su manipulación (Nario, 2014).

1.4 Relación de *Campylobacter* y la salud

Las especies de *Campylobacter* son altamente infecciosas. La dosis infectiva varía, encontrándose entre 500 a 10.000 bacterias. La gravedad de la infección va a depender de varios factores, incluyendo el estado inmunitario del huésped, la cantidad de inóculo que se ingiera, y el estrés ambiental sufrido por la bacteria (Nachamkin, Blaser, & Tompkins, *Campylobacter jejuni* Current Status and Future Trends, 1992; Hernandez Cortez, Aguilera Arreola, & Castro Escarpulli, 2013).

En la actualidad se conoce que varias patologías en humanos y animales son causadas por distintas especies de *Campylobacter*, para las que además se han identificado distintos animales que pueden actuar como reservorios (Lopardo, Predari, & Vay, s.f) (Tabla 2):

Tabla 2: Principales especies de *Campylobacter* encontradas en asociación con procesos infecciosos del ser humano¹.

Especies	Reservorio	Enfermedad en el ser humano
----------	------------	-----------------------------

<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	bovinos, ovinos	Septicemia, enteritis, abortos y meningitis
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	bovinos	Septicemia (muy rara)
<i>C. upsaliensis</i>	perros, gatos y primates	Enteritis, septicemia
<i>C. hyointestinales</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	cerdos, bovinos y hámster	Enteritis, septicemia
<i>C. concisus</i>	humanos	Enteritis, septicemia, infección periodontal
<i>C. lari</i>	gaviotas, otras aves, perros, gatos	Enteritis, septicemia
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	humanos (con y sin diarreas), perros y gallinas	Enteritis, septicemia
<i>C. jejui</i> subsp. <i>jejuni</i>	aves y mamíferos	Gastroenteritis, septicemia
<i>C. coli</i>	aves y mamíferos	Gastroenteritis, septicemia
<i>C. curvus</i>	humanos	Infección de la cavidad oral, enteritis, septicemia, peritonitis

¹ Adaptado de Lopardo

En humanos la infección gastrointestinal por lo general es autolimitada. Se caracteriza por diarrea acuosa, fiebre, dolor abdominal. El periodo de incubación es de 2 a 5 días. Se ha observado que el 50% de los pacientes con diarrea es precedido por un periodo febril, malestar generalizado, mialgia, dolor abdominal y fiebre que puede llegar a los 40 °C. (Cervantes Garcia & Cravioto, 2007).

Un aspecto muy importante es que actualmente se conoce que la infección por *C. jejuni* es un antecedente muy frecuente que precede al desarrollo del síndrome de Guillain Barré, un trastorno autoinmune del sistema nervioso periférico, que se caracteriza por parálisis flácida aguda (Nachamkin, Allos, & Ho, *Campylobacter species and Guillain-Barré syndrome*, 1988).

A nivel mundial el género *Campylobacter* es considerado una de las causas más frecuentes de gastroenteritis (Platts Mills & Kosek, 2015). Los grupos más vulnerables son menores de un año y adultos jóvenes en los países desarrollados y mayores de 5 años en los países en desarrollo. Las infecciones por *Campylobacter* spp. suelen ser leves, pero pueden ser mortales en niños pequeños, personas de edad avanzada e individuos inmunocomprometidos. La mayor incidencia se observa en climas templados, predominando en el verano y comienzos del otoño (OMS, 2018).

En países en desarrollo la infección es leve en pacientes mayores de 6 meses de edad; siendo grave en pacientes menores de 6 meses (Rao, y otros, 2001).

En la Unión Europea, *Campylobacter* spp. fue la causa más frecuente de enteritis con aproximadamente 200.000 casos declarados en el año 2008. Sin embargo, se calcula que se declaran únicamente un 2,1% de los casos, por lo que la incidencia real se situaría en unos 9 millones de casos anuales (García, y otros, 2013).

En el mediterráneo, Grecia presenta la prevalencia más alta de *Campylobacter* spp. en niños (78,4%). En Dinamarca la alta resistencia a antibióticos que manifestó *C. jejuni* aislado de distintos orígenes fue encontrado como un factor predisponente a enfermedad en humanos. La campilobacteriosis tiene gran impacto en América Latina, donde Argentina, Ecuador, Paraguay y Perú reportan las prevalencias más altas, mientras que en Colombia los estudios son muy limitados ya que se carece de un diagnóstico preciso de este microorganismo y su impacto en individuos y poblaciones vulnerables a la infección es desconocido. En Brasil en el 2010, *C. jejuni* y *C. coli* se detectaron en 9,6% y 6% de niños con diarrea, respectivamente (Rodríguez Gutierrez, Guzman Osorio, & Verjan García, 2015).

Existe un estudio de Fernández y cols. (2001) en el cual revisaron la prevalencia de gastroenteritis por *C. jejuni* en niños de países de América del Sur (Fernandez, 2011)

Tabla 3: Frecuencia de aislamiento de *C. jejuni* en materias fecales diarreicas de niños en países de América del Sur. Adaptado de Fernández y cols. (2001)

País	Diarrea por <i>C. jejuni</i> (%)
------	----------------------------------

Argentina	30,1
Bolivia	10,5
Brasil	9,6
Chile	14,1
Colombia	14,4
Ecuador	23,0
Paraguay	18,4
Perú	13,0
Uruguay	14,3
Venezuela	13,0

En la ciudad de Córdoba, se informó que *Campylobacter* spp. fue la segunda causa de gastroenteritis aguda en los centros nosocomiales de pediatría. La prevalencia de los estudios realizados en los períodos 2004 -2011 y 2010 – 2014 fue de 41,68% y 22,7%, respectivamente (Huerta, y otros, 2011; Vidal Delgado, Romero, Arbelo, & Jacome, 2015).

1.5 Diagnóstico Microbiológico

En términos generales, es posible decir que la búsqueda de *Campylobacter* se realiza con mayor frecuencia en muestras clínicas de origen humano, particularmente en heces diarreicas. Por lo que los protocolos aplicados en estas muestras están mejor estandarizados con respecto a los utilizados en otras matrices. Para el aislamiento a partir de materia fecal humana, rutinariamente se busca solamente la presencia de *C. jejuni* y *C. coli*, aunque se debe tener presente que existen otras especies del género que también producen cuadros de gastroenteritis.

Por lo general, la etapa inicial implica la siembra de la muestra en un medio selectivo. Los más comunes contienen agar sangre y una mezcla de antibióticos que inhibe la microbiota acompañante y selecciona a *Campylobacter* spp. Los medios más utilizados son los de Skirrow, Skirrow modificado, Butzler, CCDA (charcoal, cefoperazone, desoxycolate agar), Campy-BAP y Preston. Existen diversos algoritmos para el aislamiento en muestras clínicas publicado por el Instituto Dr. Carlos G. Malbran, Asociación Argentina de Microbiología, entre otras entidades científicas (Lucero & Turco, s.f.).

Por otra parte, se han desarrollado medios de cultivo cromogénicos que permiten detección, identificación y enumeración de *Campylobacter* termotolerantes mediante pigmentación de las colonias; debido a la presencia de enzimas que desdoblan las estructuras de las sustancias cromógenas permitiendo la visualización del color característico que permite orientar su identificación (Figura 3, Tabla 4). Estos medios pueden ser utilizados para el análisis microbiológico de heces, y también tienen utilidad en la industria alimentaria, para el estudio de muestras ambientales y de alimentos.



Figura 3: Características macroscópicas de colonias de *Campylobacter* termotolerantes (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*) desarrolladas en agar cromogénico CHROMagar® (Fuente: <http://www.chromagar.com/products-chromagar-campylobacter-focus-on-campylobacter-78.html>)

Tabla 4: Características fenotípicas de colonias de especies termotolerantes de *Campylobacter* en el medio cromogénico¹

Microorganismos	Aparencia típica de la colonia
<i>C. coli</i>	Rojo
<i>C. jejuni</i>	Rojo
<i>C. lari</i>	Rojo
Otros microorganismos	Azul o inhibición

¹ Fuente: <http://www.chromagar.com/products-chromagar-campylobacter-focus-on-campylobacter-78.html#.XxcOEJ4zbb0>

Algunos trabajos evaluaron comparativamente la performance de distintos medios de cultivo para el aislamiento de *Campylobacter* spp. Específicamente, en el de De Zutter y cols. (2017) se compararon las eficiencias de cuatro medios de cultivo distintos, para detectar la contaminación de carne de ave de corral con *Campylobacter* spp. En tres de ellos, incluidos el agar cromogénico, se obtuvieron resultados similares de recuperación de este patógeno (De Zutter & col, 2017). Sin embargo, este estudio no es concluyente debido a que el número de muestras es bajo.

Otra metodología de aislamiento de *Campylobacter* spp. es mediante la técnica de filtración con el empleo de membrana de celulosa (Figura 4). Este método se basa en la separación de *Campylobacter* spp. del resto de la flora microbiana acompañante, que quedará retenida en la superficie de la membrana de celulosa con poros de 0,45 μm o 0,66 μm . Ello se debe a que este patógeno es de menor tamaño que el resto de las enterobacterias, las que quedarán retenidas en la superficie de la membrana del filtro. Los bacilos que logran penetrar la membrana se depositan en el medio rico en sangre que actúa como sustrato para su crecimiento. De esta manera, se obtiene un procedimiento selectivo el cual reemplaza la adición de antibióticos al medio de cultivo para eliminar la flora acompañante.

