



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Evaluación de *Campylobacter* spp. en carne y vísceras de cerdo y pollo por diferentes métodos microbiológicos y moleculares.

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE
LA SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

ALUMNO: RAMÓN VALENZUELA PÉREZ

TUTORA ACADÉMICA: ROSA M^a MONTES ESTELLÉS
COTUTORA: ANA GONZÁLEZ PELLICER

Curso Académico: 2018-2019

VALENCIA, SEPTIEMBRE DEL 2019

EVALUACIÓN DE *Campylobacter* spp. EN CARNE Y VÍSCERAS DE CERDO Y POLLO POR DIFERENTES MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS Y MOLECULARES.

Ramón Valenzuela Pérez, Ana González Pellicer y Rosa M^a Montes Estellés

RESUMEN

El análisis microbiológico de *Campylobacter* spp. en alimentos es una técnica complicada, tanto por las necesidades de microaerofilia, como por la dificultad del aislamiento de estas bacterias en los medios de cultivo, debido a la gran cantidad de microbiota que puede crecer en este tipo de análisis, por ello analizamos las muestras tanto por métodos clásicos de detección por cultivo como por técnicas moleculares. Con el objetivo de comparar las técnicas clásicas y moleculares de diagnóstico *Campylobacter* spp. se realizó el análisis de microbiología clásico utilizando el método descrito por la Norma internacional UNE-EN-ISO 10272-1: 2018, en la que se analizó la presencia o ausencia de campylobacterias termotolerantes Posteriormente se realizó la detección directa a partir del caldo de enriquecimiento mediante PCR múltiple, sin necesidad de aislar la bacteria. Se analizaron un total de 40 muestras de cerdo y 20 muestras de pollo, procedentes de diferentes puntos de venta y distribución de la ciudad de Valencia (España). En muestras de cerdo, *Campylobacter* spp. pudo detectarse únicamente en tres de las muestras por PCR directa (3/40) y sólo una de ellas dio positiva por cultivo. En las muestras de pollo, se obtuvieron porcentajes de detección mucho mayores, 14 de las 20 muestras fueron positivas por PCR (14/20). Sin embargo, sólo 2 de ellas resultaron positivas por cultivo en placa. Los resultados muestran elevados porcentajes de contaminación en muestras de pollo y la importancia de la utilización de las técnicas moleculares, dada su mayor sensibilidad, en la detección de *Campylobacter* spp. Esto genera la necesidad de difundir el uso de las técnicas moleculares en la industria agroalimentaria.

Palabras clave: *Campylobacter* spp., cerdo, pollo, PCR múltiple, microaerofilia.

ABSTRACT

The microbiological analysis of *Campylobacter* spp. in food it is a complicated technique, both for the needs of microaerophilia, and for the difficulty of isolating these bacteria in the culture media, due to the large amount of microbiota that can grow in this type of analysis, so we analyze the samples both by classical methods of detection by culture and by molecular techniques. In order to compare the classic and molecular diagnostic techniques *Campylobacter* spp. The classic microbiology analysis was performed using

the method described by the International Standard UNE-EN-ISO 10272-1: 2018, in which the presence or absence of thermotolerant campylobacteria was analyzed. Subsequently, the direct detection was made from the enrichment broth by multiplex PCR, without the need to isolate the bacteria. A total of 40 pig samples and 20 chicken samples, from different points of sale and distribution in the city of Valencia (Spain), were analyzed. In pig samples, *Campylobacter* spp. it could only be detected in three of the samples by direct PCR (3/40) and only one of them was positive per culture. In chicken samples, much higher detection percentages were obtained, 14 of the 20 samples were positive by PCR (14/20). However, only 2 of them were positive per plate culture. The results show high percentages of contamination in chicken samples and the importance of the use of molecular techniques, given their greater sensitivity, in the detection of *Campylobacter* spp. This generates the need to spread the use of molecular techniques in the industry. agri-food

Keywords: *Campylobacter* spp, pig, chicken, PCR multiplex, microaerophilia.

RESUM

L'anàlisi microbiològica de *Campylobacter* spp. en aliments és una tècnica complicada, tant per les necessitats de microaerofília, com per la dificultat de l'aïllament d'aquests bacteris en els mitjans de cultiu, a causa de la gran quantitat de microbiota que pot créixer en aquest tipus d'anàlisi, per això analitzem les mostres tant per mètodes clàssics de detecció per cultiu com per tècniques moleculars. Amb l'objectiu de comparar les tècniques clàssiques i moleculars de diagnòstic *Campylobacter* spp. es va realitzar l'anàlisi de microbiologia clàssic utilitzant el mètode descrit per la Norma internacional UNE-EN-ISO 10272-1: 2018, en la qual es va analitzar la presència o absència de campylobacterias termotolerantes. Posteriorment es va realitzar la detecció directa a partir del caldo d'enriquiment mitjançant PCR múltiplex, sense necessitat d'aïllar el bacteri. Es van analitzar un total de 40 mostres de porc i 20 mostres de pollastre, procedents de diferents punts de venda i distribució de la ciutat de València (Espanya). En mostres de porc, *Campylobacter* spp. va poder detectar-se únicament en tres de les mostres per PCR directa (3/40) i només una d'elles va donar positiva per cultiu. En les mostres de pollastre, es van obtenir percentatges de detecció molt majors, 14 de les 20 mostres van ser positives per PCR (14/20). No obstant això, només 2 d'elles van resultar positives per cultiu en placa. Els resultats mostren elevats percentatges de contaminació en mostres de pollastre i la importància de la utilització de les tècniques moleculars, donada la seua major sensibilitat, en la detecció de *Campylobacter* spp. Això genera la necessitat de difondre l'ús de les tècniques moleculars en la indústria agroalimentària.

Paraulesclau: *Campylobacter* spp, porc, pollastre, PCR multiplex, microaerofília.

INTRODUCCION

Seguridad Agroalimentaria

Los riesgos microbiológicos y las enfermedades de transmisión alimentaria son un problema de salud pública cada vez mayor (Rincón et al., 2011) En algunos países se han registrado durante las últimas décadas aumentos significativos de la incidencia de enfermedades provocadas por microorganismos transmitidos principalmente por agua y alimentos. Existe una preocupación creciente por los riesgos para la salud que plantean los patógenos microbianos en los alimentos (OMS, 2002, 2015).

En la alimentación humana se encuentra la carne como base, gracias a su alto valor nutritivo proporcionado principalmente por su gran riqueza en proteína, es por eso que la industria cárnica es de las más importantes en el sector alimentario (OMS, 2015). Sin embargo, la carne es un alimento perecedero debido a sus características de composición, pH y actividad de agua, constituyendo un medio idóneo para el crecimiento de microorganismos (Pascual, 2000).

