



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“Cuantificación y caracterización genética de cepas de *Campylobacter* spp. aisladas de muestras de carcasas de pollos en percha en el cantón Quito”.

Trabajo de titulación, modalidad proyecto de investigación para la obtención del título de Magíster en Producción y Sanidad Avícola

Autor: Carlos Andrés Gómez Coronado MVZ.

Tutora: María Inés Baquero MSc.

Quito D.M, 2018

© DERECHOS DEL AUTOR

Yo, CARLOS ANDRÉS GÓMEZ CORONADO, en calidad de autor del trabajo de titulación “Cuantificación y caracterización genética de cepas de *Campylobacter* spp. aisladas de muestras de carcasas de pollos en percha en el cantón Quito.”, autorizo a la Universidad Central del Ecuador hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o parte de los que contiene esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

Los derechos que como autor me corresponden, con excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a mi favor, de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8, 19 y demás pertinentes a la Ley de Propiedad Intelectual y su reglamento.

Así mismo autorizo a la Universidad Central del Ecuador para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

En la ciudad de Quito a los 24 días del mes de julio de 2018.

Carlos Andrés Gómez Coronado
C.I. 1002678025

cgomez@uce.edu.ec

APROBACIÓN DEL TUTOR.

Yo, María Inés Baquero Cárdenas en calidad de tutora del trabajo de titulación, modalidad proyecto de investigación, para la obtención del Título de Magister en Producción y Sanidad avícola, elaborado por el estudiante CARLOS ANDRÉS GÓMEZ CORONADO del programa de posgrado Maestría en Sanidad Avícola, de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del jurado examinador que se asigne, por lo que APRUEBO, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación determinado por la Universidad Central del Ecuador.

En la ciudad de Quito, a los xx días del mes de julio de 2018.

María Inés Baquero Cárdenas MSc.

C.I.

Dedicatoria.

A Sansón.

“Y en tu ausencia las paredes se pintarán de tristeza...”

Agradecimientos

Es imposible expresar con palabras la gratitud que siento por todos y cada uno de los actores de este trabajo, porque no considero a la presente investigación como un logro personal sino más bien una prueba fehaciente de lo que el trabajo realizado por un equipo multidisciplinario puede lograr.

Quiero agradecer a mis padres que me enseñaron que en la vida las personas no debemos buscar ser buenas sino justas, a mis hermanas Carolina y Stefanía a quienes amo sin condiciones, al doctor Eduardo Aragón que confió en mis capacidades y me permitió servir a mi Alma Máter, a la doctora María Belén Cevallos y al doctor Christian Vinuesa, ejemplo de disciplina, tenacidad y liderazgo, a mi tutora la doctora María Inés Baquero de quien jamás he escuchado un no se puede, a Carlos, Gabriela, Christian y Susana, mi familia lejos de casa, a Verónica y Vanessa mis amigas, compañeras y cómplices de vida, a José y Sofía, mis compañeros de trabajo y a todas las personas que en su momento supieron brindarme su confianza para poder servirles.

Un pensador dijo una vez: *“los hombres que luchan toda la vida son los imprescindibles”* sin embargo considero que debemos luchar toda la vida no para ser imprescindibles, sino para ser útiles y mi deseo ferviente siempre será ser útil para las personas importantes en mi vida y para la sociedad, espero que el pequeño aporte que aquí os presento sea la evidencia tangible de mis deseos, de todo corazón, muchas gracias.

Carlos Gómez Coronado, Julio de 2018

CONTENIDO

© DERECHOS DEL AUTOR	II
APROBACIÓN DEL TUTOR.....	III
Dedicatoria.....	IV
Agradecimientos	V
INDICE DE TABLAS	IX
INDICE DE FIGURAS	X
INDICE DE ANEXOS.....	X
Resumen.	1
CAPITULO I	3
INTRODUCCIÓN	3
CAPITULO II	6
OBJETIVOS	6
Objetivo General:	6
Objetivos Específicos:	6
CAPITULO III	7
MARCO TEÓRICO	7
Antecedentes	7
Revisión Bibliográfica	8
Morfología de <i>Campylobacter</i> spp.	8
Genética de <i>Campylobacter</i>	9
Reservorios	10
Puntos Críticos de contaminación por <i>Campylobacter</i> spp.	10
Consumo de pollo	11
Epidemiología	12
Técnicas de identificación de <i>Campylobacter</i> spp.	14
Identificación Fenotípica	14
Identificación Molecular	14
PCR Convencional	14
PCR Multiplex	15
Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE)	15
Polimorfismo de Fragmento Amplificado (AFLP)	16
Reacción en Cadena de la Polimerasa con Análisis del Polimorfismo de los Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP)	16
CAPITULO IV	18
METODOLOGIA	18

Descripción de la zona de estudio.....	18
Diseño del estudio.....	18
Manejo del estudio.....	19
Fase de Campo:.....	19
Fase de Laboratorio.....	19
Cuantificación y Aislamiento de <i>Campylobacter</i> spp.:.....	19
Preparación de diluciones:.....	19
Extensión en placa de las diluciones.....	19
Cuantificación y respaldo.....	20
Extracción de ADN.....	20
Pre-PCR.....	21
Electroforesis.....	21
PCR gen FlaA.....	21
PCR-.....	22
RFLP.....	22
Procesamiento de datos.....	22
Análisis de datos.....	22
Análisis estadístico.....	22
CAPITULO V.....	23
RESULTADOS	23
Cuantificaciones:.....	24
Prueba de Normalidad:.....	25
Análisis de Diferencias Significativas.....	25
Prueba de normalidad de datos por sector.....	26
Normalidad Norte.....	26
Normalidad Sur.....	26
Análisis de Diferencias Significativas por Sector (Norte y Sur).....	27
Sector Norte.....	27
Pruebas de normalidad de datos entre sectores.....	27
Normalidad Norte vs Sur.....	28
Análisis de Diferencias Significativas entre Sectores (Norte y Sur).....	28
PCR multiplex.....	28
RFLP.....	30
CAPITULO VI.....	35
Discusión	35
CAPITULO VII.....	41

Conclusiones	41
CAPITULO VIII	42
Recomendaciones	42
REFERENCIAS.....	43
ANEXOS.....	51