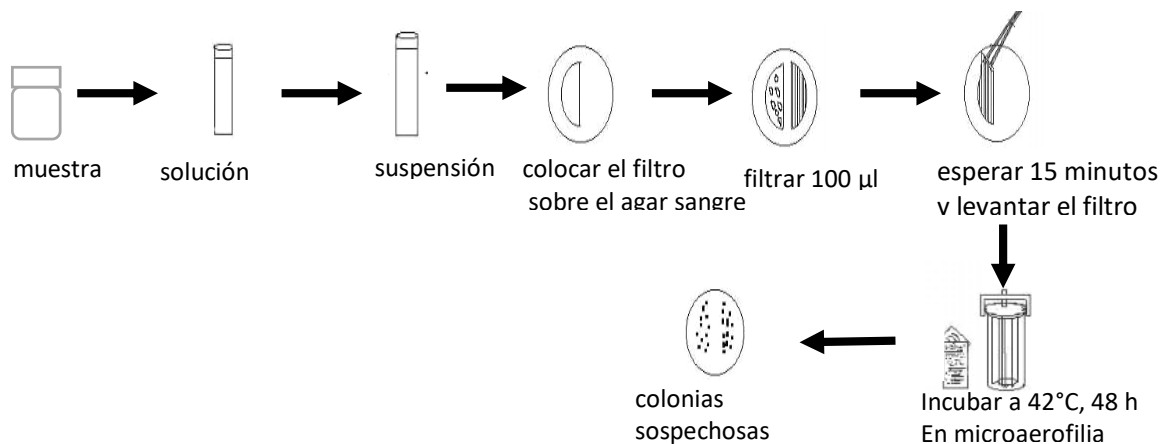


Figura 4: Técnica de Filtración con membrana de celulosa para la detección de *Campylobacter* spp. en heces. (Tomado del Manual de Procedimientos: *Campylobacter* – ANLIS Dr. Carlos G. Malbran – Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Departamento Bacteriología – Servicio Bacteriología Sanitaria, 2001)

Estudios realizados en heces de pacientes con clínica de gastroenteritis, emplearon esta metodología y obtuvieron buena recuperación con respecto a otros medios de cultivo (Moya Salazar, Pio Davila, Terán Vásquez, & Olivo López, 2016).

Soto Beltran y cols. , realizaron la búsqueda de *C. jejuni* y *C. coli* en muestras de carnes de aves en la ciudad de México, mediante metodología de filtración de membrana, obteniendo como resultado un aumento del porcentaje de recuperación de este microorganismo con respecto al empleo de otros medios de cultivos (Soto Beltran, Quiñones, Ibarra Rodriguez, & Amézquita López, 2020).

En cuanto a la detección de *Campylobacter* spp. en alimentos y agua, el Manual de Análisis Bacteriológico (BAM: Bacteriological Analytical Manual) de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA: Food and Drug Administration) presenta los procedimientos de laboratorio referidos para el análisis microbiológico de alimentos y cosméticos. En el capítulo 7 del manual Versión 2001, se describe el protocolo para aislamiento de especies de *Campylobacter* en alimentos y agua (Hunt, Abeyta, & Tran, 2000). En la Figura 5 se muestran los pasos de la metodología BAM para el análisis de *Campylobacter* en muestras de alimentos, que se resumen a continuación:

- Preparación de una dilución decimal de homogenato del alimento.
- Incorporación del caldo Bolton suplementado con Vancomicina, Cefoperazona, Trimetoprima y Anfotericina B, a menudo necesario/s cuando hay un gran número de flora de microorganismos acompañantes. Los antibióticos funcionan de manera más efectiva y las células de *Campylobacter* pueden utilizar la atmósfera baja en oxígeno de manera más eficiente.
- Pre-enriquecimiento: es necesario realizar este paso si se conoce que *Campylobacter* spp. se encuentra en condiciones de stress, como por ejemplo cuando el alimento se ha refrigerado durante ≥ 10 días.
- Enriquecimiento: brinda las condiciones de atmósfera y tiempos óptimos para que aumente el número de células de *Campylobacter* spp.
- Aislamiento: permite evidenciar el desarrollo de colonias características de *Campylobacter* spp.

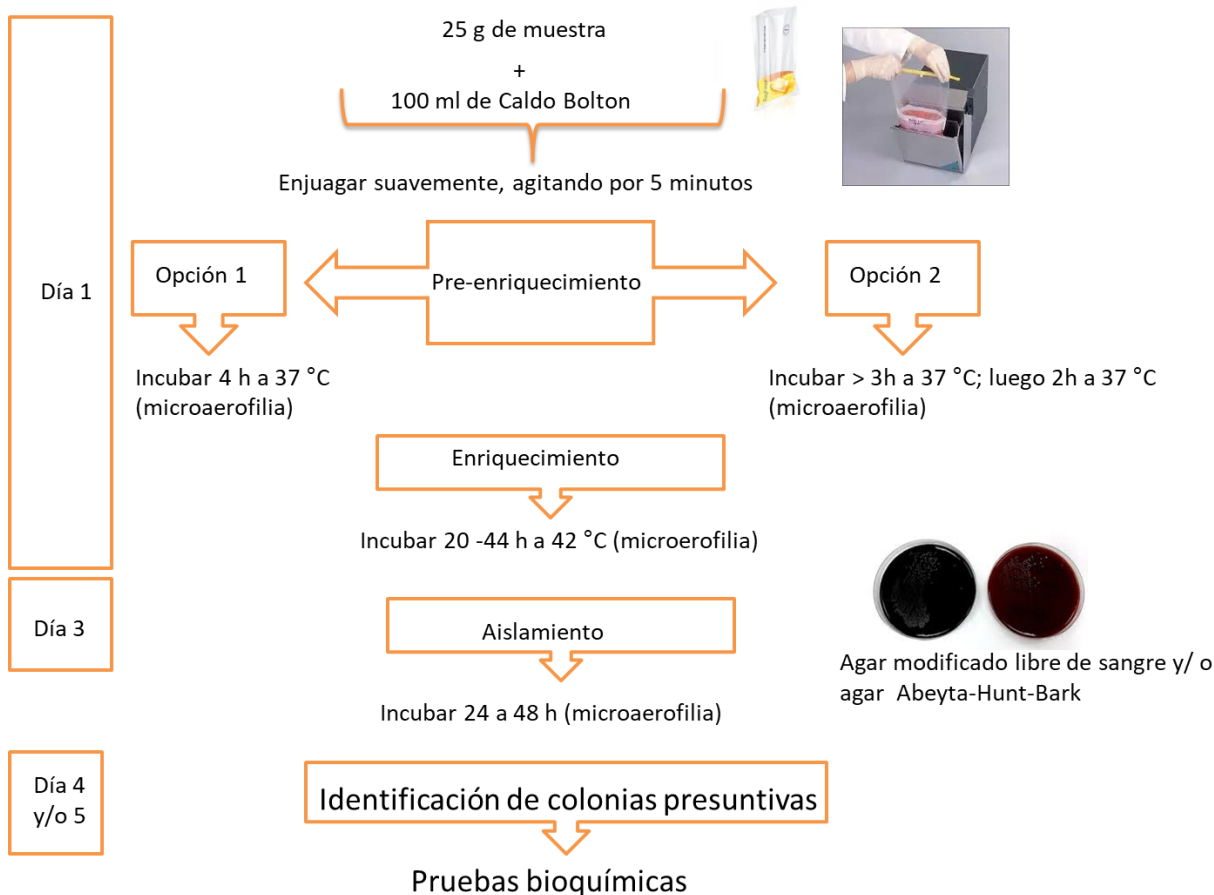


Figura 5: Flujograma de preparación y siembra de muestras de alimentos y agua. (Fuente: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-campylobacter>)

1.6 Legislación alimentaria

La Comisión del Codex Alimentarius es un organismo abierto a todos los países que son miembros asociados de la FAO y de la OMS. Cuenta en la actualidad con 165 países miembros, que representan más del 98 por ciento de la población mundial.

Una de las funciones del Codex Alimentarius o "**Código de alimentación**" es proteger la salud de los consumidores, garantizar comportamientos del mercado internacional de los alimentos y coordinar los trabajos internacionales sobre normas alimentarias.

El **Codex Alimentarius** brinda Directrices para la Aplicación de la Gestión de Riesgos Microbiológicos a través de las Buenas Prácticas de Higiene en cada

paso de la cadena de producción avícola, para la reducción logarítmica de patógenos como *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp. (FAO/OMS, 2011).

En nuestro país se toman como referencia las indicaciones de Codex, para la elaboración del **Código Alimentario Argentino** (CAA). En este último, en el capítulo VI – Alimentos cárneos y afines, establece características de comercialización de carne de ave (pollo). Sin embargo, no se dan especificaciones de criterios microbiológicos de *Campylobacter* spp. en este producto alimenticio (Codigo Alimentario Argentino, 2019). Hace algunos años, el **Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria** (SENASA), dictó una resolución 336/2016; considerando que es necesario establecer criterios de seguridad sobre la aceptación de los alimentos, haciendo referencia a la presencia de microorganismos patógenos promoviendo parámetros microbiológicos para carne de ave, huevos, ovoproductos, carne de especies menores y productos de la caza (SENASA, 2016).

Nuestro país posee un fuerte enfoque en la producción y consumo de carne de pollo. No obstante, la inocuidad de la carne ofrecida a los consumidores no se ha certificado. En 2013 se publicó un estudio realizado en Argentina, en el que se estudiaron la ocurrencia y concentración de *Campylobacter* spp. termotolerantes en muestras obtenidas a distintos tiempos, desde la granja reproductiva hasta la carne de pollo en el mercado minorista (Zrun, y otros, 2013). Se tomaron muestras cloacales de gallinas y pollos de las granjas, huevos, alimento, agua, canales de pollo de matadero y mercado minorista. Los cultivos con mayor proporción de recuperación se registraron en canales en comercio minorista (25/30, 83%), y muestras fecales de gallinas reproductoras (27/45, 60%). Por otro lado, 3,3% de cultivos de muestras de pollo de engorde de menos de una semana fueron positivos (3/90), pero en el periodo final de cría la proporción aumentó a 28,9% (9/26), y en el matadero fue de 33,3% (10/30). Este estudio reveló presencia de *Campylobacter* spp. en un porcentaje alto de muestras de carne de ave que se comercializan para consumo humano. Sin embargo, no hay datos de relevamientos similares realizados en la ciudad de Córdoba, reflejando la importancia de conocer la contaminación por *Campylobacter* spp. termotolerantes en alimentos a base de carne de aves comercializados en esta ciudad.