Los alimentos de origen animal están sometidos a contaminación microbiana procedente de diversas fuentes. Los propios animales influyen de forma importante en la presencia de gérmenes, tanto patógenos como causantes de la alteración del producto (Adams & Moss, 1995; OIE, 2004). La contaminación posterior puede proceder del agua usada, de las instalaciones y del equipo que se emplea para la preparación del producto, así como de los operarios que manipulan los alimentos (Christian et al., 2001). Es necesario conocer las fuentes probables de contaminación y los medios para su difusión de forma que la contaminación se reduzca al mínimo y sean eliminados los gérmenes patógenos en la medida de lo posible (CFSPH, 2005). La contaminación fecal en los animales de sangre caliente es una fuente probable de gérmenes patógenos humanos (Berradre-Sáenz et al., 2017), entre ellos destacan *Salmonella*, *Campylobacter* y *Escherichia coli* enterotoxigenico. También puede demostrarse que es una fuente importante de *Listeria monocytogenes* (Christian et al., 2001).

Vías de contaminación microbiológica en la carne

En un animal recién sacrificado encontramos una microbiota muy escasa en la profundidad del músculo (1 microorganismo/gramo aproximadamente) procedente generalmente del intestino, siendo transportada al músculo por la sangre (Pascual, 2000). En la parte superficial de la carne encontramos mayor contaminación microbiana, especialmente en la canal, ya que se trata de la parte de la carne expuesta al ambiente del matadero y depende, en gran medida, de las condiciones higiénicas de manipulación (Adams and Moss, 1995).



Después de la contaminación debida al sacrificio, ésta continúa en los procesos de desuello, evisceración y despiece, dada la gran facilidad de contaminación por microorganismos procedentes del intestino, suelo, ambiente o personas que manipulan las canales o piezas de carne (Christian et al., 2001). Debido a la refrigeración de la carne, puede aparecer contaminación cruzada con otros productos o carnes, además de la contaminación causada por el crecimiento de microorganismos psicrófilos (Zumbano, Arevalo, Donado, and Romero, 2014). Esta contaminación podrá agravarse en el transporte de las canales o piezas de carne a los lugares de venta y en su posterior almacenamiento, si no tenemos las condiciones higiénicas adecuadas. (Adams and Moss, 1995; Christian et al., 2001; Elika, 2006; Gutierrez, et al 2017; Signorini, 2007).

La contaminación microbiana que habitualmente se encuentra en carne pertenece a los géneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Leuconostoc*, *Flavobacterium*, *Proteus*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Chromobacterium*, *Streptomyces*, levaduras (*Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*), mohos (*Sporotricum*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Geotricum*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Monilia*, *Aspergillus*, *Thamnidium*) (CFSPH, 2005; Elika, 2006; Lapiere, 2012; Pascual, 2000) y microorganismos que provocan enfermedades como salmonelosis (*Salmonella*), brucelosis (*Brucella*), carbunco (*Bacillus anthracis*) o tularemia (*Pasteurella tularensis*) (Humphrey and Jørgensen, 2006).

***Campylobacter* spp.**

El género *Campylobacter* comprende 23 especies y este número se va incrementando debido a la identificación de nuevas especies. La mayoría de las infecciones humanas son ocasionadas por *C. jejuni* (80%) y, en menor grado, por *C. coli* (10%). *C. jejuni* incluye dos subespecies (*C. jejuni* subespecie *jejuni* y *C. jejuni* subsp. *doylei*) (Gañan, 2009). La enfermedad en el hombre se presenta en forma de casos esporádicos, siendo menos frecuente la existencia de brotes. Otras especies como *C. upsaliensis*, *C. lari* y *C. fetus* también se han asociado con diarrea en el hombre (Farre et al., 2012)

Las campilobacterias se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, se reconoce como reservorio natural a una gran variedad de animales tanto domésticos como de vida silvestre, tales como ganado vacuno, cerdos, ovejas, aves de corral, cabras, perros, gatos y roedores, entre otros (ACHIPIA, 2017; Banowary et al., 2015; Humphrey and Jørgensen, 2006; Turco, et al. 2014).

Las aves de consumo y sus subproductos constituyen uno de los principales reservorios y fuente de infección humana. Las campilobacterias fueron reconocidas por primera vez en 1970 como patógeno de humanos. En 1886 Escherich publicó una serie de artículos en el Munchener Medizinische

Wochenschrift donde describió un microorganismo en forma de espiral que aisló del colon de niños que habían fallecido, y a la que denominó como “*Cholera infantum*”. También observó al microorganismo en el excremento de infantes que sufrían de enteritis (Cervantes and Cravioto, 2007).

CARACTERÍSTICAS DE *CAMPYLOBACTER* SPP.

Campylobacter es un microorganismo Gram negativo, incluido en el orden *Campylobacterales*, familia *Campylobacteraceae*, género *Campylobacter*. Se trata de bacterias de pequeño tamaño (0,2-0,8 μm de grosor y 0,5-5 μm de longitud). Generalmente son oxidasa positivas, a excepción de *C. gracilis* (Wang et al., 2018). Tienen forma de “S” o espiral en fase de crecimiento logarítmico, pero pueden adquirir forma cocoide en cultivos prolongados o cuando están expuestos a altas concentraciones de oxígeno, con un movimiento rápido y característico en forma de sacacorchos gracias a la presencia de un flagelo, el cual puede aparecer en uno o ambos extremos (Elika, 2006). Existen algunas excepciones como algunas cepas inmóviles de las especies *C. gracilis* y *C. hominis* o con múltiples flagelos como miembros de la especie *C. showae* (Ruiz, 2015).

FACTORES DE CRECIMIENTO DE *CAMPYLOBACTER* SPP.

El crecimiento y supervivencia de *Campylobacter* spp. depende de una serie de factores. Estos organismos son sensibles a las condiciones físicas del medio externo (actividad de agua, calor, radiación UV y sal) y no se multiplican fuera de los hospederos de sangre caliente (Cervantes and Cravioto, 2007). El rango óptimo de temperatura de crecimiento está entre los 37°C y 42°C. Algunas especies de *Campylobacter* son termofílicas, no crecen bajo los 30°C, por lo que no crecerían en alimentos mantenidos a temperatura ambiente 20-25°C (Zumbano et al., 2014). A pesar de que *Campylobacter* spp no es capaz de crecer a temperaturas bajo los 30°C, bajo ciertas condiciones de humedad, sí sobrevive a temperaturas de refrigeración 4°C (Gutierrez et al., 2017).

Los *Campylobacter* termofílicos, *C. jejuni* y *C. coli*, son las principales causas de las enfermedades transmitida por los alimentos en los seres humanos (Zumbano et al., 2014). Las gastroenteritis bacterianas en todo el mundo son de gran importancia para la salud pública. *Campylobacter* spp. ha sido identificada como la mayor fuente de intoxicación alimentaria en los Estados Unidos (Wei et al., 2016) Europa y Australia (Orihuel et al., 2015). La prevalencia de *Campylobacter* spp. se ha estudiado en varios animales de granja, incluidos vacas, ovejas, cerdos y pollos. Sin embargo, la exposición a alimentos contaminados de aves de corral se ha considerado que el origen es el principal factor de riesgo para la infección por *Campylobacter* spp. en humanos (Banowary et al., 2015).