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número total de muestras positivas a <i>Campylobacter</i> spp. en carcasas de pollo en percha en supermercados, mercados y tercenas de dos zonas (Norte y Sur) del distrito metropolitano de Quito.....	24
Tabla 2. Resultados totales de la cuantificación de <i>Campylobacter</i> spp. de los aislamientos positivos en agar RC.....	24
Tabla 3. Prueba de normalidad de la carga bacteriana de <i>Campylobacter</i> spp. en los distintos puntos de muestreo.....	25
Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de muestreo.....	25
Tabla 5. Pruebas post hoc HSD Tukey para determinar significancia	26
Tabla 6. Prueba de normalidad de la carga bacteriana de <i>Campylobacter</i> spp. en los distintos puntos de muestreo en	26
Tabla 7. Prueba de normalidad de la carga bacteriana de <i>Campylobacter</i> spp. en los distintos puntos de muestreo en el sector sur.....	26
Tabla 8. Análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de muestreo en el sector norte.....	27
Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de muestreo en el sector sur.....	27
Tabla 10. Prueba de normalidad de la carga bacteriana de <i>Campylobacter</i> spp. en los distintos puntos de muestreo entre el sector norte y sur.....	28
Tabla 11. Análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de muestreo entre sectores norte y sur.....	28
Tabla 12. Resultados de los patrones de bandas determinando los genotipos presentes de <i>C. coli</i> en los puntos de muestreo y las zonas norte y sur.....	33
Tabla 13. Resultados de los patrones de bandas determinando los genotipos presentes de <i>C jejuni</i> en los puntos de muestreo y las zonas norte y sur.....	34

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Colonias de color rojizo en agar RC después de incubación a 42°C por 48H00, el crecimiento es característico de colonias de <i>Campylobacter</i> spp.....	23
Figura 2. Representación del total de muestras positivas al aislamiento de <i>Campylobacter</i> spp. en carcasas de pollo en percha en supermercados, mercados y terneras de dos zonas (Norte y Sur) del distrito metropolitano de Quito.	24
Figura 3. Resultado de la electroforesis en gel de agarosa mostrando las bandas específicas para <i>Campylobacter jejuni</i> y <i>Campilobacter coli</i> . Se muestra una escalera (ladder) de 100bp, control positivo para <i>C. coli</i> (364bp) y control positivo para <i>C. jejuni</i> (773bp).....	29
Figura 4. Resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando las bandas específicas para la amplificación del gen <i>fla_A</i> de <i>Campylobacter jejuni</i> y <i>Campilobacter coli</i> . Se muestra una escalera (ladder) de 100bp, las muestras positivas marcarán bandas específicas (1728bp).....	29
Figura 5. Resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 2% mostrando el perfil PCR-RFLP de los fragmentos digeridos con endonucleasa <i>Ddel</i> , en el centro y los extremos se muestra el Ladder de 100pb utilizadas como marcador molecular.	30
Figura 6. Dendograma basado en el análisis genotípico (1% de optimizacion, 1,5% de tolerancia), muestra la diversidad de cepas y genotipos aislados(n=19) de <i>C. coli</i> en los distintos puntos de muestreo.....	31
Figura 7. Dendograma basado en el análisis genotípico (1% de optimizacion, 1,5% de tolerancia), muestra la diversidad de cepas y genotipos aislados(n=15) de <i>C. jejuni</i> en los distintos puntos de muestreo.....	32

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo.	51
Anexo 2. Reactivos de Biología Molecular.	54
Anexo 3. Resultados de cuantificaciones de <i>Campylobacter</i> spp.	55
Anexo 4. Resultados de PCR multiplex para <i>Campylobacter</i> spp.....	58
Anexo 5. esquema de PCR multiplex.	61
Anexo 6. Esquema de FlaA-PCR multiplex.	62
Anexo 7. flujogramas de PCR-RFLP para <i>Campylobacter</i> spp.	63
Anexo 8. Carcasas en distintos puntos de muestreo.	65
Anexo 9. Procesamiento de carcasas.....	66
Anexo 10. Extracción, Pre-PCR, FlaA-PCR, PCR -RFLP.	67

Cuantificación y caracterización genética de cepas de *Campylobacter* spp. aisladas de muestras de carcasas de pollos en percha en el cantón Quito.

Autor: Carlos Andrés Gómez Coronado

Tutora: María Inés Baquero Cárdenas

Resumen.

Campylobacter spp. es uno de los agentes causales más frecuentemente aislado de transgresiones alimentarias de tipo infeccioso en seres humanos. Está considerado dentro de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's), por lo que su principal vía de infección es la oral, dado por consumo de alimentos contaminados como la carne de las aves y sus derivados. Varios estudios han determinado la asociación del contagio de *Campylobacter* spp a procesos como el faenamiento, manejo, transporte y expendio de las carcasas. La determinación de la presencia y su cuantificación a nivel de sitios de expendio nos brinda una idea clara de la situación actual en cuanto a niveles de contaminación, mientras que los análisis de diversidad genética se emplean como herramientas eficaces para la comprensión epidemiológica del patógeno. El objetivo del presente estudio fue el de aislar, cuantificar y tipificar molecularmente cepas de *Campylobacter* spp. a partir de muestras de carcasas de pollo en percha en la ciudad de Quito. De un total de 135 muestras recolectadas en 17 semanas se obtuvieron 104 aislamientos positivos a *Campylobacter* spp (77.04%). Se subtipificó molecularmente 65 aislados de *Campylobacter coli*, y 36 de *Campylobacter jejuni*. Se realizó PCR-RFLP de las muestras positivas a la presencia del gen *flaA*, utilizando para la digestión, la enzima DdeI y se analizaron los patrones de bandas mediante la elaboración de dendogramas, uno para cada especie, identificando 19 genotipos para *Campylobacter coli*, y 15 para *Campylobacter jejuni*. Varios genotipos se encontraron presentes en distintos puntos de muestreo, lo que supone un origen común; por otro lado, varios genotipos se encontraron presentes en un solo punto, demostrando la gran variabilidad genética que posee *Campylobacter* spp.

Palabras clave: *Campylobacter* spp., Cuantificación, PCR-RFLP, Genotipos.

Quantification and genetic characterization of strains of *Campylobacter* spp. isolated from carcasses of chickens on perch in Quito.

Author: Carlos Andrés Gómez Coronado

Tutor: María Inés Baquero Cárdenas

Abstract.

Campylobacter spp. is one of the etiologic agents more frequently isolated from infectious alimentary transgressions in human beings. It is considered as part of the Foodborne Diseases and it's mainly orally transmitted by consuming contaminated food such as poultry meat and its by-products. Several studies have determined the association between the transmission of *Campylobacter* spp. and the slaughtering, handling, transportation and sale. The determination of its presence and its quantification, on chicken retailed meat, show us a clear picture of the present situation on contamination levels; whereas the genetic diversity analyses are effective tools to comprehend the pathogen epidemiology. The aim of the present study was to isolate, quantify and molecularly typify *Campylobacter* spp. strains from samples of chicken carcasses from retailed meat in the city of Quito. From a total of 135 samples collected in 17 weeks, 104 were positive for *Campylobacter* spp. isolation (77.04%). Also, 65 *Campylobacter coli* and 36 *Campylobacter jejuni* strains were isolated by molecular subtyping. Positive samples were analyzed for the amplification of the *flaA* gen by PCR-RFLP, utilizing Ddel enzyme for the digestion and analyzing the band pattern through dendogram elaboration for each specie; 19 genotypes were identified for *Campylobacter coli* and 15 for *Campylobacter jejuni*. Diverse genotypes were found in different sampling areas, which might suggest a common origin; additionally, various genotypes were found in a single sampling area, showing the great genetic variability of *Campylobacter* spp.