2 Hipótesis

Teniendo en cuenta que *Campylobacter* spp. es el segundo agente enteropatógeno aislado en nuestro medio local, se plantea que el microorganismo se encuentra como un contaminante frecuente de pollos parrilleros comercializados en la ciudad de Córdoba.

3 Objetivos

3.1 General:

- Conocer la prevalencia de *Campylobacter* spp. en muestras de pollo parrillero comercializados en la ciudad de Córdoba – Argentina, en el período diciembre 2017 – diciembre 2019.

3.2 Específicos:

- Evaluar comparativamente la eficacia del medio de cultivo propuesto por la técnica oficial (BAM-FDA 2001 – Bacteriological Analytical Manual), el medio cromogénico “CHROMagar”, y el método de filtración en membrana, para aislar *Campylobacter* spp. termotolerantes a partir de homogenatos pre-enriquecidos y enriquecidos de acuerdo a la metodología oficial.
- Realizar la búsqueda de *Campylobacter* spp. en pollos parrilleros y alimentos derivados comercializados en la ciudad de Córdoba.

4 Materiales y métodos

Para el primer objetivo específico se utilizaron alimentos contaminados experimentalmente con *C. jejuni*, mientras que en el segundo objetivo específico se evaluó la contaminación “natural” de alimentos comercializados en Córdoba, con *Campylobacter* termotolerantes (Figura 6).

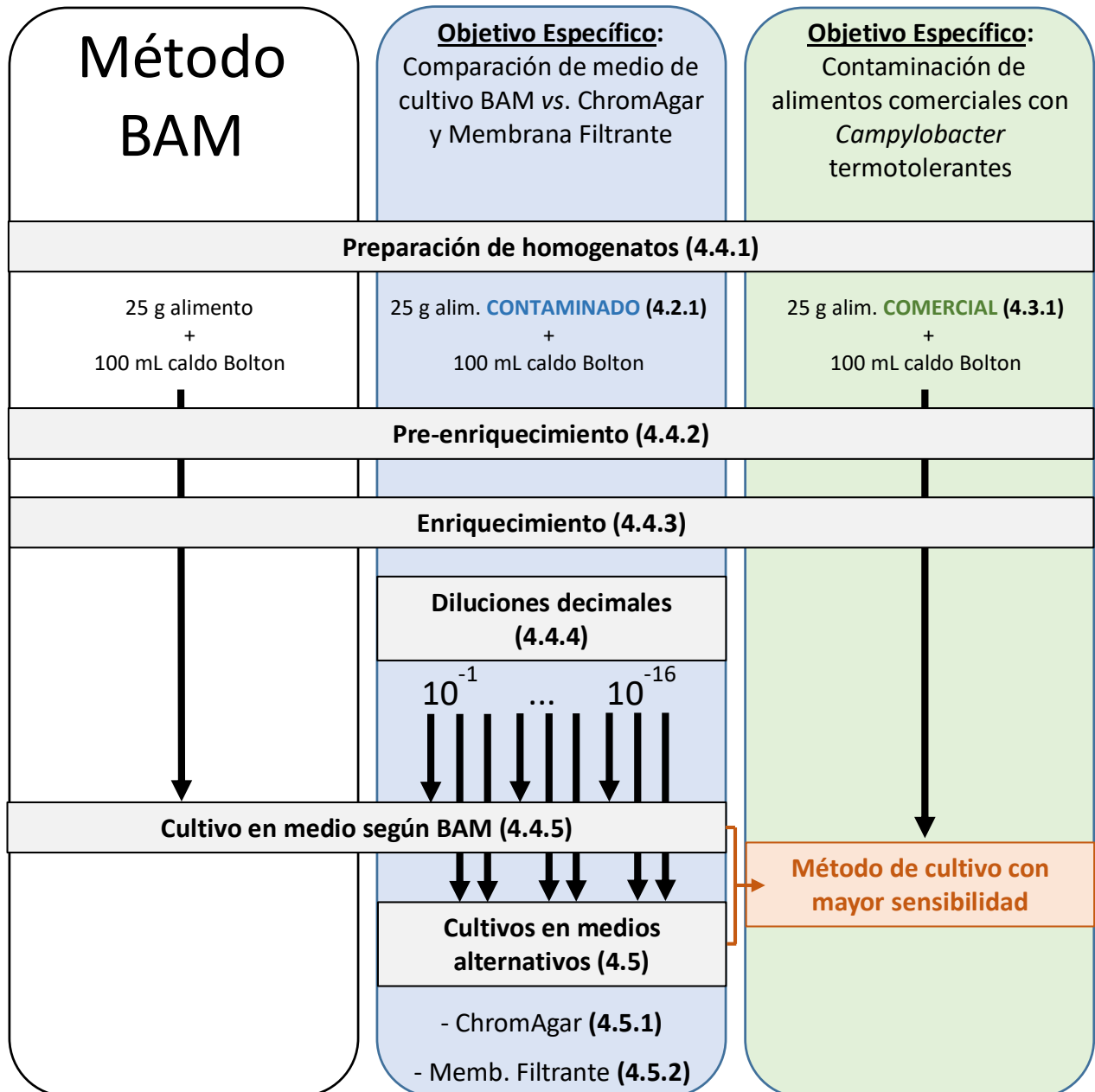


Figura 6: Esquema experimental desarrollado en este trabajo de tesis.

Los números entre paréntesis indican la sección donde se describe la metodología

4.1 Microorganismo: Se utilizó una cepa aislada de heces humanas, identificada mediante pruebas bioquímicas como *C. jejuni*. El microorganismo se cultivó por 48 h a 42 °C en agar Brucella suplementado con sangre de carnero al 5%, en condiciones de microaerofilia obtenida mediante sobres generadores de la misma. Entre las pruebas bioquímicas que se realizaron para confirmar género y especie se realizaron: coloración con fucsina al 0,5%, oxidasa, catalasa, crecimiento en agar Mac Conkey, hidrólisis de hipurato, movilidad en caldo, resistencia a ácido nalidíxico y cefalotina mediante el empleo de monodiscos de dichos antibióticos (Hunt, Abeyta, & Tran, 2000).

4.1.1 Preparación de suspensión bacteriana para contaminación experimental:
Se preparó a partir de un cultivo de 48 horas de la cepa de *C. jejuni* aislada y caracterizada como se describe en el punto anterior, empleando solución fisiológica estéril y ajustando dicha suspensión a 0,50 de la escala de Mc Farland (aproximadamente a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml), la medición fue realizada por medio de método nefelómetro.

4.2 Elaboración de alimento contaminado artificialmente:

La matriz empleada para la producción del alimento contaminado artificialmente fue pechuga de pollo. Se realizó una desinfección superficial sumergiéndolas en una solución de hipoclorito de sodio 0,1% durante un minuto, eliminando luego los restos de cloro mediante varios lavados con agua destilada estéril. Posteriormente la carne se trituró por completo hasta obtener una muestra homogénea empleando un mixer cuidadosamente desinfectado con alcohol al 70%, se fraccionó en esterilidad en alícuotas de 25 g, y se conservó a – 20 °C hasta su inoculación con la suspensión de *C. jejuni*.

4.2.1 Contaminación experimental: la carne (25 g) se contaminó con 100 µl de la suspensión de *Campylobacter jejuni*, obtenida como se describió en 4.1.1.

4.3 Análisis de contaminación de alimentos comercializados en la ciudad de Córdoba con *Campylobacter* spp. termotolerantes.

4.3.1 Alimentos, muestreo, transporte y conservación:

La presencia de *Campylobacter* spp. termotolerantes fue estudiada en pollos parrilleros y en alimentos elaborados con carne de ave. Se analizaron 26 muestras de pollos parrilleros en el periodo de estudio comprendido entre diciembre 2017 – diciembre 2019. Además, en el periodo de 6 meses (enero a junio de 2018), se analizaron alimentos derivados de pollo como milanesas, hamburguesas y albóndigas.

El muestreo se efectuó aleatoriamente en comercios que expendían este producto cárnico.

La conservación se efectuó en heladera conservadora, y se transportó de inmediato al laboratorio para su respectivo análisis.

4.4 Cultivo de *Campylobacter* spp. termotolerantes según la Metodología oficial: BAM-FDA 2001.

4.4.1 Preparación de los homogenatos: Se homogeneizaron 25 g de carne o producto cárnico comercializados en Córdoba, con 100 ml de caldo Bolton con antibióticos.

4.4.2 Pre-enriquecimiento: Las diluciones del homogenato de pechuga contaminada, y los homogenatos de carne de ave o derivados comercializados en Córdoba, se incubaron durante 4 h a 37 °C, en microaerofilia.

4.4.3 Enriquecimiento: se realizó incubando el caldo pre-enriquecido, a 42 °C durante 48 h, en condiciones de microaerofilia.

4.4.4 Diluciones del caldo enriquecido: A los fines de evaluar comparativamente las sensibilidades de los métodos de cultivo alternativos propuestos en este trabajo, a partir del caldo enriquecido de las pechugas contaminadas experimentalmente se realizaron diluciones decimales en el rango 10^{-1} - 10^{-16} , con caldo Bolton suplementado con antibióticos.

4.4.5 Cultivo: Se sembraron 100 µl de los homogenatos enriquecidos, mediante diseminación por estrías en la superficie de Agar selectivo libre de sangre, y se incubaron a 42 °C por 48 h en condiciones de microaerofilia.

4.5 Evaluación de la eficacia de medios de cultivo y procedimientos alternativos para la detección de *Campylobacter* spp.

Se evaluaron las sensibilidades del agar cromogénico (CHROMagar *Campylobacter*) y del Método de filtración en membrana, para la detección de *C. jejuni* en los caldos enriquecidos.

4.5.1 Agar cromogénico (CHROMagar) *Campylobacter*. Los caldos enriquecidos (100 µl) se sembraron mediante diseminación por estrías en la superficie del agar. Los resultados se interpretaron de acuerdo a las especificaciones del fabricante, indicadas en la Tabla 4.