Los patógenos pertenecientes al género *Campylobacter* han sido de difícil cultivo, con requerimientos de crecimiento y procedimientos de identificación problemáticos (Cervantes and Cravioto, 2007). Como consecuencia, se requieren procedimientos de detección rápidos y fiables (Zumbano et al., 2014) por lo que, métodos basados en la tecnología de sondas de ADN se han desarrollado para estos organismos, sin embargo, en ocasiones presentan una baja sensibilidad en productos alimenticios (Wang et al., 2018).

Métodos moleculares de detección de *Campylobacter*

Las técnicas moleculares están basadas en el análisis del ADN genómico bacteriano, por eso son especialmente interesantes en la detección e identificación de microorganismos muy sensibles a las condiciones ambientales o de difícil cultivo (Vílchez and Alonso, 2009; Zumbano et al., 2014). En estos casos el procedimiento de aislamiento convencional es largo y tedioso, y en ocasiones pueden proporcionar falsos negativos, debido a que los microorganismos mueren durante el proceso, o no existen técnicas lo suficientemente sensibles para su detección (Wang et al., 2018).

La existencia de sus ácidos nucleicos en la muestra puede evitar la necesidad del cultivo, haciendo mucho más rápido y sensible el método de detección (Denis et al., 1999). Estas técnicas no dependen de la expresión fenotípica, por lo que los resultados obtenidos son consistentes y reproducibles (Langen et al., 2010). Como presentan una gran sensibilidad a variaciones mínimas en las secuencias de nucleótidos, constituyen métodos precisos de identificación de especies y de caracterización de cepas diferentes, pero filogenéticamente muy próximos (Bolívar, et al., 2014). Entre las técnicas moleculares existentes, la más utilizada es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). (Bolívar et al., 2014; Vílchez and Alonso, 2009; Zumbano et al., 2014).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es la principal herramienta diagnóstica que ha aprovechado las bondades de la biología molecular hasta el punto de alcanzar gran valor y versatilidad como técnica de análisis debido en parte, a su adaptabilidad y aplicabilidad (Wang et al., 2018). Los inicios de la PCR se remontan a 1971, cuando en un artículo publicado por Kleppe y colaboradores citado por Ricke et al. (2019), se describió por vez primera un método que usaba enzimas para replicar una secuencia pequeña de ADN in vitro.

La técnica de la PCR significó una valiosa alternativa para el estudio de los genes y a partir de entonces su uso se ha extendido a nivel mundial (Bolívar et al., 2014). De tal modo que en el presente, la PCR ha sido ensayada con buenos resultados en una amplia gama de campos que abarcan desde la

detección de agentes etiológicos, pasando por genotipificación, análisis de enfermedades genéticas y oncológicas (Rodríguez and Barrera, 2014), amplificación y modificación de fragmentos de ADN, análisis de especímenes ambientales y de marcadores genéticos para aplicaciones forenses, pruebas de paternidad, mapeo de rasgos hereditarios hasta estudios de expresión del gen (Bolívar et al., 2014; Denis et al., 1999; Persson and Olsen, 2005).

El hecho de estandarizar y optimizar aplicaciones individuales de la PCR ha permitido desarrollar variantes del método (Rodríguez and Barrera, 2014). En este aspecto, es de gran interés, el desarrollo de las denominadas PCR múltiples (multiplex-PCR o mPCR), técnica que consigue amplificar simultáneamente en una única reacción, diferentes secuencias diana (Bolívar et al., 2014; Denis et al., 1999).

Epidemiología de la campilobacteriosis

La enteritis por *Campylobacter* spp. es ahora una enfermedad bien reconocida, sin embargo, en la mayoría de las infecciones esporádicas, la fuente y el modo de transmisión no están claros, aunque se cree que los alimentos son un vehículo común (Denis et al., 1999). La campilobacteriosis causa enfermedades gastrointestinales caracterizadas por diarrea que a menudo es sanguinolenta, calambres abdominales, fiebre y vómitos. La campilobacteriosis generalmente es autolimitante, pero en casos raros se ha demostrado que desencadena el síndrome de Guillain-Barré, una enfermedad autoinmune del sistema nervioso periférico que puede causar parálisis. (Al Amri, et al., 2007; Humphrey and Jørgensen, 2006).

La campilobacteriosis es la zoonosis con mayor número de casos declarados en la Unión Europea (UE), con tendencia ascendente desde 2008, y una tasa de notificación de 71 y 82,3 casos por 100.000 habitantes en la UE y España, respectivamente, durante 2014. En Estados Unidos (EEUU), La tasa de incidencia por 100.000 habitantes se situaba en 13,45 en 2014 (Berradre-sáenz et al., 2017).

La importancia de la puesta en marcha de estudios que involucren la biología molecular y pruebas diagnósticas moleculares es una necesidad mundial por la especificidad, la sensibilidad y confianza que tienen estas pruebas. Es por eso que este tipo de estudios, donde se hace uso de pruebas diagnósticas tradicionales y moleculares ponen en evidencia los resultados y la eficiencia de una sobre la otra.

MATERIALES Y METODOS

Origen y toma de muestras

Se analizaron un total de 40 muestras de carne de espinazo e hígado de cerdo y 20 muestras de carne de pollo (pechuga, carcasa, molleja y hígado). Las muestras fueron adquiridas entre los meses de abril y julio de 2019 en pequeñas carnicerías de la ciudad de Valencia (España). Las muestras fueron compradas entre 9:00 y 9:30 horas de la mañana del mismo día en los que los análisis fueron realizados. Las muestras fueron transportadas en una nevera de icopor con hielo, siendo refrigeradas a 4°C hasta su análisis en el laboratorio de Microbiología de Alimentos del departamento de Biotecnología de la Universitat Politècnica de València.

Procesamiento y análisis de la muestra por Método horizontal para *Campylobacter* spp (Norma UNE-EN-ISO 10272-1, 2018) (ANEXO 1)

Para los análisis se tomaron aseptícamente en el laboratorio 10 g de muestra en una bolsa estéril de Stomacher, se añadieron 90 ml de caldo Preston enriquecido (Oxoid CM0067 Nutrient Broth N^o.2) y suplementado con un 5% v/v de sangre lisada de caballo (Oxiod SR024E). Las muestras se homogeneizaron en un homogenizador de paletas durante 5 minutos y posteriormente se incubaron a 37°C±1°C durante 4 a 6 horas. Posteriormente, se incrementó la temperatura de incubación a 42 ±1°C durante 48 horas, en una atmosfera de microaerofilia (10% O₂, 5% CO₂ y 85% N₂), utilizando sobres generadores Campygen™ 3.5L (Oxoid CN0035).

Transcurrido el periodo de incubación, para la detección directa de *Campylobacter* spp. a partir de las muestras mediante técnicas moleculares, se tomaron tres alícuotas de 1,5 ml del caldo enriquecimiento. Por otro lado, se tomaron con un asa estéril 10 µl de muestra y se depositaron en dos medios de cultivos selectivos para *Campylobacter* spp. y se sembraron mediante la técnica de triple estría en la superficie del agar. Los medios utilizados fueron: Agar *Campylobacter* Blood-Free Selective Agar Base (Modified CCDA-Preston, Oxoid CM0739) y suplementado con CCDA (CCDA Selective Supplement, Oxoid SR 0155E), y Agar Columbia enriquecido con sangre de caballo (Blood Agar Base Columbia, Scharlau 01-034-500 con sangre lacada de caballo Scharlau 000SR0048C). Las placas se incubaron a 42°C±1°C durante 48 horas en condiciones microaerofilia. Una vez transcurrido el periodo de incubación se observaron las colonias características (**FIGURA 1-2**) y fueron identificadas morfológicamente por tinción de Gram. Las colonias aisladas fueron finalmente identificadas mediante PCR.