Key words: *Campylobacter* spp., quantification, PCR-RFLP, genotypes.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

Campylobacter spp., es un bacilo Gram negativo móvil, microaerófilo estricto, no fermentativo, oxidasa positivo, catalasa variable y nutricionalmente exigente (Quinn, *et al.*, 2011). Está distribuido a nivel mundial, siendo uno de los patógenos más importantes que afectan la producción animal y la salud humana (Man, 2011).

El género *Campylobacter* spp., es comensal primario del tracto digestivo de aves y en menor grado de reptiles y mamíferos (Man, 2011; Newell, *et al.*, 2003). Las principales especies reconocidas como patógenas humanas son *C. jejuni* y *C. coli*. Otras especies tales como *C. concisus*, *C. lari*, *C. upsalenliensis* y *C. ureolyticus*, son considerados como patógenos emergentes (Newell, *et al.*, 2003).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp., son consideradas las especies más comunes causantes de infecciones transmitidas por la ingestión de alimentos de origen animal contaminados (Messad, *et al.*, 2014; OMS, 2016)

Las aves y sus derivados constituyen la principal fuente de infección por *Campylobacter* spp., debido a que éstas, actúan como reservorio; la carne de pollo es la más propensa a contaminarse por este género bacteriano (Prachantasena *et al.*, 2016). El riesgo de gastroenteritis en humanos aumenta, al ser una de las carnes más consumidas a nivel mundial, en especial en países en vías de desarrollo (FAO, 2014). De acuerdo al último reporte presentado por la FAO (Food and Agriculture Organization) en el mundo se produce un total de 67,5 millones de toneladas de carne de pollo debido a su bajo costo (Evans, 2016).

El mecanismo de procesamiento de carne de pollo es uno de los principales factores de riesgo para la contaminación con cepas de *Campylobacter* spp. (Prachantasena *et al.*, 2016). La contaminación de la carcasa puede darse al momento del sacrificio o evisceración de las aves, a través del contacto directo con contenido cecal, agua, equipo o material contaminado, durante la cadena de faenamiento incluyendo a los operarios (Takahashi, *et al.*, 2006). Conforme

avanza la cadena, el riesgo de contaminación disminuye, pudiendo llegar a un riesgo mínimo al congelar el producto (Malher *et al.*, 2011).

La campilobacteriosis en la mayoría de los casos, es una enfermedad auto limitante (Ljupco, *et al.*, 2011). Los cuadros más severos en humanos son generalmente tratados con eritromicina o ciprofloxacina; mientras que en medicina veterinaria se opta como medida profiláctica a las quinolonas, macrólidos y fluoroquinolonas (Melero, *et al.*, 2012; Prachantasena *et al.*, 2016).

En Estados Unidos, para el año 2005, más del 85% de las carcasas de pollo comercial fueron positivas a *Campylobacter* spp. (Oyarzabal, *et al.*, 2005). Durante el 2008, en Francia, se identificó *Campylobacter* spp., en el 87,5% de carcasas de pollos en percha analizadas (Hue *et al.*, 2010). La Unión Europea a través de su autoridad sanitaria (EFSA) estimó que entre el 50 al 80% de casos de campilobacteriosis estarían relacionados con el consumo de carcasas de pollo contaminadas (Sarp, *et al.*, 2016). Por otro lado, en Brasil el 98,5% carcasas de pollo testeadas al final de la cadena de faenamiento fueron positivas a *Campylobacter* spp. de las cuales un 72% fue positiva a *C. coli* y un 38% a *C. jejuni* (Gonsalves, *et al.*, 2016).

La determinación de especies de *Campylobacter* spp. presente en carne, requiere de métodos moleculares basados en el reconocimiento de genes específicos (Ge, *et al.*, 2013). Una de las técnicas utilizadas, es el Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP), para el reconocimiento de fragmentos de nucleótidos específicos, a partir de productos amplificados de genes flagelares mediante el uso de enzimas de restricción (Takahashi *et al.*, 2006). La técnica RFLP junto con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se basa en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción de ADN cromosómico para la tipificación genética y diferenciación de cepas bacterianas genéticamente relacionadas (Dum, *et al.*, 1999).

El PCR-RFLP permite la genotipificación de cepas de *Campylobacter* spp. de importancia tales como *C. coli* y *C. jejuni* (Behringer, *et al.*, 2011). Es una técnica rápida, sensible y específica (Ge *et al.*, 2013; Rodríguez Gutiérrez, *et al.*, 2015). La subtipificación molecular de cepas de *Campylobacter* spp., se la puede

realizar en base a la diferenciación de los genes flagelares *flaA* y *flaB* presentes en *C. jejuni* y en *C. coli* respectivamente (Takahashi *et al.*, 2006)..

En el presente estudio se realizó el aislamiento microbiológico, cuantificación y caracterización genotípica por RFLP de cepas de *Campylobacter* spp aisladas a partir de muestras de carcasas de pollo en percha.

La población objeto de estudio fueron carcasas de pollos en expendio en diferentes supermercados, mercados abiertos y puntos de expendio (despensas) de la ciudad de Quito. Se tomaron 135 muestras al azar, los mismos que pasaron a cultivo para identificación bacteriológica y cuantificación y posteriormente las cepas fueron caracterizadas molecularmente mediante la técnica PCR-RFLP.

CAPITULO II

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Determinar microbiológica y molecularmente cepas de *Campylobacter* spp. aisladas de muestras de carcasas de pollos en percha, en la ciudad de Quito

Objetivos Específicos:

- Cuantificar y aislar microbiológicamente cepas de *Campylobacter* spp. a partir de muestras de carcasas de pollos en percha.
- Subtipificar genéticamente cepas de *Campylobacter* spp. a partir de muestras de carcasas de pollos en percha

CAPITULO III

MARCO TEÓRICO

Antecedentes

Las infecciones por *Campylobacter* spp., constituyen uno de los principales problemas entéricos en los seres humanos; sin embargo, también pueden asociarse a celulitis, osteomielitis, artritis, endocarditis y pericarditis (Pierna Álvarez, *et al.*, 2017). La falta de higiene y la cercanía con animales, contribuyen a la adquisición de patógenos entéricos incluyendo *Campylobacter* spp. (Jonaidi-Jafari, *et al.*, 2016). El tracto digestivo de varios animales, principalmente, cerdos, ganado vacuno, roedores y aves constituyen reservorios de varias especies de *Campylobacter*, en especial de aquellas termotolerantes (Fitzgerald, 2015).