4.5.2 Método de filtración en membrana: Para la siembra se dispuso una membrana de filtro de celulosa estéril con poros de 45 µm en la superficie de agar sangre de carnero al 5% y sobre la misma, se diseminaron 100 µl de los homogenatos enriquecidos con el empleo de pipeta automática. Luego de 10 minutos de reposo, la membrana fue retirada, diseminando el filtrado con ansa en aro; las placas se incubaron por 48 h a 42 °C y en condiciones de microaerofilia.

Las sensibilidades de CHROMagar *Campylobacter* y del Método de filtración en membrana se definieron a partir de las máximas diluciones del homogenato de pechugas contaminadas artificialmente que dieron cultivos positivos y se compararon con lo observado en el Agar selectivo libre de sangre (especificado en la Metodología oficial BAM-FDA 2001).

5 Resultados

5.1 Comparación de la eficacia del medio de cultivo propuesto por la técnica oficial (BAM-FDA 2001), el medio cromogénico “CHROMagar”, y el método de filtración en membrana, para aislar *Campylobacter* spp. termotolerantes a partir de homogenatos pre-enriquecidos y enriquecidos de acuerdo a la metodología oficial.

En la primera etapa de este trabajo se confirmó la identidad del microorganismo utilizado para las contaminaciones experimentales de la carne de ave (pechuga de pollo).

Se utilizó un aislamiento humano de *C. jejuni* obtenido de materia fecal. En la figura 7 se muestran las características de las colonias a las 48 horas de cultivo en agar Brucella suplementado con 5% de sangre de carnero.

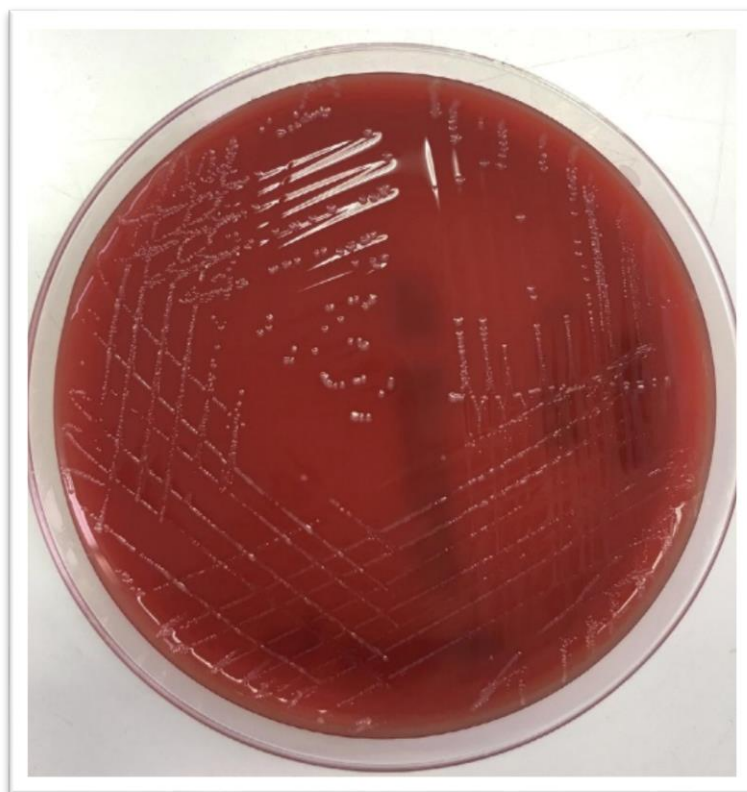


Figura 7: Características de las colonias del *Campylobacter jejuni* utilizado para la contaminación experimental de carne de ave, a las 48 horas de cultivo en agar brucella suplementado con 5% de sangre de carnero.

El microorganismo desarrolló colonias redondas de bordes lisos definidos de 1 a 3 mm de diámetro, de color transparente. A las 48 horas su tamaño aumenta unos pocos milímetros más. Carecen de la propiedad de destruir a los glóbulos rojos contenidos en el medio de cultivo.

En la coloración con fucsina (Figura 8) se observaron bacterias curvas, generalmente en cadena que se asemejan a formas en zigzag, se visualizó la morfología típica de forma de “gaviota”.

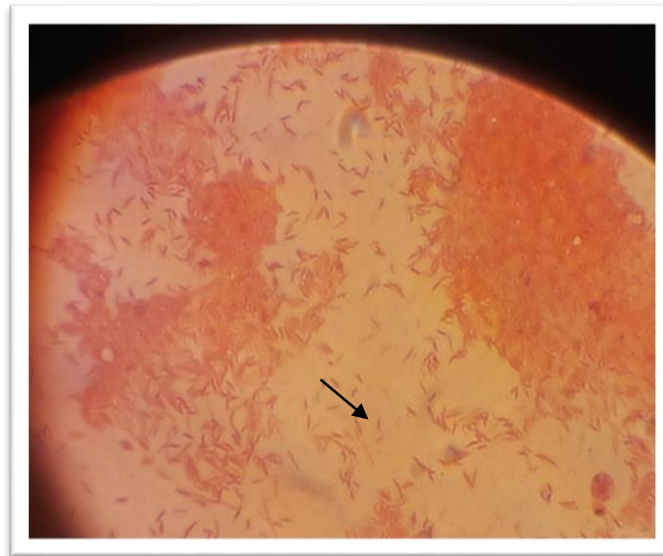


Figura 8: Coloración con fucsina (Aumento 1000X)

La confirmación de género y especie del aislamiento usado para la contaminación experimental de la carne de ave, se realizó mediante pruebas bioquímicas. Las reacciones de catalasa y oxidasa (Figura 9) fueron positivas y, conjuntamente con la coloración con fucsina, se confirmó que el microorganismo correspondía al género *Campylobacter* spp.

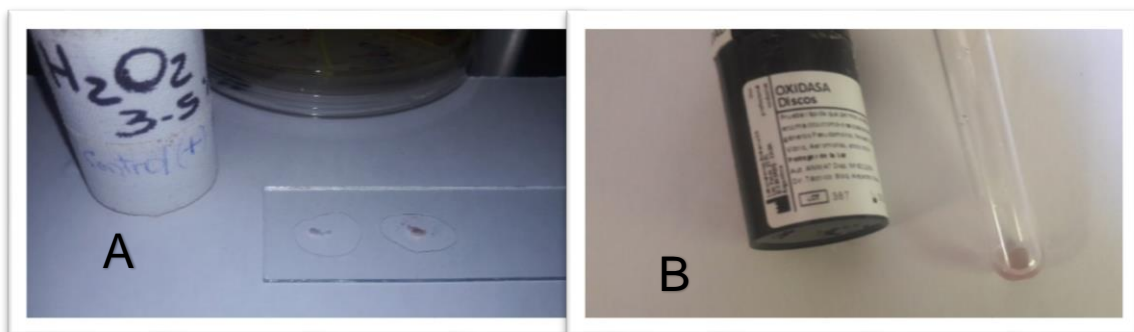


Figura 9: Reacciones bioquímicas del microorganismo usado para la contaminación experimental de la carne de ave. Pruebas de catalasa (A) y oxidasa (B).

La confirmación a nivel especie de *C. jejuni* se realizó empleando las pruebas bioquímicas: catalasa, oxidasa, crecimiento a distintas temperaturas, reducción de nitrato, hidrólisis de hipurato, resistencia a antibióticos como cefalotina y ácido nalidíxico, descritas en detalle en el ANEXO I.

Antes de realizar la contaminación experimental se verificó la ausencia de *Campylobacter* spp. en la carne de pollo, desinfectada como se describió en los materiales y métodos. La confirmación se realizó mediante la Metodología oficial para *Campylobacter* spp. (BAM-FDA 2001), no observándose desarrollo de microorganismos en los homogenatos enriquecidos y medio de cultivo incubados por 48 h a 42 °C y en condiciones de microaerofilia.

Como se describe en la Figura 6, se realizaron homogenatos a partir de la carne contaminada experimentalmente, se pre-enriquecieron y posteriormente se realizó el enriquecimiento. A continuación, se hicieron diluciones decimales del caldo enriquecido, desde 10^{-1} a 10^{-16} . Luego se sembraron cuatro diluciones por cada placa, en los distintos medios de cultivos: agar selectivo libre de sangre (utilizado en la técnica BAM), agar cromogénico (ChromAgar *Campylobacter*) y agar suplementado con 5% de sangre de carnero (Figura 10).



Figura 10: Siembra de diluciones decimales del caldo enriquecido de alimento contaminado experimentalmente con *Campylobacter jejuni*.

Las placas sembradas fueron incubadas 48 h a 42 °C en condiciones de microaerofilia. Al finalizar el tiempo de incubación las placas fueron examinadas para detectar la presencia (P) ó ausencia (A) de desarrollo de colonias con morfologías compatibles de *C. jejuni*, considerando cada medio de cultivo en particular. Para el medio selectivo propuesto por la metodología oficial y el agar cromogénico que identificaron las colonias de acuerdo a especificaciones del fabricante del medio de cultivo.

En el medio selectivo para *Campylobacter* libre de sangre suplementado con antibióticos (Metodología oficial BAM-FDA), se observaron colonias pequeñas transparentes (Figura 11). Las placas se dividieron en 4 cuadrantes en los que se sembraron la serie de diluciones; en la primera placa (diluciones 10^{-1} a 10^{-4}) hubo desarrollo de *C. jejuni* en la totalidad de la siembra, en la segunda placa hubo desarrollo en la totalidad de las diluciones correspondiente del rango de 10^{-5} a 10^{-8} . En la tercera placa se vio crecimiento en el rango de diluciones de 10^{-9} a 10^{-11} . En esta última dilución se visualizaron escasas colonias; y en las diluciones mayores no hubo desarrollo de este patógeno.