FIGURA 1: Aislamiento *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter laridis* con *Campylobacter* blood-free selective agar base.

(<https://www.fishersci.se/shop/products/oxid-campylobacter-blood-free-selective-agar-base/10699744>)

Las cepas de *Campylobacter jejuni* producen colonias planas grises y húmedas. Algunas cepas pueden tener un tono verde o una apariencia seca, con o sin brillo metálico.

Las cepas de *Campylobacter coli* tienden a ser de color gris cremoso, húmedas, ligeramente elevadas y a menudo producen colonias discretas.



FIGURA 2: Aislamiento *Campylobacter jejuni*, en Blood Agar Columbia,

Campylobacter jejuni colonias pequeñas, elevadas, marrón grisáceo, liso y brillante.

Detección de *Campylobacter* spp. mediante métodos moleculares

EXTRACCIÓN DE ADN

Para la realización de la extracción de ADN se utilizó el kit GenElute™ Bacterial Genomic (Sigma- Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante para microorganismos Gram negativos. Se realizó la extracción de ADN de *Campylobacter* spp a partir de muestras recogidas a las 48 horas, a partir del caldo de enriquecimiento incubado a $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en microaerofilia.

La extracción de ADN de las colonias aisladas se realizó a partir de una suspensión de las mismas en 1ml de tampón TE .(ANEXO 2)

DETECCIÓN DE *Campylobacter* spp.

Para la detección e identificación de *Campylobacter* spp. utilizaron los iniciadores específicos descritos por Persson and Olsen (2005), que amplifican un fragmento de 500 pb de ADN cromosómico para *C. coli*, Asp-F y Asp-R y para *C. jejuni* de 344 pb, hipO-F hipO-R, cuya secuencia se especifica a continuación, en esta PCR múltiplex se añade un control positivo interno de la reacción de PCR con los iniciadores para 16S que amplificaran un fragmento de 1062 pb en presencia de bacterias.(TABLA 1)

TABLA1: Iniciadores para la PCR múltiplex de *Campylobacter* spp.

| Primer | Secuencia | pb | Bacteria |
|--------|------------------------------------|------|------------------|
| hipO-F | (5'-GACTTCGTGCAGATATGGATGCTT- 3') | 344 | <i>C. jejuni</i> |
| hipO-R | (5'-GCTATAACTATCCGAAGAAGCCATCA-3') | | |
| Asp-F | (5'-TTCAAGGTAATTTAGATATG-3') | 500 | <i>C. coli</i> |
| Asp-R | (5'-ATTTTATTATTTGTAGCAGCG-3') | | |
| 16S-F | (5'-GGAGGCAGCAGTAGGGAATA-3') | 1062 | Control interno |
| 16S-R | (5'-TGACGGGCGGTGAGTACAAG-3') | | |

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 μl , conteniendo 20 μl de mezcla y 5 μl de ADN molde. En la reacción se incluyó un control negativo donde el ADN se reemplazó por agua estéril, y como controles positivos se utilizaron cepas de referencia de *C. coli* y *C. jejuni*. Las concentraciones de los reactivos utilizados en la PCR se describen en la TABLA 2.

TABLA 2: Reactivos para la PCR de *Campylobacter* spp.

| Reactivos | Concentración final |
|--|---------------------|
| Tampón Buffer | 1x |
| Desoxirribonucleótido trifosfato (dNTPs) | 0,20 mM/cada |
| Cloruro de Magnesio (MgCl ₂) | 2,60 mM/cada |
| Iniciadores | |
| Hippuricasa (hipO F, <i>C. jejuni</i>) | 0.40µM/cada |
| Hippuricasa (hipO R, <i>C. jejuni</i>) | 0.40µM/cada |
| Aspartocinasa (Asp F, <i>C. coli</i>) | 0,20µM/cada |
| Aspartocinasa (Asp R <i>C. coli</i>) | 0,20µM/cada |
| 16S rDNA universal (16 s F) | 0,05µM/cada |
| 16S rDNA universal (16 S R) | 0,05µM/cada |
| Taq-DNA polimerasa | 0,5U |

El proceso de amplificación se realizó en un termociclador modelo Eppendorf, según los ciclos, condiciones de temperatura y tiempo descritos en la (TABLA 3).

TABLA 3: Condiciones de la PCR para la amplificación.

| Ciclos | Temperatura | Tiempo | Reacción |
|--------|-------------|--------|-------------------|
| 1 | 94 ° C | 6 min | Desnaturalización |
| 35 | 94 ° C | 50 s | Desnaturalización |
| | 57 ° C | 40 s | Unión iniciadores |
| | 72 ° C | 50 s | Extensión |
| 1 | 72 ° C | 3 min | Extensión final |

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (Agarosa D1 Low EEO, Conda) en 100 ml de tampón TAE (Tris-fosfato-EDTA) con Red Safe al 5%. Los geles se dejaron correr en cubeta de electroforesis a 90 V durante una hora aproximadamente y se visualizaron mediante un transiluminador Vilber Lourmat (09 200272) con luz UV. El tamaño molecular de los amplicones fue confirmado mediante comparación con el Marcador molecular GeneRuler 100-bp DNA Ladder Plus (Molecular biology thermo scientific).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de *Campylobacter* spp. en carne y vísceras de cerdo

DETECCIÓN DE *Campylobacter* spp. SEGÚN NORMA UNE-EN-ISO 10272-1:2018.

En el cultivo microbiológico solo 1 de 40, de las muestras se pudo identificar como positiva (2.5%), ya que las placas presentaban mucha contaminación acompañante y las colonias de *Campylobacter* son pequeñas y transparentes por lo que quedan enmascaradas con el resto de crecimiento.

La muestra se confirmó mediante tinción GRAM y posteriormente se realizó la identificación por PCR multiplex identificándose como *Campylobacter jejuni*. (**FIGURA 3**)

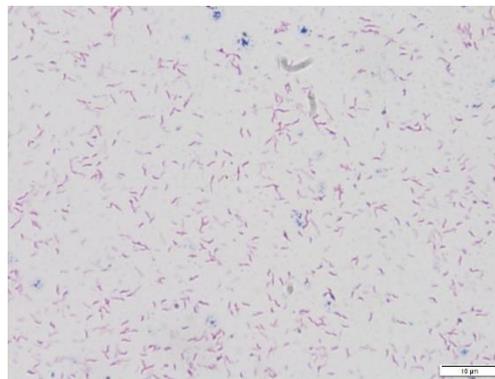


FIGURA 3: Microfotografía de tinción GRAM de *Campylobacter jejuni* (100x)

Los resultados obtenidos con el método de cultivo clásico, muestran una baja incidencia de *Campylobacter* en carne de cerdo, esto coincide con el estudio de Mooret and Madden (1998) con un 6% de positivos para 400 muestras analizadas. En nuestro estudio obtuvimos solo una muestra positiva que representaría el 2.5% en 40 muestras, un positivo es un resultado aleatorio pero demuestra el bajo nivel de contaminación de *Campylobacter* en carne de cerdo. Con lo que el análisis microbiológico tiene poca sensibilidad en este tipo de muestras.