Del 20 al 30% de las infecciones por *Campylobacter* spp, están asociadas a la manipulación, manejo, preparación y consumo de carne de pollo (Stella *et al.*, 2017). El consumo de carne de pollo al por menor es un riesgo importante para los consumidores, quienes de esta manera se exponen a contraer infecciones por *Campylobacter* spp. (Stella *et al.*, 2017).

La campilobacteriosis en humanos se manifiesta con diarrea, fiebre, dolor abdominal, y se ha descrito el riesgo de desarrollar problemas sistémicos, tales como el síndrome de Guillain Barré, el cual en su mayoría es auto limitante. en otros casos puede requerir de antibioterapia (Fitzgerald, 2015). Jonaidi-Jafari, en su estudio realizado en el 2016, manifiesta que las aves podrían contagiarse desde el día cero por *Campylobacter* spp., y al día uno presentar cerca de 35 UFC de *C. jejuni* por gramo de heces pudiendo contaminar huevos a nivel de la cáscara, clara y yema (Jonaidi-Jafari, *et al.*, 2016).

En el Ecuador, varios estudios han reportado la presencia de *Campylobacter* spp. en el contenido cecal de aves que llegaban a matadero (Galarraga Mora, 2014; Poma, 2014). Falcon y Medina en el 2015, y Paganquiza en el 2016, logran identificar y clasificar genotípicamente a *Campylobacter* spp. dentro de la cadena de producción del pollo destinado para consumo humano.(Falcon, 2015; Medina, 2015; Paganquiza, 2016)

En el 2017, Vinueza mediante su trabajo titulado “*Salmonella and Campylobacter in broilers at slaughter age: a possible source for carcasses contamination in Ecuador*”, señala la facilidad con que la carcasa puede contaminarse al final de la cadena productiva, el alto grado de desconocimiento sobre la presencia de estos patógenos en la industria, la alta prevalencia tanto de *Salmonella* spp. como *Campylobacter* spp., así como la marcada resistencia de estos patógenos a los antimicrobianos (Vinueza, 2017).

Revisión Bibliográfica

Morfología de *Campylobacter* spp.

Campylobacter spp es un bacilo Gram negativo, delgado, curvo, móvil con flagelo polar; es un microorganismo exigente, microaerófilo (5-10% CO₂), no fermentativo, oxidasa positivo, indol negativo, Voges-Proskauer negativo y catalasa variable (Quinn, *et al.*, 2011). Crece solo en medios enriquecidos a una temperatura de 42°C, y se diferencian según su morfología de la colonia dependiendo del medio de cultivo y mediante la determinación de la susceptibilidad bioquímica y antibiótica. También existen técnicas moleculares, las cuales reconocen especies de *Campylobacter* menos fastidiosas, tales como *C. concisus*, *C. upsaliensis* y *C. uroliticus* (Health Protection Agency, 2013; Quinn, *et al.*, 2011). *Campylobacter* spp. puede verse afectado por estrés oxidativo, choque osmótico y desecamiento, provocando así su inactivación (Stella *et al.*, 2017).

El género *Campylobacter* está compuesto por alrededor de 34 variedades de especies, de las cuales *C. coli* y *C. jejuni*, son consideradas zoonóticas, causando enfermedad en humanos tanto en países desarrollados, como en vías de desarrollo (Fitzgerald, 2015; Jonaidi-Jafari, *et al.*, 2016).

Una vez en el interior de la parvada *Campylobacter* se disemina rápidamente llegando a niveles de 10⁹ UFC/g (Battersby, *et al.*, 2017) .

Es común que las bacterias sean capaces de formar biofilms, los cuales les permiten sobrevivir a condiciones extremas, tolerar factores de estrés y expresar resistencia a los antimicrobianos sin una presión selectiva específica (Zbrun *et*

al., 2017). Los biofilms pueden formarse en cuchillas, vidrio, membranas de nitrocelulosa, superficies plásticas, entre otras. Las cepas de *C. coli* son capaces de formar biofilms más efectivamente que *C. jejuni* (Sałamaszyńska-Guz, *et al.*, 2018).

Genética de *Campylobacter*

C. jejuni está compuesto por alrededor de 1.641.481 pares de bases las cuales se encuentran dispuestas en un genoma circular que codifica para 1654 proteínas, siendo el 94.3% de la función genómica total (Parkhill *et al.*, 2000). Una característica particular del genoma de *C. jejuni* es que contiene pocas secuencias repetidas en su interior, a más del ARN ribosomal operativo y un triplicado de secuencias de codificación preestablecida, que le permiten variar fácilmente en función del tiempo y las circunstancias en las que se encuentre (Parkhill *et al.*, 2000).

Comparte características genómicas superficiales con *H. pylori* y *E. coli* en cuanto a el lipopolisacarido, y la enzima glycosil tranferasa, así como en la síntesis proteica superficial, la cual le faculta a *Campylobacter* a colonizar de manera dinámica y eficiente dentro del intestino del hospedador, y evadir su sistema inmune (Parkhill *et al.*, 2000).

El complejo flagelar dentro de *Campylobacter* termófilo *C. jejuni* y *C. coli* codificado por los genes *flaA* y *flaB* comparten un 92% de identidad (Alm, 1993).

Los flagelos son uno de los factores de virulencia mejor definidos dentro del género *Campylobacter* (Parkhill *et al.*, 2000), estos se describen como un complejo de filamentos formados por subunidades de flagelina, las mismas que pueden ser codificadas por genes de dos o más especies (Alm, 1993).

La estructura flagelar es similar entre especies, es así que las unidades de flagelina compuesta por los grupos amino y carboxilo terminal permiten la polimerización y estabilidad del filamento flagelar, la diferencia radica en el tamaño y el número de aminoácidos presentes en la molécula central de la flagelina proveyéndoles de diversidad antigénica entre flagelos de la familia Enterobacteriaceae (Alm, *et al.*, 1993).

Reservorios.

Las especies patógenas más comunes de *Campylobacter* se encuentran en pollos, pavos, aves acuáticas como los principales reservorios debido a su temperatura corporal (42°C) (Vinueza, 2018); incluyen cerdos, bovinos, ovinos, roedores, perros y gatos; también derivados como leche cruda, carne de aves mal cocida, agua contaminada (Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2013; Quetz, *et al.*, 2013).

Una posible contaminación cruzada se puede dar al momento de preparar la carne conjuntamente con alimentos crudos (Malher *et al.*, 2011). Así además, el consumo directo de carne cruda contaminada, incrementa los riesgos de adquirir la infección (Messad *et al.*, 2014), puesto que *Campylobacter* spp. puede permanecer viable en pliegues, grietas cutáneas y folículos de plumas (Takahashi *et al.*, 2006).

Puntos Críticos de contaminación por *Campylobacter* spp.