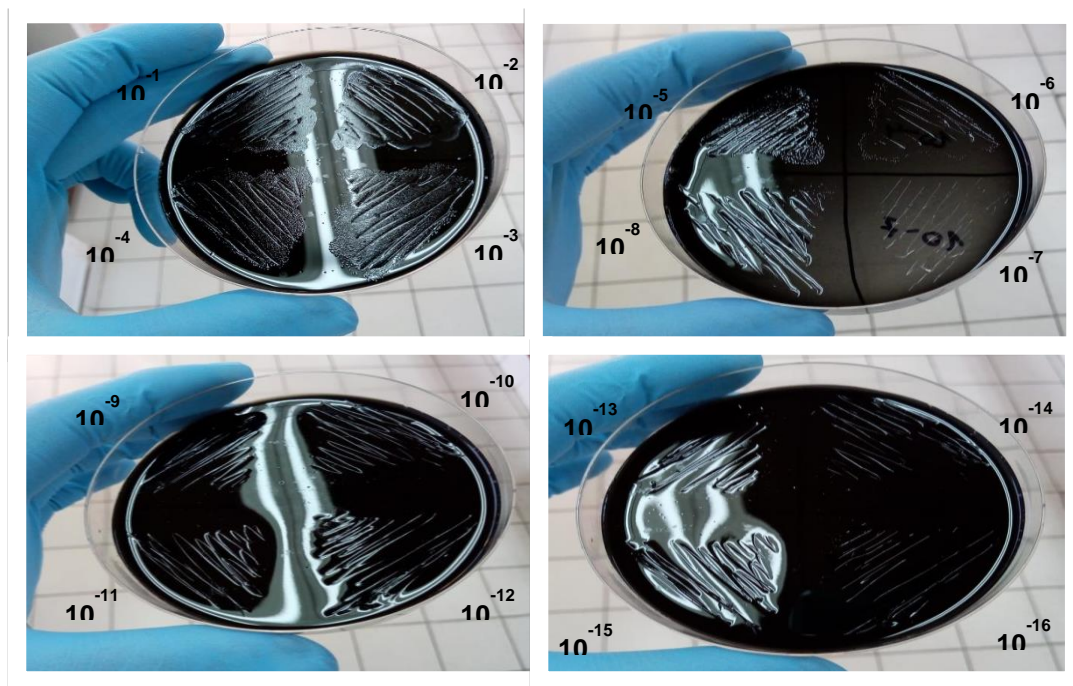


Figura 11: Desarrollo de *Campylobacter* termotolerantes en agar selectivo libre de sangre suplementado con antibióticos

En el medio de cultivo cromogénico se desarrollaron colonias de color rojo-naranja, según lo indicado por el fabricante (Figura 12). Se registró desarrollo de colonias hasta la dilución 10^{-9} , donde solo se observaron escasas colonias. En el resto de las diluciones no hubo desarrollo bacteriano.

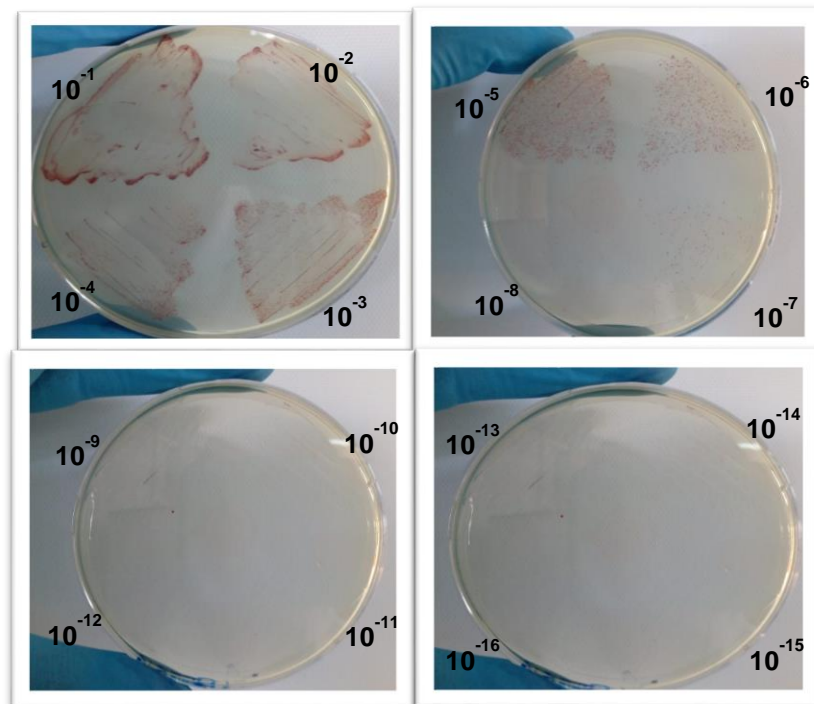


Figura 12: Desarrollo de *Campylobacter* termotolerantes en agar cromogénico.

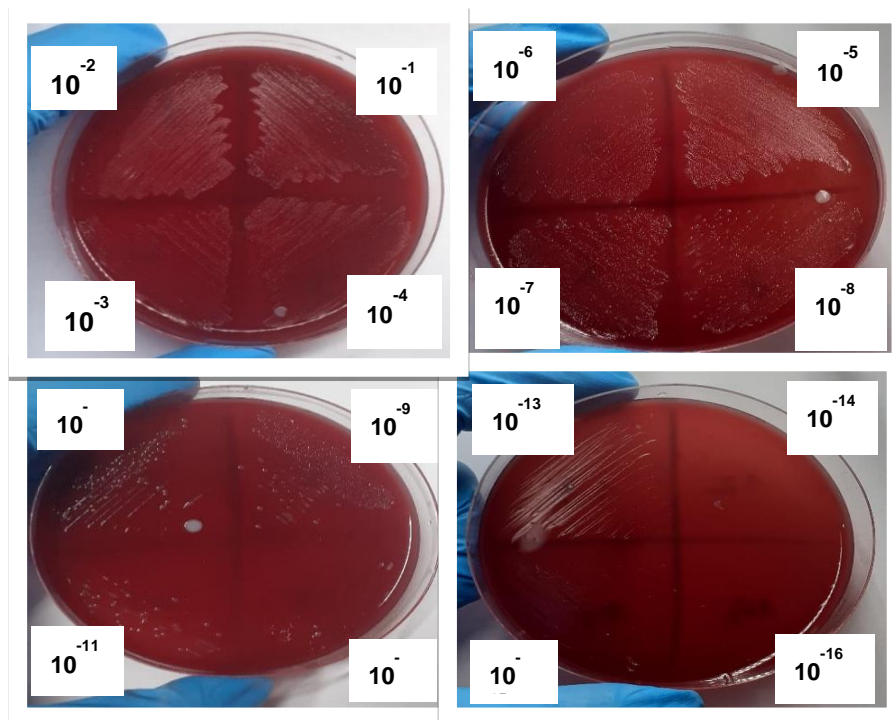


Figura 13: Desarrollo de *Campylobacter* termotolerantes en agar brucella con 5% de sangre de carnero

Por la técnica de filtración con membrana (Figura 13), en la primera placa se observa un desarrollo confluyente de colonias en las cuatro primeras diluciones, en la segunda y tercera placa hubo desarrollo de *C. jejuni* en todas las diluciones, mientras que en el rango 10^{-13} a 10^{-16} no hubo desarrollo del patógeno.

En la Tabla 5 se agrupan los resultados de estas observaciones.

Tabla 5: Sensibilidades del medio de cultivo especificado en el método BAM-FDA 2001 y de los métodos de cultivo alternativos propuestos para la detección de *Campylobacter* spp. termotolerantes

Dilución	Metodología de cultivos		
	AC	AS s/s	FM
10^{-1}	P	P	P
10^{-2}	P	P	P
10^{-3}	P	P	P
10^{-4}	P	P	P
10^{-5}	P	P	P
10^{-6}	P	P	P
10^{-7}	P	P	P
10^{-8}	P	P	P
10^{-9}	P	P	P
10^{-10}	A	P	P
10^{-11}	A	P	P
10^{-12}	A	A	P
10^{-13}	A	A	A
10^{-14}	A	A	A
10^{-15}	A	A	A
10^{-16}	A	A	A

(AC: agar cromogénico, AS s/s: agar selectivo, FM: filtración por membrana, A: ausencia, P: presencia)

Con el empleo de agar cromogénico se determinó crecimiento de *C. jejuni* en el rango de dilución correspondiente a 10^{-1} - 10^{-9} , siendo el medio de cultivo que mostró la menor sensibilidad entre las tres alternativas evaluadas en este trabajo. En el agar selectivo recomendado por la norma BAM-FDA 2001, se obtuvo crecimiento hasta la dilución 10^{-11} . Con el empleo de la metodología de filtración mediante membrana se obtuvo crecimiento en una dilución posterior (10^{-12}) a la obtenida en la técnica de la metodología oficial.

Comparando de las tres metodologías se puede determinar que utilizando la membrana de filtración se logra recuperar este microorganismo a mayores diluciones. Teniendo en cuenta que los volúmenes sembrados fueron 100 μ L en todos los casos, es posible afirmar que la técnica de la membrana de filtración permitiría incrementar 10 veces la sensibilidad de la detección de contaminación de alimentos con *Campylobacter* termotolerantes, en caldos pre-enriquecidos y enriquecidos de acuerdo a la metodología BAM.

En la Tabla 6 se observa la composición de los medios de cultivo evaluados en este trabajo de tesis. Si se comparan los componentes de los medios de cultivos, se puede discernir que el agar cromogénico tiene una mezcla selectiva, el agar selectivo libre de sangre está suplementado con antibiótico, mientras que el agar Brucella empleado en la metodología de filtración por membrana no cuenta con sustancias inhibitoras, sólo es suplementado con sangre de carnero. La mayor riqueza de nutrientes y la menor cantidad de sustancias inhibitoras en este último medio, en relación al agar cromogénico y al agar selectivo libre de sangre, podrían determinar su mayor sensibilidad para detectar contaminación por *Campylobacter* termotolerantes.

Tabla 6: Composición de los medios de cultivo evaluados en este trabajo de tesis.