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *Campylobacter* spp. POR PCR MÚLTIPLEX

Se realizó la extracción de DNA y PCR múltiplex a los caldos de enriquecimiento después de una incubación de 48 horas, en este caso, de los 40 caldos analizados sólo 3 dieron positivo para la detección de *Campylobacter* spp. (**FIGURA 4**).

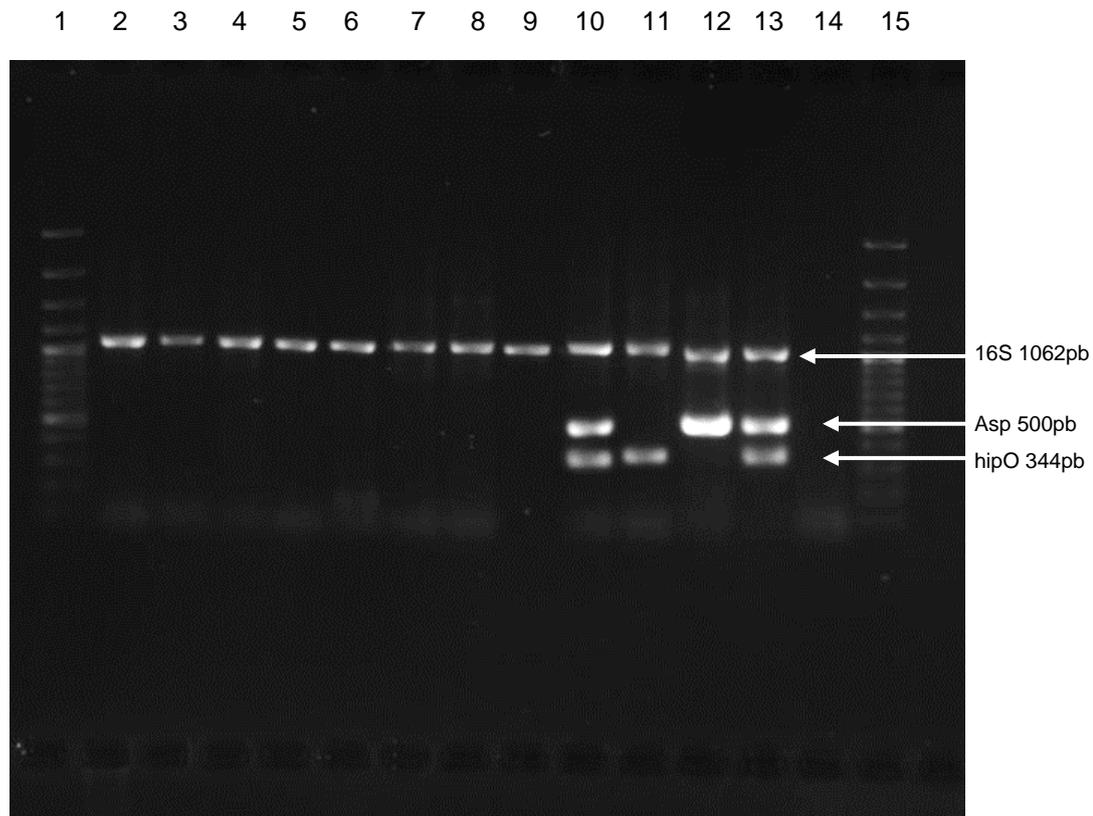


FIGURA 4: PCR múltiplex para la detección de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. 1 y 15: marcador de pesos molecular 100 pb, 2-9: muestras negativas, 10: muestra positiva para *C. jejuni* y *C. coli*, 11: muestra positiva para *C. jejuni*, 12: muestra positiva para *C. coli*, 13: control positivo de la PCR múltiplex, 14: control negativo.

El diagnóstico por PCR dio positivo en 3 de las 40 muestras analizadas, esto resalta la sensibilidad de las pruebas moleculares, dando ventajas respecto al diagnóstico en muestras donde por una u otra razón en las condiciones de cultivo no se logra el aislamiento del patógeno.

La muestra que dio positiva por cultivo en placa para *Campylobacter jejuni*, analizada mediante PCR dio positivo para *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, lo que nos demuestra que además de ser más sensible la técnica molecular nos permite detectar la presencia de las dos especies estudiadas en el caldo, mientras que en el cultivo sólo hemos podido aislar una de las especies.

La incidencia experimental de *Campylobacter* spp por PCR obtenida en carne y vísceras de cerdo encontradas en publicaciones presenta una incidencia baja incluso con un número de muestras elevado, así por ejemplo en Alemania en un estudio de 1500 muestras dieron positivas 147, lo que representa un 9.8%, en Francia, 2 muestras positivas de 127, es decir, un

1.6% (Trimoulinard et al., 2017) y en Estados Unidos con un 2% de muestras positivas, 2 de un total de 100 muestras analizadas (Noormohamed and Fakhr, 2013). En nuestro caso el porcentaje de muestra positivas fue de 7.5%, resultados que muestran similitud con los estudios antes dichos, teniendo en cuenta el tamaño de muestra de los estudios ya realizadas y sabiendo que en nuestro estudio sólo se analizaron 40 muestras.

La variabilidad observada en los distintos resultados antes mencionados se debe posiblemente al tamaño de la muestra en cada estudio, la metodología, condiciones de manejo y procesamiento de las muestras (Ricke, et al, 2019) y finalmente la epidemiología de la campilobacteriosis en la zona de cada estudio (Langen et al., 2010).

En general la prevalencia de campilobacterias en carne y vísceras de cerdo es baja, mas no por esto se le debe quitar importancia sanitaria y epidemiológica debido a las repercusiones a la salud humana (Berradre-sáenz et al., 2017). También en relación a la utilización paralela de técnicas clásicas microbiológicas y moleculares en el presente estudio se demostró mayor sensibilidad y eficiencia de esta última en el diagnóstico de la campilobacterias

Detección de *Campylobacter* spp. en carne de pollo (Pechuga, carcasa, molleja y hígado)

DETECCIÓN DE *Campylobacter* spp. SEGÚN NORMA UNE-EN-ISO 10272-1:2018.

En el cultivo microbiológico clásico solo en 2 de las 20 muestras se pudo identificar un cultivo positivo de *Campylobacter* spp., lo que representa un 10%. En el cultivo en placa encontramos el inconveniente de que las placas tienen un alto nivel de contaminación por flora acompañante que no permite distinguir las colonias de *Campylobacter* spp. si estas existieran, por lo que el aislamiento resulta muy difícil en el cultivo convencional. **(FIGURA 5)**



FIGURA 5: Cultivo en masa de *Campylobacter* spp. en Blood Agar Columbia.