La contaminación durante el procesamiento se da a través del contacto con contenido intestinal, directamente de ave a ave o por equipo o agua contaminada (Rahimi & Ameri, 2011). Los modernos y cortos procesamientos de la cadena de producción, los recubrimientos de plástico, el oscuro y frío almacenamiento contribuye a que *Campylobacter* sobreviva (Stella *et al.*, 2017)

A nivel de la cadena de faenamiento las aves o sus subproductos logran contaminarse en mayor o menor proporción (Frasao, *et al.*, 2017). Las principales etapas de la cadena son: escaldado, eviscerado y chilling, siendo la evisceración es una de las más importantes, y en la cual se debe prevenir la contaminación con *Campylobacter* spp. (Falcon, 2015; Frasao *et al.*, 2017).

La cantidad de *Campylobacter* spp. posterior al desplume es alta puesto que a nivel de las aves siempre existen heces contaminadas adosadas a las plumas; en el caso de la evisceración la probabilidad de extravasación del contenido intestinal por manipulación inapropiada o por la mecanización de la planta es alto, promoviendo la contaminación de las carcasas de manera indirecta (Franchin, *et al.*, 2007).

En las áreas donde se utilice agua como medio de enfriamiento de las carcasas, es muy factible que exista *Campylobacter* ligado principalmente a su capacidad de formar biofilms asociada a la tensión superficial propia del agua (Mughini-Gras *et al.*, 2016). Si bien es cierto que la probabilidad de contaminación en carcasas disminuye cuando se adicionan compuestos como agentes clorados o ácidos, el riesgo está presente (Bauermeister, *et al.*, 2008)

En los chillers clorados a una dosis de 50 mg/L la disminución de *Campylobacter* por carcasa baja de 2,6 log₁₀ UFC/ml a 0,6 UFC/ml, la misma que se ve afectada por la cantidad de materia orgánica que existe dentro de los tanques debido a que llega adherida a las carcasas procedentes de los pasos previos de la cadena de faenamiento, constituyendo un factor de riesgo para el consumidor final (Bauermeister *et al.*, 2008; Sukted, *et al.*, 2017)

Posterior al pasaje de las carcasas por el chiller, éstas son sometidas a enfriamiento en donde se produce el cierre de los folículos presentes en la piel, los mismos que si se encuentran contaminados encierran a *Campylobacter* manteniéndolo viable inclusive posterior al enfriamiento a -20°C (Franchin, *et al.*, 2007).

Burfoot, *et al.*, mencionan que el congelamiento de las carcasas para reducir el número de colonias de *Campylobacter* presentes es efectivo; pero este método de contención no se considera una opción en aquellas carcasas que ya están a la venta, puesto que de acuerdo a las regulaciones de la Unión Europea estas deben ser expandidas lo más frescas posibles (Burfoot, *et al.*, 2017).

Las cantidades de *Campylobacter* presentes en carne pueden disminuir al retirar la piel, y asegurarse de cocinar apropiadamente las carnes y subproductos, tomando en cuenta que la mayor cantidad de especies de *Campylobacter* causantes de enfermedad en humanos son *C. coli* y *C. jejuni* (Franchin *et al.*, 2007; Stella *et al.*, 2017).

Consumo de pollo.

Uno de los alimentos más importantes en el mundo es la carne de pollo, considerada una fuente proteica importante para mantener una buena nutrición (Sukted, *et al.*, 2017).

Según las cifras de la Corporación Nacional de Avicultores del Ecuador (CONAVE), para el año 2013 se tenía un consumo de pollo per cápita de 35 Kg/persona/año, con una proyección ascendente en los últimos años; siendo así la carne de pollo una de las principales fuentes de alimento incluida en la dieta de los ecuatorianos (CONAVE, 2013).

En América Latina el consumo de carne de pollo es creciente, es así que para el 2016 en Brasil, el consumo per cápita llegó a 45 Kg/persona/año, mientras que en Venezuela fue de 41 Kg/persona/año, en Argentina de 40,5 Kg/persona/año; en Perú de 39 Kg/persona/año y en Bolivia de 37 Kg/persona/año (Villa, 2018).

En Estados Unidos, según la USDA (United States of Agriculture) el consumo per cápita de pollo para el año 2015 fue de 62,2 libras/persona/año, los mismos que se prevé incrementaran con el aumento de la población (Bentley, 2017).

Mientras que en Emiratos Árabes para el año 2011 fueron de 59,4 Kg por persona al año, en Hong Kong el consumo fue de 47 Kg/persona/año, para los países de la Unión Europea se estimó un consumo de 44,5 Kg/persona/año, seguido de Arabia Saudita y Malasia con un promedio de 43,8 y 37,3 Kg/persona/año respectivamente (USDA, 2011)

Epidemiología.

Las especies de *Campylobacter* termotolerantes como *C. jejuni* y *C. coli*, son causales de morbilidad en humanos por producir problemas gastroentéricos (Zbrun *et al.*, 2017). La reducción de su incidencia, ha sido de interés mundial, esto en base a que la Autoridad de Seguridad Alimenticia Europea (EFSA) estima que el costo anual por campilobacteriosis es cercano al billón de euros, con cerca de 200.000 casos confirmados (Stella *et al.*, 2017; Sukted, *et al.*, 2017).

La mayoría de los casos de campilobacteriosis asociada al consumo de carne de pollo contaminada se reporta no solo en aquella población que reside cerca de los planteles de faenamiento, los mismos que tienen a vender de forma directa el pollo para consumo, sino también a toda la población a la que llega ese producto gracias al comercio (Allen *et al.*, 2007; Bahrndorff, *et al.*, 2013)

La campilobacteriosis está reportada a nivel mundial, estimándose alrededor de 2.5 millones de casos de diarrea cada año, con un promedio de 13,000 hospitalizaciones y 124 muertes humanas (Messad *et al.*, 2014). Es así que, en EEUU en el 2011, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) reportó 0.8 millones de casos anuales (Man, 2011).

De acuerdo al estudio realizado por Nebola durante el 2006 en República Checa, la presencia de *Campylobacter* spp. en carcasas de pollo procesado fue de 10^3 - 10^5 UFC por carcasa, superando así la dosis infectiva para el ser humano (Nebola & Steinhauserova, 2006).

En Estados Unidos cerca del 15,7% (8 de 51) de pollos en percha muestran índices de *Campylobacter* y en estados de la Unión Europea la prevalencia en carne de pollo es del 75,8% (Burfoot, *et al.*, 2017); en este sentido, se ha trabajado en políticas que promuevan la regulación sobre el control de aves y faenamiento, tal como ocurre en Tailandia, Reino Unido, Australia y Nueva Zelanda (Sukted *et al.*, 2017).