Componentes	AC	AS s/s	FM
Agar	si	Si	si
	Peptona	Peptona	Peptona de carne
extracto	levadura	carne bovina	levadura
NaCl	si	Si	si
tripteina	no	No	si
fuentes de sulfuro	no	Sulfato ferroso	Bisulfito de sodio
otros		Carbón vegetal (activo), Desoxicolato de sodio, Caseína hidrolizada, Piruvato de sodio	
Suplemento del medio de cultivo	Mezcla selectiva y cromogénica	cefoperazona	Sangre de carnero

Evaluación de la contaminación de alimentos comercializados en la ciudad de Córdoba por *Campylobacter* spp. termotolerantes:



Figura 14: Mapa geo-referenciado de los establecimientos de expendio de las muestras de pollo

En la figura 14, se puede observar el mapa de la ciudad de Córdoba y la zona de donde provienen las muestras estudiadas en esta tesis. Se observa que se encuentran los puntos ubicados aleatoriamente dentro del mapa de la ciudad de Córdoba.

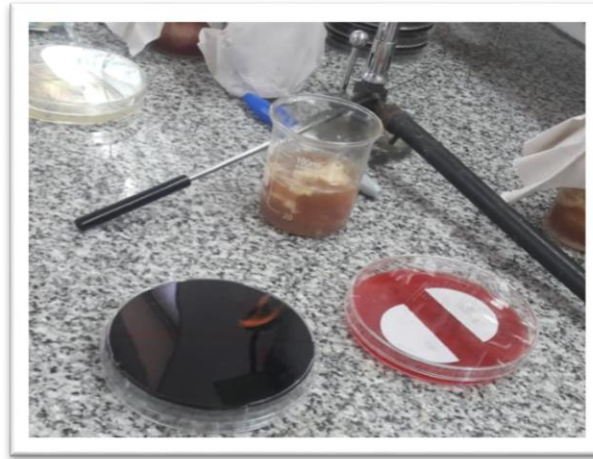


Figura 15: Técnica de filtración empleando membrana de filtro de 0,45 µm

En la realización de la metodología de filtración, se dividió la placa de agar brucella suplementada con sangre de carnero y se colocó la membrana de filtro, se depositó el caldo de enriquecimiento, pasando un tiempo se extrae dicha membrana para luego estriar con ansa la suspensión que se filtró por efecto de la gravedad (figura 15).

5.2.1 Muestras de pollo parrillero:

De las 26 muestras tomadas y analizadas para la investigación de *Campylobacter* spp. se obtuvo desarrollo del microorganismo en el 69% (18/26) de pollos parrilleros.

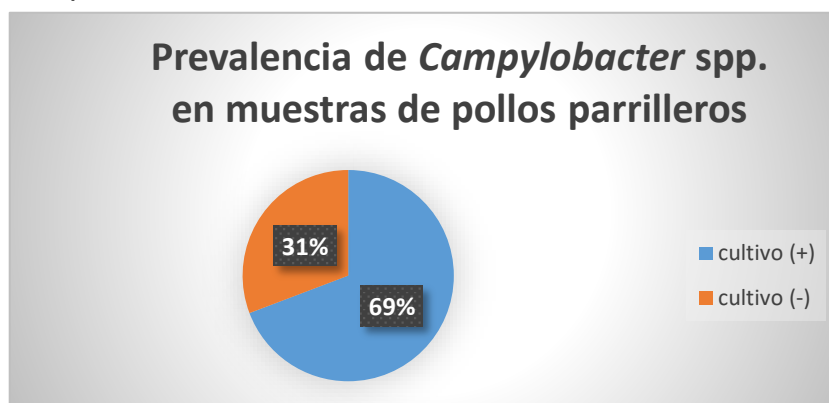


Figura 16: Prevalencia de *Campylobacter* spp en muestras de pollo

5.2.3 Alimentos a base de carne de ave:

Se realizó además la búsqueda de *Campylobacter* spp. en muestras de alimentos a base de carne de ave en un periodo de 6 meses, comprendido entre enero – junio de 2018 (carne de ave rebozada (milanesa), carne de ave triturada rebozada (hamburguesa) y en menudencias de pollos). Se empleó la metodología de filtración de membrana para evaluar la presencia de este patógeno.

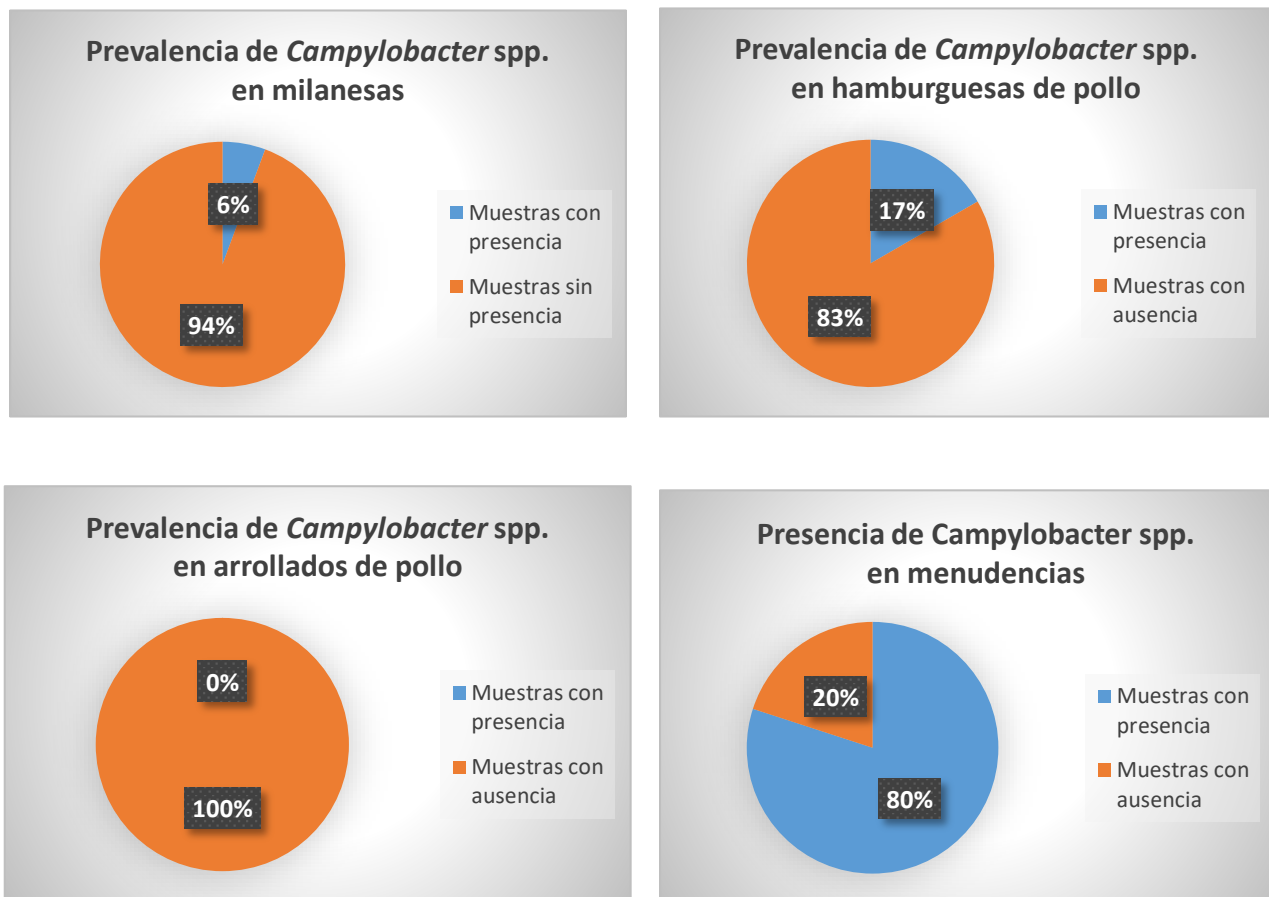


Figura 17: Análisis en el periodo de seis meses (enero - junio 2018) de búsqueda de *Campylobacter* spp en alimentos derivados de pollo parrillero.

En las muestras de alimentos derivadas de pollo, se determinó la presencia de este patógeno en varios tipos de preparaciones culinarias alimenticias (figura 17).

En alimentos fileteados y posteriormente rebozados (milanesas) se detectaron 3 muestras de 53 analizadas, obteniendo 6% (3/53) de prevalencia en este tipo de alimento.

En alimentos triturados, aditivados y rebozados (hamburguesas) se determinó en una muestra de 6 analizadas, alcanzando un 17% de positividad. En muestras derivadas de pollo, mecánicamente separadas, rellenas (arrollado) no se detectó el patógeno en cuatro muestras analizadas.

Además, se evaluaron las menudencias de pollo que eran vendidas conjuntamente con este alimento. Se estudiaron 5 muestras y se detectó contaminación en un 80% de las mismas (4/5).

La presencia de *Campylobacter* spp. en milanesas y hamburguesas de pollo muy probablemente se debe a que provienen de los mismos animales a partir de los cuales se realizaron las preparaciones de los alimentos. Distinta es la situación de la detección en menudencias, debido a que el origen de esta bacteria puede ser cualquier ave portadora y/o infectada, que ingresa a la planta de faena avícola, debido al fraccionado sistemático del animal y posteriormente a agrupamiento aleatorio de las porciones que componen el producto que va a estar dispuesto para la venta.

6.1 DISCUSIÓN

La infección por *Campylobacter* es considerada como un problema para la salud pública y requiere estudios que permitan comprender la epidemiología de este microorganismo en la producción primaria avícola. De manera de detectar los puntos críticos en dicha cadena productiva y así disminuir la contaminación por este patógeno.

Las metodologías oficiales como ISO, BAM-FDA, entre otras, recomiendan diferentes técnicas de cultivo, las cuales deben ser implementadas en los laboratorios oficiales de análisis de alimentos. Sin embargo, se pueden comparar las performances de estas metodologías, y en función de los resultados, es posible optar por la técnica que mejor se adapte a cada laboratorio, y sobre todo que sea la más eficiente.