Por tanto, podemos decir que, en el método clásico, la frecuencia de detección de *Campylobacter* es baja en las distintas muestras analizadas por cultivo microbiológico. En estudios realizados en Perú hubo una incidencia del 43.4% en 90 muestras analizadas (Lucas and Vilca, 2013), y en Canadá se registró una incidencia del 23.5% en 204 muestras (Narvaez-bravo et al., 2017), frente al 10 % de nuestro estudio. Son varios los factores que pueden afectar a las diferencias en nuestros resultados y los obtenidos en estos estudios. Estas diferencias pueden deberse a diferentes regiones geográficas de estudio, epidemiología de zona, métodos de cultivos, tamaño de la muestra y distintas condiciones higiénicas.

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *Campylobacter* spp. POR PCR MÚLTIPLEX

Las muestras fueron analizadas mediante PCR, después del enriquecimiento se realizó la extracción de DNA a los caldos después de una incubación de 48 horas, en este caso de los 40 caldos analizados 14 (70%) resultaron positivos para la detección de *Campylobacter* spp por PCR multiplex. (TABLA 4)

TABLA 4: Muestras positivas para *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en el análisis de muestras de pollo por PCR

| Muestras positivas | <i>Campylobacter jejuni</i> | <i>Campylobacter coli</i> | <i>Campylobacter jejuni</i> y <i>Campylobacter coli</i> |
|--------------------|-----------------------------|---------------------------|---|
| 14/20 | 7 | 1 | 6 |
| 70% | 35% | 5% | 30% |

De todas las muestras 14, el 50% son positivas en *Campylobacter jejuni* y el resto son positivas para las dos bacterias analizadas menos una que da *Campylobacter coli*, por lo que se encuentran que las muestras de pollo están contaminadas por *Campylobacter jejuni* o por las dos especies mayoritariamente un 65% de las muestras analizadas.(TABLA 5)

TABLA 5: Resultados de PCR de *Campylobacter coli* y *Campylobacter jejuni*

| Bacterias | PCR/ Caldo 48 h | Porcentaje (%)/20 muestras |
|------------------------|-----------------|----------------------------|
| <i>C.coli</i> | 7 | 35 % |
| <i>C.jejuni</i> | 13 | 65 % |

Campylobacter spp., especialmente *C. jejuni* y *C. coli*, es una de las bacterias más frecuentemente asociadas con diarrea en personas. La transmisión se produce por el consumo de alimentos de origen animal, fundamentalmente aves de corral y, con menor frecuencia, por el consumo de agua contaminada.

En los estudios publicados de *Campylobacter* spp en carne de pollos analizados por PCR, encontramos en Chile un 63% de positivos en 30 muestras analizadas (Gutierrez et al., 2017). Y en Corea, un 81% de 270 muestras analizadas (Hong and Kim, 2007), nuestros resultados son comparables puesto que obtenemos un 70% de 20 muestras. Esto demuestra una incidencias alta o muy alta.

Se deberían realizar también posteriores estudios para determinar si se repite el porcentaje obtenido en nuestro trabajo y que resulta menor que los obtenidos en Chile y Corea y si tiene alguna relación con el incremento de las medidas de bioseguridad implementadas a partir de los programas de control de *Campylobacter* spp.

CONCLUSIONES

- Con los resultados de este estudio y otros publicados podemos concluir que en las muestras de productos cárnicos de cerdo hay una baja incidencia de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*.
- En cuanto al estudio realizado en muestras de pollo, nuestros resultados coinciden con los publicados en demostrar el alto porcentaje de contaminación por *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en los productos avícolas.
- Para la detección e identificación de *Campylobacter* spp. en muestras cárnicas se ha realizado el análisis mediante la Norma UNE-EN-ISO 10272-1:2018, como método de microbiología clásica, el resultado obtenido ha sido muy bajo, siendo muy difícil el aislamiento e identificación de las cepas por la dificultad que conlleva la diferenciación de colonias cuando el crecimiento es abundante.
- Los análisis realizados mediante PCR múltiple de las mismas muestras han dado resultados más elevados demostrando así ser una técnica más eficaz, rápida y específica, que el análisis por la Norma UNE-EN-ISO 10272-1:2018.
- En nuestro caso optaríamos por las técnicas de PCR para poder detectar e identificar *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad. Le doy gracias a mis padres Cesar Valenzuela y María Altagracia Pérez por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado en mi vida.

A todas las personas del programa de becas ministerio superior de ciencia y tecnología (MESCYT) que hicieron posible, de alguna u otra manera, la culminación del presente trabajo. Una eterna gratitud hacia todos ellos, por ayudarme a cumplir un sueño, una meta, un anhelo.

A la **M^a. Rosa Montes Estellés** directora de la tesis, por la acogida, la confianza brindada, los conocimientos impartidos, sus buenos consejos, exigencias, su tiempo y paciencia. Mi aprecio y admiración hacia su persona, en lo personal y profesional, dan cuenta de una gran persona y excelente profesional.

A la **Dra. Ana González**, cotutora de la presente investigación, por su inmensa contribución en el poco tiempo de trabajo conjunto, tiempo suficiente para conocer la gran profesional, estupenda y agradable persona que es. Gracias por la confianza brindada y los conocimientos impartidos.

Al **Doctorando Miguel García, técnica Nancy y a la pasante Diane**, gracias por hacer de mi estadía una agradable experiencia y por permitirme formar parte de esta familia, gracias por la dedicación de tu tiempo sobre mi trabajo de compartir sus alegrías, penas y logros.

A mis amigos del programa de becas Internacional, por todos los gratos momentos compartidos, la amistad brindada y por soportarme durante el tiempo que pasé con ustedes: Manuel Rodríguez Calderón, Oscar Eduardo Severino, Herman Darío Laviano Medina, Carlos Then.

A mis amigos del Máster, por el eterno apoyo, las risas compartidas y la amistad brindada, una amistad que fortalece y anima, a ustedes mis amigos: Ariel Borsini, Miguel Balca, Pedro Sánchez, Jairo Campo, Mohamed.

A la universidad, que me acogieron en este año de estudio, sin duda gran universidad, debido a las grandes personas que en ella laboran: Universidad Politécnica de Valencia.