En Japón en el año 2004, 2.485 personas enfermaron a causa de *Campylobacter* spp. (Takahashi *et al.*, 2006). Mientras que algunos países de la Unión Europea reportaron una prevalencia de *Campylobacter* spp. en carne de pollo de hasta el 83,6%, confirmando en Polonia 1,4 casos/100.000 habitantes (Wieczorek, *et al.*, 2015). En el 2009, Irlanda, reportó 1,808 casos confirmados de campilobacteriosis (O'Mahony, *et al.*, 2011).

En Latinoamérica, Colombia en el 2015, reportó a *Campylobacter* spp. como uno de los principales patógenos causales de morbilidad en niños menores de 5 años (Rodríguez, *et al.*, 2015). Argentina, en el 2013, reportó 2,588.2 casos positivos por cada 100,000 personas (Signorini *et al.*, 2013). Perú en el 2002, asiló *C. jejuni* del 15% de niños menores de dos años que presentaban diarrea en las principales ciudades (Perales, 2002). Brasil, en el 2013, reportó una prevalencia del 5,8% de campilobacteriosis en niños de 0 a 3 años a nivel nacional mediante PCR multiplex (Quetz, *et al.*, 2013). Venezuela reportó una prevalencia del 13% en niños menores de 5 años presentes en cuatro de sus ciudades principales (Urrestarazu, *et al.*, 1999), finalmente Ecuador reportó una prevalencia en niños del 23% (Fernández, 2011).

Técnicas de identificación de *Campylobacter* spp.

Identificación Fenotípica.

La identificación y cuantificación de *Campylobacter* spp. se realiza generalmente mediante el uso de diferentes medios enriquecidos y selectivos (Zweifel, *et al.*, 2015). Los medios de cultivo utilizados para su identificación poseen características selectivas, que permiten el crecimiento de *Campylobacter* spp., e inhiben el crecimiento de flora concomitante; estos son Campy-Cefex agar, mcampy-cefex, Modified charcoal cefoperazone doxycholate agar (mCCDA), entre otros (Omar A. Oyarzabal *et al.*, 2005). La identificación fenotípica de *Campylobacter* spp. se realiza mediante la determinación morfológica de la colonia, fase de contraste al microscopio y pruebas bioquímicas tales como catalasa y oxidasa (Omar A. Oyarzabal *et al.*, 2005).

Identificación Molecular.

El diagnóstico confirmatorio, se realiza mediante métodos moleculares debido a su bajo costo y amplio potencial de aplicación (Jamshidi, *et al.*, 2008). Los métodos moleculares tienen mayor sensibilidad y especificidad que otras técnicas, permitiendo una rápida detección e identificación de cepas de *Campylobacter* spp provenientes de muestras de subproductos de avícolas (Ivanova *et al.*, 2014). Éstos métodos permiten incluso cuantificar de manera precisa la cantidad de cepas de *Campylobacter* presentes en carcasas de pollo contaminadas (Hungaro *et al.*, 2015).

PCR Convencional.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) consiste en amplificar un fragmento de ADN específico (Bolívar, Rojas, & García-lugo, 2014). Esta técnica puede identificar varias especies de *Campylobacter* spp. a partir de muestras de alimento, muestras clínicas y ambientales, sin necesariamente ser previamente cultivadas (Jamshidi *et al.*, 2008).

PCR Multiplex.

Aunque la técnica de PCR convencional permite identificar especies de *Campylobacter* en diferentes sustratos, ésta conlleva mayor tiempo de ejecución porque detecta una sola especie por reacción (Persson & Olsen, 2005)

Técnicas como el PCR multiplex (mPCR) permite identificar varias especies simultáneamente, disminuyendo así costos y tiempos de ejecución en el laboratorio (Barletta *et al.*, 2013; Yamazaki-Matsune *et al.*, 2007). Fue descrita inicialmente el 1988 para la identificación de genes de la distrofia muscular en humanos; su validación requiere ADN o ARN puros a fin de proveerle mayor especificidad a la prueba y por su alta sensibilidad requiere de muestras limpias (Bolívar *et al.*, 2014).

La utilización de mPCR para la identificación de cepas de *Campylobacter* spp. es cada vez más común, para identificar las especies dentro de este género en granjas, carcasas y alimento para aves, lo que brinda confiabilidad a la prueba (Omar A. Oyarzabal *et al.*, 2005; Persson & Olsen, 2005; Poma Vivanco, 2014b)

En el estudio desarrollado por Yamazaki-Matsune *et al.*, en el 2007 desarrollaron un PCR multiplex que identifica los 6 tipos de *Campylobacter* causantes de enteritis o septicemia en humanos tales como: *C. coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *C. jejuni*, *C. lari* y *C. upsaliensis*; basado en la similitud que comparten en el gen 16s RNA (Yamazaki-Matsune *et al.*, 2007).

Barletta y colaboradores a través de su estudio realizado en el 2013, demostraron que el mPCR, también puede realizarse en tiempo real lo que permite disminuir los tiempos y reducir el consumo de reactivos de revelado sin mermar la especificidad y sensibilidad de la prueba (Barletta *et al.*, 2013).

Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE).

Una de las pruebas más utilizadas para la genotipificación de cepas, es la Electroforesis en gel de Campo Pulsado (PFGE), debido a que al separar moléculas grandes de ADN mediante un campo eléctrico característico, permite identificar un patrón de bandas por su peso molecular (Melero *et al.*, 2012).

Polimorfismo de Fragmento Amplificado (AFLP).

Por otro lado, la técnica de Polimorfismo de Fragmento Amplificado (AFLP) permite generar mapas genéticos basados en patrones (Man, 2011) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (PCR *real time*), permite amplificar y cuantificar ADN (Ge *et al.*, 2013; Takahashi *et al.*, 2006).

Reacción en Cadena de la Polimerasa con Análisis del Polimorfismo de los Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP).

La técnica PCR-RFLP PCR, se basa en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción de ADN cromosómico para la tipificación genética y diferenciación de cepas bacterianas genéticamente relacionadas (Duum *et al.*, 1999). Los PCR-RFLP son ampliamente utilizados, puesto que no requieren de gran cantidad de equipos, además de ser rápidos y baratos (Nebola & Steinhauserova, 2006). El uso de los polimorfismos de fragmentos de restricción específicos (RFLP) ha sido limitado únicamente a análisis epidemiológicos específicos de infecciones por *Campylobacter* (Geilhausen, *et al.*, 1990).

Entre las desventajas de los RFLP están el requerir de endonucleasas específicas para la identificación de fragmentos, no es específica para un genotipo exacto en caso de que este tenga más de un sitio de reconocimiento por variación de nucleótidos, requiere de tiempo y no se recomienda para análisis de alto rendimiento (Berg, 2012).