En este trabajo se planteó como objetivo evaluar comparativamente la eficiencia de tres procedimientos diferentes para el aislamiento de *Campylobacter* spp. termotolerantes, a partir de homogenatos enriquecidos de acuerdo a la técnica BAM. Los resultados mostraron que la metodología de filtración con membrana y cultivo en agar Brucella con 5% de sangre de carnero resultó ser más eficiente para la detección de *Campylobacter* spp. en muestras de pollo parrillero contaminado experimentalmente, con respecto a las otras dos metodologías empleadas (agar selectivo para *Campylobacter* libre de sangre suplementado con antibióticos, Metodología oficial BAM-FDA; y agar cromogénico). Teniendo en cuenta que los volúmenes de caldo enriquecido sembrados en los tres casos fueron iguales, y por lo tanto las cantidades de células viables también fueron las mismas, estas diferencias ponen de manifiesto que los métodos de siembra y medios de cultivo influyeron de distinta manera en el crecimiento de los *Campylobacter* spp. termotolerantes. A partir de estos resultados se revisaron las composiciones de los medios de cultivo, para identificar diferencias que pudieran relacionarse con estos resultados. El medio de cultivo cromogénico posee en su composición sustancias selectivas, en su mayoría cualitativa y cuantitativamente desconocidas para los usuarios. Dichas sustancias inhiben la flora acompañante, aunque también podrían tener algún grado de toxicidad sobre los microorganismos que teóricamente pueden desarrollarse en esas

condiciones de cultivo. Este fenómeno también podría estar sucediendo en el medio selectivo de *Campylobacter* propuesto por la metodología oficial, que en su composición contiene una mezcla de antibióticos para inhibir la flora acompañante, la cual también podría afectar el crecimiento de algunas células de *Campylobacter* spp. Además, estos componentes podrían afectar de manera diferente a las células bacterianas posiblemente injuriadas durante las etapas pre-analíticas y analíticas.

El Codex Alimentarius plantea directrices para el control de *Campylobacter* en la cadena de producción de carne de pollo (CAC/GL 78-2011). Propone realizar monitoreos al azar o dirigidos, efectuando muestreo de heces de los pollos antes de su envío a la industria, en el caso de detectar positivos, se deben tomar acciones como, tratamiento por calor o congelación, muestreo de la cloaca para detectar *Campylobacter* en el momento de la entrega y muestreo del producto de venta para determinar las tendencias de contaminación luego de finalizar del proceso tecnológico.

El Código Alimentario Argentino, no contempla la búsqueda y/o detección de *Campylobacter* en productos alimenticios de origen cárnicos. Pero en su Artículo 6 bis (Capítulo 1) expresa: “.....queda terminantemente **prohibida** la tenencia, circulación y venta de alimentos y sus primeras materias, alterados, **contaminados**, adulterados, falsificados y/o falsamente rotulados bajo la pena de multa, prohibición de **venta** y comiso de la mercadería en infracción...” Y dentro de lo que se entiende por **alimentos contaminados** se encuadra la presencia de microorganismos que son riesgosos para la salud. Avalados por este artículo, los laboratorios de vigilancia alimentaria pueden realizar la búsqueda de este patógeno en la categoría de alimentos considerados de mayor riesgo de contenerlo.

Además de lo expuesto con anterioridad, la prevalencia de infecciones gastrointestinales por este patógeno, particularmente en pediatría, la colonización frecuente en carne de ave de consumo humano y la dificultad de evitar la contaminación en el momento de la faena para elaborar alimentos, sustentan la necesidad de estudiar la contaminación de alimentos con *Campylobacter* termotolerantes. En este trabajo se reporta por primera vez la

contaminación de alimentos derivados de pollo parrilleros que se elaboran y comercializan en la ciudad de Córdoba con *Campylobacter* spp.

Estos datos adquieren mayor relevancia si se considera que los aislamientos de *Campylobacter* spp. fueron realizados a partir de alimentos que recibieron manipulación, como por ejemplo cortes, triturados, condimentados, y agregados de otros ingredientes como huevo en su preparación. En relación a este último aspecto, sería objeto de otro estudio realizar la búsqueda de este patógeno en la cubierta externa de los huevos, debido a que puede ser el origen de la contaminación cruzada en los alimentos.

Los resultados de este estudio muestran una prevalencia de 69% de contaminación por este patógeno en pollos parrilleros comercializados en la ciudad de Córdoba; es decir aproximadamente que 2 de cada 3 pollos se encuentran contaminados con *Campylobacter* spp. Este dato, difiere a los datos obtenidos en un estudio publicado en Argentina en el año 2013 en el cual la prevalencia en carcasa de pollo fue el 83,8% (Zrun, y otros, 2013). En este último caso, la prevalencia fue determinada mediante métodos de biología molecular, considerablemente más sensible que las técnicas de microbiología clásica, lo que probablemente esté relacionado con el mayor porcentaje de contaminación observado.

Realizando una comparación de trabajos científicos en los que se estudió la presencia de este patógeno en carcasas de pollo, los datos obtenidos en este trabajo fueron superiores a los reportados en estudios realizados en países de América del Norte; como por ejemplo Canadá, donde esta bacteria se encontró en el 62 % de las muestras (Bohaychuk, y otros, 2006). En Europa, un trabajo realizado en España reportó el 49,5% de contaminación (Dominguez, Gomez, & Zumalacarregui, 2002). La situación en América del Sur es muy similar: 68,8 % en Brasil (Kuana, y otros, 2008) y en Chile entre el 54 – 90 % (Figueroa, Troncoso, López, Rivas, & Toro, 2009). Las diferencias y/o similitudes en los resultados podrían deberse a la diversidad en la colonización de *Campylobacter* spp. en las muestras estudiadas.

La presencia de este patógeno en muestras de alimentos elaboradas a partir de carne de ave, como milanesas, hamburguesas, entre otras, no se pudo comparar con otros estudios debido a que no hay reportes de su prevalencia. En dichas

preparaciones culinarias sería difícil poder determinar el origen de la contaminación, debido a que puede provenir de la carne de ave o el huevo utilizado en la elaboración de los rebozados.

Los resultados de esta tesis muestran que *Campylobacter* spp. también puede encontrarse en las menudencias de pollo; concretamente, estos microorganismos fueron aislados en el 80% de las muestras. Si bien el número de muestras analizadas fue inferior a las de pollo parrillero, encontrar a este microorganismo sugiere la posibilidad de que en el producto listo para su comercialización, las menudencias, pudo haberse contaminado desde la carcasa de pollo, y/o viceversa. La contaminación puede haberse producido durante la faena y acondicionamiento del producto. Por ejemplo, durante su preparación para la venta, menudencias, que no provienen de la misma carcasa son introducidas en el interior de los pollos antes de ser envasados, lo que podría causar la contaminación cruzada.

Conocer la prevalencia y difusión del patógeno sobre toda la cadena de producción alimentaria permite conocer aspectos epidemiológicos de la presencia y difusión de *Campylobacter* en la producción primaria de pollos y proponer estrategias efectivas para controlar su diseminación en los productos alimenticios.

6.2 Conclusiones

La membrana filtrante mostró ser un procedimiento de mayor sensibilidad para la detección de contaminación de alimentos con *Campylobacter* termotolerantes, en relación a la metodología BAM. En el método con membrana filtrante se utiliza un medio con sangre (agar Brucella), por lo que debería evaluarse para cada caso particular, la ecuación costo-beneficio (desde el punto de vista económico, y analítico) previo a su implementación.

En este trabajo se reporta por primera vez, la presencia de *Campylobacter* spp. en alimentos comercializados en diferentes puntos de la ciudad de Córdoba. Estos resultados ponen de manifiesto, además, la necesidad de mantener y reforzar las campañas que informen a la población sobre la importancia de la cocción adecuada de alimentos.

La detección de *Campylobacter* en carnes de aves y derivados comercializados en la ciudad de Córdoba puede muy probablemente estar relacionada con las

incidencias de diarreas por este patógeno. Estudios de biología molecular podrían aportar información muy valiosa en este sentido, permitiendo así conocer el riesgo que implica en la salud pública, a fin de que su monitoreo sirva de disparador para implementar acciones correctivas procurando disminuir su prevalencia en alimentos de consumo humano.

Los resultados de este trabajo sugieren la necesidad de volver a considerar incluir criterios microbiológicos de *Campylobacter* spp. en la legislación alimentaria, en los alimentos a base de carne de ave, lo que constituiría una herramienta de control importante para mejorar la seguridad alimentaria.

Anexos:

Características	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> Subsp. <i>doylei</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. fetus</i> Subsp. <i>fetus</i>	<i>C. hyointestinalis</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Crecimiento 25° C	-	-/+	-	-	+	D	-0
Crecimiento 35-37 ° C	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento 42° C	+	-/+	+	+	D	+	+
Reducción de nitrato	+	-	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	-
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+
Agar Mac Conkey	+	+	+	+	+	+	-
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+
Hidrolisis de hipurato	+	+	-	-	-	-	-
Resistencia a NAL	S ^d	S	S	R	R	R	S
Resistencia a CEF	R	R	R	R	S ^e	S	S

D: 11-89 %de las cepas son positivas, +: 90% o más de las cepas son positivas, -: 90% o más de las cepas son negativas, ^d: *C. jejuni* resistente a ácido nalidíxico han sido reportado, ^e: *C. fetus subesp fetus* resistente a cefalotina han sido reportado.