A la organización del Máster, a todos los profesores del Máster y en especial a **M^aEugenia Martín**, por todas las enseñanzas impartidas dentro y fuera del aula de clases, por su paciencia y amistad.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- ACHIPIA. (2017). *Campylobacter* spp. *Ministerio de Agricultura de Chile*, pp. 1–11. santiago de chile: Área Soporte al Análisis de Riesgo.
- Adams, M., & Moss, M. (1995). *Microbiología de los Alimentos* (the royal; T. Graham, Ed.). Zaragoza (España): Acribia.
- Al Amri, A., Senok, A. C., Ismaeel, A. Y., Al-Mahmeed, A. E., & Botta, G. A. (2007). Multiplex PCR for direct identification of *Campylobacter* spp. in human and chicken stools. *Journal of Medical Microbiology*, 56(10), 1350–1355. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47220-0>
- Altrock, A. Von, Hamedy, A., Merle, R., & Waldmann, K. (2013). *Campylobacter* spp . – Prevalence on pig livers and antimicrobial susceptibility. *Preventive Veterinary Medicine*, 109(1–2), 152–157. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.09.010>
- Banowary, B., Dang, V. T., Sarker, S., Connolly, J. H., Chenu, J., Groves, P., ... Ghorashi, S. (2015). Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Using Multiplex-PCR and High Resolution Melt Curve Analysis. *Journal Pone*, 10, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138808>
- Berradre-sáenz, B., Yáñez-ortega, J. L., García-sánchez, L., Me-, B., Rovira-carballido, J., Carramiñana-martínez, I., ... España, B. (2017). Epidemiología de la *Campylobacteriosis* en Castilla y León Durante el perío 2008-2015. *Rev Esp Salud Pública*, 91, 1–12. Retrieved from www.msc.es/resp
- Biarnés, M., & Blanco, A. (2010). Prevalencia de *Campylobacter* en pollos. Estudios epidemiológicos y de transmisión. *Centro de Sanidad Avícola de Aragón y Cataluña(CESAC), Reus, España.*, 1–20.
- Bolivar, A. M., Rojas, A., & Garcia-lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple : parámetros críticos y protocolo de estandarización (PCR and PCR-Multiplex : critical parameters and standardization protocol). *Instituto de Inmunología Clínica*, 3, 25–33.
- Cervantes, E., & Cravioto, A. (2007). *Campylobacter* y enfermedades asociadas. *Revista de La Facultad de Medicina UNAM*, 50(1), 1–35.
- CFSPH. (2005). *Campilobacteriosis* (pp. 1–6). pp. 1–6. IOWA: the center for food security and public health.
- Christian, J., Bryan, F., Silliker, J., Goepfert, J., Baird-parker, A., Busta, F., ... Liston, J. (2001). *El Sistema de Analisis de Riesgos y Puntos Criticos: su Aplicacion a las Industrias de Alimentos* (2a Edición; J. Silliker, A. Baird-parker, F. Bryan, J. Christian, T. Roberts, & R. Tompkin, Eds.). ZARAGOZA(España): ACRIBIA.
- Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G., & Colin, P. (1999). Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 29(6), 406–410. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1999.00658.x>
- Elika. (2006). *Campylobacter Jejuni en carne de aves* (pp. 2–26). pp. 2–26. arkaute: fundacion vasca para la seguridad agroalimentaria.
- Farre, R., Bermudo, F., Camean, A., Cepeda, A., Alvarez, M., Herrera, A., ... Martinez, E. (2012, September). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) con relación a las medidas de control para reducir la presencia de *Campylobacter* spp . en carne fresca de aves (pollo). *Revista Del Comite Cientifico*, 1–35.
- Gañan, M. (2009). *Estudio de Diferentes Estrategias Encaminadas a la Disminucion de la Incidencia de Campylobacter SPP. En la cadena alimentaria.* universidad autonoma de madrid.
- Gutierrez, S., Orellana, D., Martinez, C., & Garcia, V. (2017). Caracterización de cepas de *Campylobacter jejuni* obtenidas desde carne de pollo y heces de aves de corral de la zona central de Chile. *Revista Medica de Chile*, 145, 1551–1558.
- Hong, J., & Kim, J. M. (2007). Prevalence and Antibiotic Resistance of *Campylobacter* spp . Isolated from Chicken Meat , Pork , and Beef in Korea , from 2001 to 2006. *Of Food Protection*, 70(4), 860–866.
- Humphrey, T., & Jørgensen, F. (2006). Pathogens on meat and infection in animals - Establishing a relationship using campylobacter and salmonella as examples. *Meat*

- Science*, 74(1), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.04.026>
- ISO 10272-1, U.-E. (2017). *Spp., Microbiología de la cadena alimentaria Método horizontal para la detección y la enumeración de Campylobacter*. 1–36.
- Langen, M., Peters, U., Körner, U., Gissel, C., Stanislawski, D., & Klein, G. (2010). Semiquantitative detection of male pork tissue in meat and meat products by PCR. *Meat Science*, 86(3), 821–824. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.07.003>
- Lapierre, L. (2012). *Epidemiología, Transmisión y Control de Campylobacter spp* (pp. 2–28). pp. 2–28. santiago de chille.
- Lucas, J., and Vilca, M. (2013). Presencia de *Campylobacter* spp en canales y ciego de pollo de engorde en lima Perú. *Rev Inv Vet Perú.*, 24(3), 346–352.
- Mooret, J. E., and Madden, R. H. (1998). Occurrence of Thermophilic *Campylobacter* spp. in Porcine Liver in Northern Ireland. *Food Protection*, 61(4), 409–413.
- Narvaez-bravo, C., Taboada, E. N., Mutschall, S. K., and Aslam, M. (2017). Epidemiology of antimicrobial resistant *Campylobacter* spp. isolated from retail meats in Canada. *International Journal of Food Microbiology*, 253(April), 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.019>
- Noormohamed, A., and Fakhr, M. K. (2013). A Higher Prevalence Rate of *Campylobacter* in Retail Beef Livers Compared to Other Beef and Pork Meat Cuts. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, 2058–2068. <https://doi.org/10.3390/ijerph10052058>
- OIE. (2004). *Campylobacter* Jejuni y *Campylobacter* Coli. In *manual de la OIE sobre animales terrestres* (pp. 1150–1160).
- OMS. (2002). Estrategia global de la OMS para la inocuidad de los alimentos. *Departamento de Inocuidad de Los Alimentos, Organización Mundial de La Salud.*, 32.
- OMS. (2015). Estimaciones de la OMS sobre la carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria. *Departamento de Inocuidad de Los Alimentos Organización Mundial de La Salud Ginebra, Suiza*, p. 265.
- Orihuel, E., Sanz, M., Manuel, R., Canet, J., Carton, F., Fernandez, A., and Milvaques, A. (2015). *Campylobacter: La Bacteria Discreta* (pp. 1–48). pp. 1–48. valencia (españa): Betelgeux, Trotta Consulting, S.L. Autores:
- Pascual, M. del R. (2000). *Micriobiología Alimentaria. Metodología Analítica para Alimentos Y Bebidas* (2da edición). Madrid España.
- Persson, S., and Olsen, K. E. P. (2005). Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. *Medical Microbiology*, 54(May), 1043–1047. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46203-0>
- Ricke, S. C., Feye, K. M., Chaney, W. E., Shi, Z., & Pavlidis, H. (2019). Developments in Rapid Detection Methods for the Detection of Foodborne *Campylobacter* in the United States. *Frontiers in Microbiology*, 9(January). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03280>
- Rincón Acero, Diana Paola, R. R. (2011). Transmisión de Salmonella enterica a través de huevos de gallina y su importancia en salud pública. *Revista de La Universidad Industrial De*, 43(Mayo 2011), 167–177.
- Rodriguez, I., and Barrera, H. (2014). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Research Gate*, 7(May), 323–335.
- Ruiz, M. U. (2015). *Detección y caracterización de Campylobacter procedentes de animales, alimentos y agua residual*. Universidad Computense Madrid.
- Signorini, M. (2007). Microbiología de carnes envasadas al vacío y la biopreservación como medio para prolongar la vida de anaquel. *Nacameh*, 1, 26–40. Retrieved from http://www.geocities.com/nacameh_carnes/index.html
- Trimoulinard, A., Beral, M., Henry, I., Atiana, L., Porphyre, V., Tessier, C., ... Cardinale, E. (2017). International Journal of Food Microbiology Contamination by Salmonella spp., *Campylobacter* spp. and Listeria spp. of most popular chicken- and pork-sausages sold in Reunion Island. *International Journal of Food Microbiology*, 250, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.017>
- Turco, M., Rodrigo, V., Sabbaj, L., & Vazquez, M. (2014). Gastroenteritis por *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en un hospital pediátrico. *Revista Hospital de Niños Ricardo Gutierrez*, 56(253), 149–153.