Los genes específicos para identificación de especies de *Campylobacter* mediante RFLP son los genes de flagelina *flaA* y *flaB*, los mismos que se encuentran dispuestos en tándem, siendo una región variable y altamente conservada formada por un producto de 702pb, ubicados a nivel flagelar (Ayling, *et al.*, 1996; Nebola & Steinhauserova, 2006). Estos genes son altamente conservados, y se encuentran separados por alrededor de 170 nucleótidos, permitiendo la caracterización genotípica entre especies de *Campylobacter* (Takahashi *et al.*, 2006).

Varias endonucleasas de restricción pueden ser usadas para el análisis de genes *flaA* como son Ddel, HinfI, EcoRI, AfaI, MboI, HaeIII; éstas endonucleasas

permiten identificar diversos patrones y serotipos de *C. jejuni* y *C. coli* en especial aquellos emparentados genotípicamente entre humanos y aves (Tsai, *et al.*, 2006).

Experimentalmente el procedimiento RFLP puede dividirse en cinco pasos: extracción de ADN, amplificación del fragmento que contiene la variación (gen *flaA* y *flaB* por PCR), tratamiento del fragmento amplificado con la enzima de restricción, identificación de la formación de fragmentos de restricción, separación por electroforesis de los fragmentos e identificación de alelos mediante análisis de los RFLP por software adecuado (Berg, 2012; Cunha & Inácio, 2015).

CAPITULO IV

METODOLOGIA

Descripción de la zona de estudio.

El estudio se realizó en el Distrito Metropolitano de Quito, durante los meses de noviembre a abril del presente año. La ciudad está ubicada a 2830 m.s.n.m., con un área de 4183 Km², una temperatura oscilante de 10 a 25°C y una población aproximada de 2,6 millones de habitantes.

Diseño del estudio.

Se realizó un estudio de diseño no experimental, transversal y descriptivo. La estimación del tamaño de muestra se basó en el protocolo de muestreo del proyecto WHO AGISAR, tomando en cuenta el consumo de carne de pollo, número de habitantes del Distrito Metropolitano de Quito y el tiempo de duración del estudio (16 semanas). La población objeto de estudio se conformó por un total de 135 muestras de carcasas de pollo en percha (n= 135) provenientes de 6 supermercados y 2 mercados locales dentro del Distrito Metropolitano de Quito. Las muestras se identificaron mediante códigos alfanuméricos, que correspondieron a 4 marcas de pollo empacado diferentes. En el caso de mercados abiertos y despensas se tomaron en cuenta marcas de pollo empacado y sin marca. Se colectó un segmento de piel de aproximadamente 25 g de peso, correspondiente al área pectoral de las cuales se realizó la cuantificación de UFC de *Campylobacter* spp., y posteriormente se respaldó dos colonias bien definidas, las cuales se re aislaron en agar sangre y se respaldaron en criotubos con sangre ovina desfibrinada para su conservación a -80°C. A la par de ese procedimiento se realizó un lisado celular en solución TE 1X (tris+EDTA) para extraer el DNA. Cada tubo con DNA fue cifrado y almacenado a -20°C para su tipificación molecular a nivel de especie por PCR multiplex, la presencia del gen flagelar mediante fla-PCR y la subtipificación de *C. coli* y *C. jejuni* a través de los RFLP (Habib, Uyttendaele, & De Zutter, 2011).

Manejo del estudio.

Fase de Campo:

La toma de muestras se realizó mediante la adquisición de las carcasas de pollos en perchas de supermercados y mercados abiertos del Distrito Metropolitano de Quito, las mismas que se colocaron en una bolsa plástica individual por muestra, se almacenaron y mantuvieron en refrigeración para transportarlas al laboratorio de la UNIETAR.

Se tomaron 3 muestras en supermercado, más 5 muestras en mercados y despensas por semana ubicados al sur y norte del Distrito Metropolitano de Quito, siendo un total de 48 muestras en supermercado (n=48) y 88 muestras en mercados abiertos y despensas (n= 88), durante las 16 semanas del estudio.

Fase de Laboratorio

Cuantificación y Aislamiento de *Campylobacter* spp.:

Para el proceso de cuantificación y aislamiento de *Campylobacter* spp. a partir de muestras de carcasas de pollos, fue necesario estimar la cantidad de células bacterianas a ser extendidas en la superficie del medio a través de diluciones. La cuantificación se realizó a 3 diluciones diferentes por duplicado (10^{-1} , 10^{-2}) en el medio Rapid Campylobacter®, a través de siembra por extensión en placa con asa de Digralsky (Habib et al., 2011).

Preparación de diluciones:

Se tomó un segmento de piel de 25 g, se le agregó 225 ml de agua peptonada obteniendo una dilución 10^{-1} ; posteriormente la muestra se homogenizó en el Stomacher® por 60 segundos. Se tomó 1 ml de la dilución 10^{-1} añadiéndolos en 9 ml agua peptonada obteniendo una dilución 10^{-2} .

Extensión en placa de las diluciones.

Se inocularon 500 µl por duplicado de las diluciones 10^{-1} en el medio Agar Rapid Campylobacter (RC) mientras que para la dilución 10^{-2} se tomaron 100 µl de la dilución 10^{-1} . Las mismas que se incubaron a 42 °C por 48 horas en condiciones

de microaerofilia, con una bomba de vacío y un tanque de gas 92% DE N₂, 8% DE CO₂ (Habib et al., 2011).

Cuantificación y respaldo.

Se realizó la cuantificación respectiva (UFC) de las muestras sembradas en agar RC, registrando fotográficamente las cajas seleccionadas; de éstas se seleccionaron 2 colonias (A y B) realizando un reislamiento en agar sangre ovina e incubando en microaerofilia a 37°C por 24 - 48 horas, el crecimiento fue recuperado con asa y respaldado en 700 µl de sangre desfibrinada de ovino para su almacenamiento y conservación a -80°C.

Extracción de ADN.

De las colonias A y B re aisladas en agar sangre se tomó una colonia con el asa microbiológica de 1µl llenando la totalidad de la cúpula, se diluyó en 300 µl de TE 1X (tris+EDTA), se llevó al termobloque a 96°C durante 20 minutos a 150 r.p.m., se centrifugaron los lisados a 13000 r.p.m. por 3min, se tomaron 200 µl del sobrenadante dispensándolo en un nuevo tubo Eppendorf® y se descartó el pellet formado. Los lisados se cifraron y almacenaron a -20°C.

Pre-PCR.

Se realizó un master mix según el protocolo establecido por On y Vandamme, a un volumen final de 25 µl (24 µl de mastermix +1µl de templado de DNA) (*C. coli* F (5'-AGGCA AGG GAG CCT I T A ATC-3') *C. coli* R (5'-TAT CCC TAT CTA CAA ATT CGC-3') y primer *C. jejuni* F (5'-CA TCT TCC CTA GTC AAG CCT-3'),*C. jejuni* R (5'-AAG ATA TGGCTC TAG CAA GAC-3') (Ver **ANEXO 5**), al cual se le sometió al siguiente programa: 94°C durante 5 min seguido por 40 ciclos de: 1 minuto a 94 °C (desnaturalización), 1 minuto a 64 °C (hibridación), 1 minuto a 72 °C (elongación) y finalmente 10 minutos a 72 °C (extensión final). Los fragmentos amplificados fueron de 349 pb y 773 pb para *C.coli* y *C. jejuni* respectivamente (Ver **ANEXO 5**) (On & Vandamme, 1997).