BIBLIOGRAFÍA

- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica [ANMAT]*. (s.f). Recuperado el 29 de 10 de 2017, de www.anmat.gov.ar/Alimentos/ETA.pdf
- ANMAT - Enfermedades Transmitidas por Alimentos*. (s.f.). Obtenido de www.anmat.gov.ar/Alimentos/ETA.pdf
- Bergey, D. H. (s.f.). *Bergey's mianual of determinative bacteriology 10 th edition*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Bohaychuk, V. M., Gensler, G. E., King, R. K., Mannien, K. I., Sorensen, O., Wu, J. T., . . . Mc Mullen, L. M. (2006). Occurrence of pathogens in raw and ready-to-eat meat and poultry products collected from the retail marketplace in Edmonton, Alberta, Canada. *Journal of Food Protection*(69), 2176-2182.
- Center Desease Control [CDC]*. (s.f.). Recuperado el 31 de marzo de 2020, de <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/foodborne-germs-es.html>
- Cervantes Garcia, E., & Cravioto, A. (2007). *Campylobacter y enfermedades asociadas*. 50(1).
- Codigo Alimentario Argentino*. (10 de 2019). Recuperado el 5 de 4 de 2020, de https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo_vi_carneosactualiz_2019-09.pdf
- Crushell, E., Harty, S., Sharif, F., & Bourke, B. (2004). Enteric *Campylobacter*: purging its secrets? *PEDIATRIC RESEARCH*, 54(3-12).
- De Zutter, L., & col. (2017). Comparison of four different selective media for the quantification of *Campylobacter* in poultry meat and rapid confirmation of suspect colonies. Recuperado el 20 de 4 de 2020, de http://www.chromagar.com/fichiers/1505394624Poster_CHRO_revised_2.pdf
- Dominguez, C., Gomez, I., & Zumalacarregui, J. (2002). Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken meat in Spain. *International Journal of Food Microbiology*, 165-8.
- Edmons, P., Patton, C. M., Griffin, P. M., Barrett, T. J., Schmid, G. P., Baker, C. N., . . . Brenner, D. J. (1987). *Campylobacter hyointestinalis* associated with human gastrointestinal disease in the United States. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 25(685-91), 685-691.
- Enfermedades transmitidas por alimentos [ETA] - Inocuidad de Alimentos - Control Sanitario - HACCP*. (s.f.). Recuperado el 31 de 3 de 2020, de https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10836:2015-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-eta&Itemid=41432&lang=en
- FAO/OMS, C. A.-N. (2011). Directrices para el control de *Campylobacter* y *Salmonella* en la carne de pollo.
- Fernandez, H. (2011). *Campylobacter y campylobacteriosis: una mirada desde América del Sur*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 28(1), 121-127.

- Figuerola, G., Troncoso, M., López, C., Rivas, P., & Toro, M. (2009). Occurrence and enumeration of *Campylobacter* spp. during the processing of Chilean broilers. *Bio Medical Central Microbiology*, 94.
- García, J. J., Abad, J. C., Serrano, T., Fias, N., Castro, M., & Lorente, S. (2013). *Epidemiología de Campylobacter en avicultura*. Recuperado el 4 de 4 de 2020, de Congreso Científico de Avicultura: http://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/fco_javier_garcia.pdf
- Godoy, P., Artigues, A., Nuin, C., Aramburu, J., Perez, M., Dominguez, A., & Salleras, L. (2002). Outbreak of gastroenteritis caused by *Campylobacter jejuni* transmitted through drinking water. *Medicina Clinica*, 119(18), 695-698.
- Gonzalez Ayala, S. E., & Cecchini, D. M. (2001). *Enteritis por campylobacter spp.* En *El control de las enfermedades transmisibles*. Recuperado el 1 de 4 de 2020, de <https://www.paho.org/arg/publicaciones/publicaciones%20virtuales/libroETAs/modulo2/modulo2e.html>
- Habib, I., De Zutter, L., & Uyttendaele, M. (2019). Eleven *Campylobacter* Species. *Food Microbiology*, quinta edición, 262-263.
- Hernandez Cortez, C., Aguilera Arreola, M. G., & Castro Escarpulli, G. (2013). *Campylobacter jejuni*: ¿una bacteria olvidada? Situación en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(2), 77-84.
- Huerta, V. G., Gonzalez, P. A., Contreras Funes, V. P., Varcudi, D., Dichiará, D. M., & Cortes, P. R. (2011). Etiología de la diarrea bacteriana aguda en pacientes pediátricos de la ciudad de Córdoba. *Revista on-line del Colegio de Bioquímicos de Córdoba*.
- Hunt, J. M., Abeyta, C., & Tran, T. (2000). *Campylobacter*. En *Bacteriological Analytical Manual*. Capítulo 7: BAM-FDA.
- Kaur, T., Singh, J., Huffman, M. A., Petrzekova, K. J., Taylor, N. S., Xu, S., . . . Fox, J. G. (2011). *Campylobacter troglodytis* sp. nov., isolated from feces of human habituated wild chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in Tanzania. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 77(2366-2373), 2366-2373.
- Kuana S, S. L. (2008). Occurrence and Characterization of *Campylobacter* in the Brazilian Production and Processing of Broilers. *Avian Disease*, 680-4.
- Lapierre, L. (2013). Factores de virulencia asociados a especies zoonóticas de *Campylobacter* spp. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 28, 25-31.
- Lopardo, H., Predari, S. C., & Vay, C. (s.f.). *MANUAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA DE LA ASOCIACIÓN ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA*. Recuperado el 31 de 03 de 2020, de www.aam.org.ar > BACILOS-GRAM-NEGATIVOS-EXIGENTES
- López C., A. A. (2003). Campilobacteriosis en una comunidad de bajos recursos de Buenos Aires, Argentina. 22(3).
- Lopez, C., Agostini, A., Giacoboni, G., Cornero, F., Tellechea, D., & Trinidad, J. J. (2003). Campilobacteriosis en una comunidad de bajos recursos de Buenos Aires, Argentina. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*, 22, 1013-1020.
- Lucero, C., & Turco, M. (s.f.). Diagnóstico Microbiológico de infección Diagnóstico Microbiológico de infección gastrointestinal por *Campylobacter* spp. *Revista Argentina de Microbiología*.
- Mathewson, J. J. (1983). Evaluation of filters for recovery of *Campylobacter jejuni* from water. 46(985-987).

- Ministerio de Salud - Manual de Manipulación de Alimentos - Provincia de Buenos Aires. (s.f.). Recuperado el 30 de 10 de 2017, de <http://www.ms.gba.gov.ar/sitios/institutobiologico/files/2017/03/Manual-de-Manipulaci%C3%B3n-de-Alimentos-web.pdf>
- Misawa, N., Kawashima, K., & Kondo, F. (2001). Epidemiological survey of *Campylobacter upsaliensis* carried by dogs and cats in the South-Kyushu Area of Japan. *Revista de la Asociación Veterinaria de Japón*, 54(707-711), 707-711.
- Moya Salazar, J., Pio Davila, L., Terán Vásquez, A., & Olivo López, J. (2016). Rendimiento diagnóstico del agar sangre con filtro versus agar karmali para el diagnóstico de *Campylobacter* en coprocultivo. *Horizonte Médico*, 16(3), 58-65.
- Nachamkin, I., Allos, B. M., & Ho, T. (1988). *Campylobacter* species and Guillain-Barré syndrome. 11(3).
- Nachamkin, I., Blaser, M. J., & Tompkins, L. S. (1992). *Campylobacter jejuni* Current Status and Future Trends. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Nario, F. e. (2014). Evaluación de técnicas de muestro para la detección de *Campylobacter* termófilos en pollos en planta de faena de la Provincia de Buenos Aires. Mendoza: Jornada sobre *Campylobacter* y *Escherichia coli* O157:H7 en carnes de aves y bovina. Su implicancia en la industria y la salud pública.
- OMS. (3 de 12 de 2015). *Centro de prensa*. Recuperado el 4 de 4 de 2020, de Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria: <https://apps.who.int/mediacentre/news/releases/2015/foodborne-disease-estimates/es/index.html>
- OMS. (23 de 1 de 2018). *Notas descriptivas: Campylobacter*. Recuperado el 1 de 4 de 2020, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura - *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico*. (s.f.). Recuperado el 25 de 10 de 2017, de <http://www.fao.org/3/a-i0480s.pdf>.
- Organización Mundial de la Salud - *Enfermedades de transmisión alimentaria*. (s.f.). Recuperado el 30 de 10 de 2017, de http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/es
- Platts Mills, J. A., & Kosek, M. (2015). Update on the burden of *Campylobacter* in developing countries. *Current Opinion in Infectious Disease*(4-6), 1-12.
- Rao, M. R., Nacify, A. B., Savarino, S. J., Abu Elyazedd, R., Wierzba, T. F., Peruski, L. F., . . . Clemens, J. D. (2001). Pathogenicity and convalescent excretion of *Campylobacter* in rural Egyptian children. *American Journal of Epidemiology*, 154(2), 166-173.
- Rodriguez Gutierrez, V., Guzman Osorio, L., & Verjan Garcia, N. (2015). *Campylobacter* spp. en productos aviares y su impacto en salud pública. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 10(2), 203-2013.
- Rossi, M., Hänninen, M. L., Revez, J., Hannula, M., & Zanoni, R. G. (2008). Occurrence and species level diagnostics of *Campylobacter* spp., enteric *Helicobacter* spp. and *Anaerobiospirillum* spp. in healthy and diarrheic dogs and cats. *Microbiology Veterinary*, 129(301-314).
- SENASA, S. N. (2016). *Parámetros microbiológicos para las carnes de aves, huevos, ovoproductos, especies menores y productos de la caza*. Boletín Oficial.
- Soto Beltran, M., Quiñones, B., Ibarra Rodriguez, A., & Amézquita López, B. A. (2020). Uso de filtración por membrana para la recuperación de *Campylobacter*

- de muestras de pollo crudo provenientes de supermercados locales en Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Bio Ciencias*, 7, 1-14.
- TAMBORINI, A. L., Casabona, L. M., Viñas, M. R., Asato, V., Hoffer, A., Farace, M. I., . . . Pichel, M. (2012). *Campylobacter* spp.: prevalencia y caracterización feno-genotípica de aislamientos de pacientes con diarrea y de sus mascotas en la provincia de La Pampa, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 44(266-271), 266-271.
- Vidal Delgado, C. B., Romero, D. E., Arbelo, D. C., & Jacome, O. J. (2015). Prevalencia de enteropatógenos en gastroenteritis aguda de pacientes del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad - Córdoba Argentina. *Revista on-line del Colegio de Bioquímicos de Córdoba*.
- Zanoni, R. G., Debruyne, L., Rossi, M., Revez, J., & Vandamme, P. (2009). *Campylobacter cuniculorum* sp. nov., from rabbits. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(1666-1671), 1666-1671.
- Zbrun, M. V., Romero-Scharpen, A., & Olivero, C. e. (2013). Occurrence of thermotolerant *Campylobacter* spp. at different stages of the poultry meat supply chain in Argentina. *New Zealand Veterinary Journal*, 61(6), 337-343.