- Vílchez, G., and Alonso, G. (2009). Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29, 1–8.
- Wang, G., Clark, C. G., Taylor, T. M., Pucknell, C., Barton, C., Price, L., ... Rodgers, F. G. (2018a). Colony Multiplex PCR Assay for Identification and Differentiation of. *40(12)*, 4744–4747. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.12.4744>
- Wang, G., Clark, C. G., Taylor, T. M., Pucknell, C., Barton, C., Price, L., ... Rodgers, F. G. (2018b). Colony Multiplex PCR Assay for Identification and Differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(12), 4744–4747. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.12.4744>
- Wei, B., Cha, S. Y., Yoon, R. H., Kang, M., Roh, J. H., Seo, H. S., ... Jang, H. K. (2016). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated from retail chicken and duck meat in South Korea. *Food Control*, 62, 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.013>
- Zumbano, L., Arevalo, A., Donado, M., and Romero, J. (2014). Diagnóstico Moleculares de *Campylobacter* en la Cadena Avícola Destina para Consumo Humano en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 25(2), 357–363.

ANEXOS 1

Esquema del método horizontal para el aislamiento de *Campylobacter* spp. (Según UNE-EN-ISO 10272-1:2018)

UNE-EN ISO 10272-1:2018

Anexo A (Normativo)

Diagrama de procedimientos

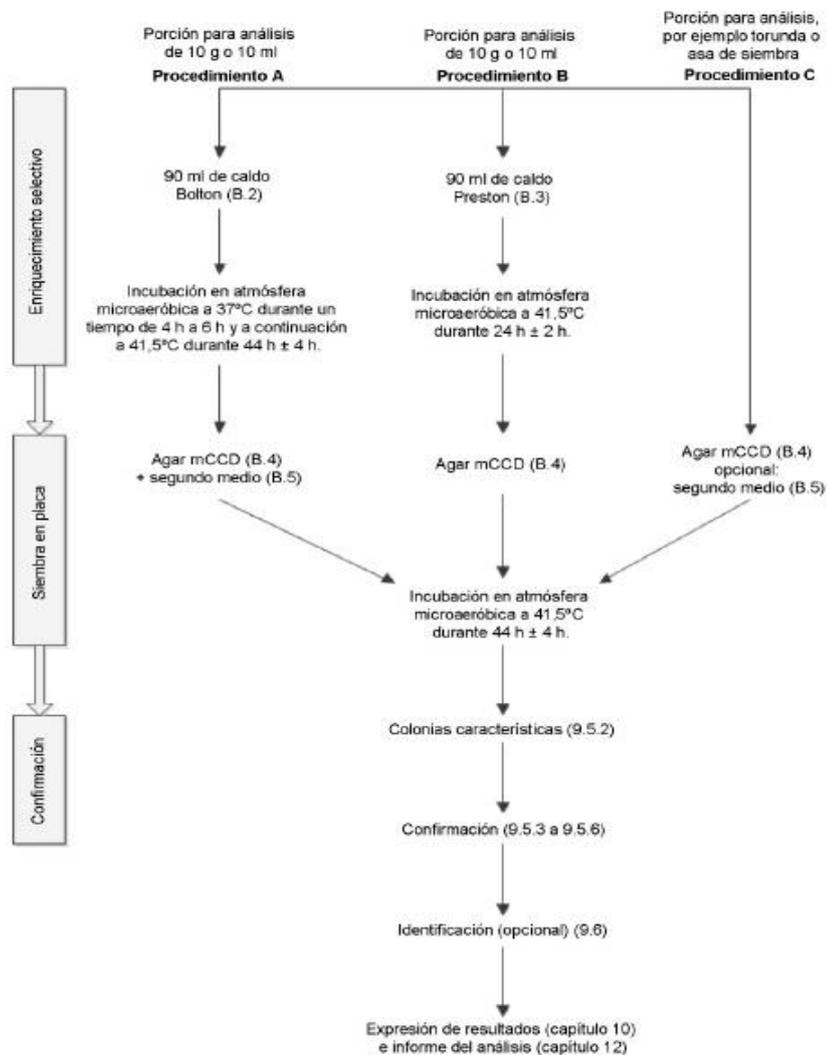


Figura A.1 – Diagrama de los procedimientos de detección de *Campylobacter* en la cadena alimentaria

ANEXO 2

Esquema de Protocolo de kit de extracción de DNA.

Experienced User Protocol — Gram-Negative Bacterial Preparation

1 Harvest Cells

- ❑ Pellet 1.5 mL of bacterial broth culture at $12,000\text{--}16,000 \times g$ for 2 minutes, discard media. When using enriched media, please see Procedure, step 1a, on page 5.

2 Resuspend Cells

- ❑ Resuspend pellet in 180 μL Lysis Solution T.
Optional: Add 20 μL RNase A, incubate RT for 2 minutes.

3 Lyse Cells

- ❑ Add 20 μL Proteinase K to cell suspension, vortex or pipet to mix. Incubate at $55\text{ }^\circ\text{C}$ for 30 min.
- ❑ Add 200 μL Lysis Solution C, vortex or pipette to mix. Incubate at $55\text{ }^\circ\text{C}$ for 10 minutes.

4 Prepare Column

- ❑ Add 500 μL of Column Preparation Solution to each binding column.
- ❑ *Spin at $\geq 12,000 \times g$ for 1 minute. Discard flow-through.*

5 Bind DNA to Column

- ❑ Add 200 μL ethanol to the lysed cells, vortex or invert to mix.
- ❑ Transfer EtOH mixture to binding column. *Spin at $\geq 6500 \times g$ for 1 minute.*

6 Wash Column

- ❑ Transfer column to new collection tube. Add 500 μL Wash Solution 1 to column. *Spin at $\geq 6500 \times g$ for 1 minute.*
- ❑ Transfer column to new collection tube. Add 500 μL Wash Solution Concentrate to column. *Spin at $\geq 12,000 \times g$ for 3 minutes to dry column.*

7 Elute DNA

- ❑ Transfer column to new collection tube. Add 200 μL of Elution Solution. *Spin at $\geq 6500 \times g$ for 1 minute.*
Optional: Repeat in new or same tube.