Electroforesis.

Los amplicones se observaron en un gel de agarosa al 1%, teñidos con 1 µl de Sybr safe® por cada 10ml de la solución, con un voltaje de 90 V/ 400 mA/ 30 min. Los resultados se visualizaron en un transiluminador y se documentaron en un sistema digital fotográfico.

PCR gen *flaA*.

Se siguió el protocolo descrito por Cunha & Inácio en el 2015, utilizando los primers A1F: 5'-GGATTT CGT ATT AAC ACA AAT GGT GC-3' y A2R: 5'-CTG TAG TAA TCT TAA AAC ATT TTG-3', con un volumen final de reacción de 25 µl (Ver **ANEXO 3**), siguiendo las siguientes condiciones de termociclado: 1 minuto a 94 °C (desnaturalización), seguido de 30 ciclos de: 15 segundos a 94 °C, 45 segundos a 45 °C y 150 segundos a 72 °C (hibridación) y finalmente 5 minutos a 72 °C (extensión) (Cunha & Inácio, 2015). El tamaño del fragmento esperado fue de 1728 pb.

PCR-RFLP.

Después de la amplificación, los productos de ADN (amplicones) fueron digeridos con la enzima de restricción Ddel (FastDigest,). La digestión se realizó a un volumen final de 20,5µl (20µl de producto amplificado y 0,5 µl de enzima Ddel). Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37°C (Cunha & Inácio, 2015).

Se tomaron 20,5 µl del producto de la digestión, los cuales se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con 5µl de colorante de carga (5X verde GoTaq Flexi Buffer) a un voltaje de 100V, 600 mA durante 2 horas. Las bandas se detectaron con SYBR® Safe y un marcador de peso molecular de 100 pb.

Procesamiento de datos.

Los datos obtenidos de los procesos se ingresaron en una base de datos única, en la cual se incluyó los siguientes datos: número de muestra, procedencia, cuantificación, aislamiento, determinación molecular de especie, determinación de gen flagelar, y RFLP. Para la determinación de patrones de similitud genética se realizó un dendograma utilizando el programa BioNumerics®.

Análisis de datos.

Los resultados obtenidos de las cuantificaciones, aislamiento de colonias, respaldo, extracción de ADN, PCR multiplex, FlaA-PCR y RFLP de las muestras de carcasas de pollo en percha obtenidas en el muestreo se ingresaron en una hoja de cálculo de Microsoft Excel® con el fin de poder realizar comparación de las cuantificaciones y géneros aislados entre los puntos críticos de control a través de un análisis de varianza (ANOVA).

Análisis estadístico.

Se realizó un estudio de estadística básica descriptiva para determinar la varianza de las cuantificaciones y especies de *Campylobacter* spp. determinadas.

CAPITULO V

RESULTADOS

Para el proceso de determinación de muestras positivas a crecimiento de *Campylobacter* spp. se observó la formación de colonias rojizas en agar RC (ver figura 1) incubadas en microaerofilia a 42°C por 48H00 de las muestras sembradas en diluciones 10^{-1} y 10^{-2} .

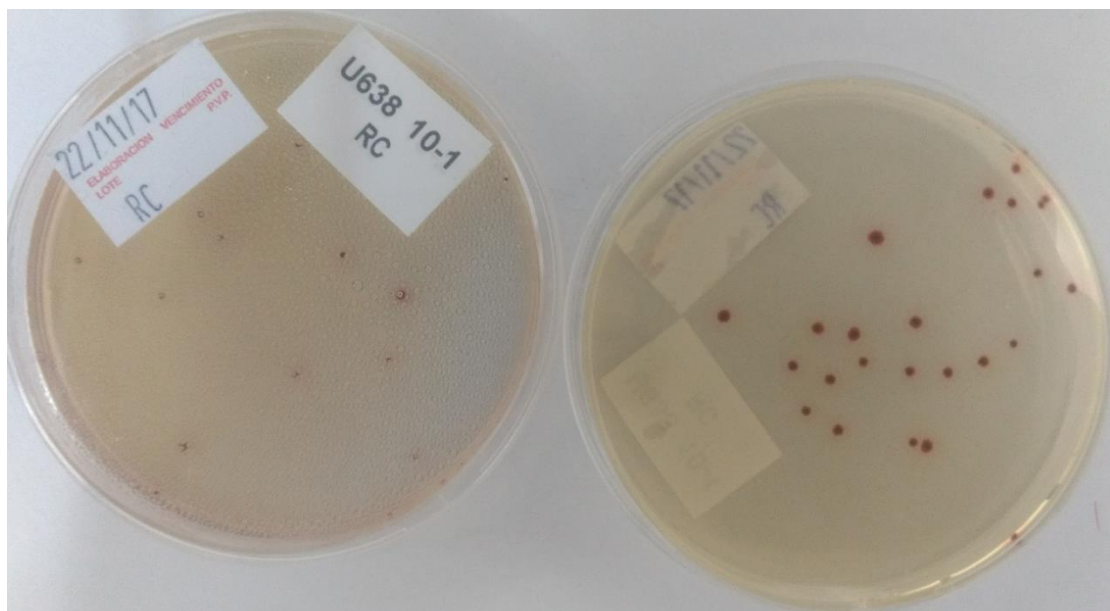


Figura 1 Colonias de color rojizo en agar RC después de incubación a 42°C por 48H00, el crecimiento es característico de colonias de *Campylobacter* spp.

De un total de 135 muestras recolectadas en 17 semanas (n= 135), 71 al norte (n= 18 en mercado, n= 26 supermercado, n= 27 en tercenas) y 64 al sur (n= 16 en mercado, n= 24 en supermercado, n= 24 en terciena) (ver figura 2). Se registraron 104 muestras positivas de aislamiento a *Campylobacter* spp. (n= 104) 53 en sector norte (n= 16 mercados, n= 16 en supermercados, n= 21 en tercenas) y 51 en el sector sur (n= 15 mercados, n= 13 en supermercados, n= 23 en tercenas) (ver tabla 1), representando el 77.04% del total.

Sector	Total MERCADO	Total TIENDA	Total SUPERMERCADO	Total general
Norte	16	21	16	53
Sur	15	23	13	51
Total general	31	44	29	104

Tabla 1. Número total de muestras positivas a *Campylobacter* spp. en carcasas de pollo en percha en supermercados, mercados y tercenas de dos zonas (Norte y Sur) del distrito metropolitano de Quito.

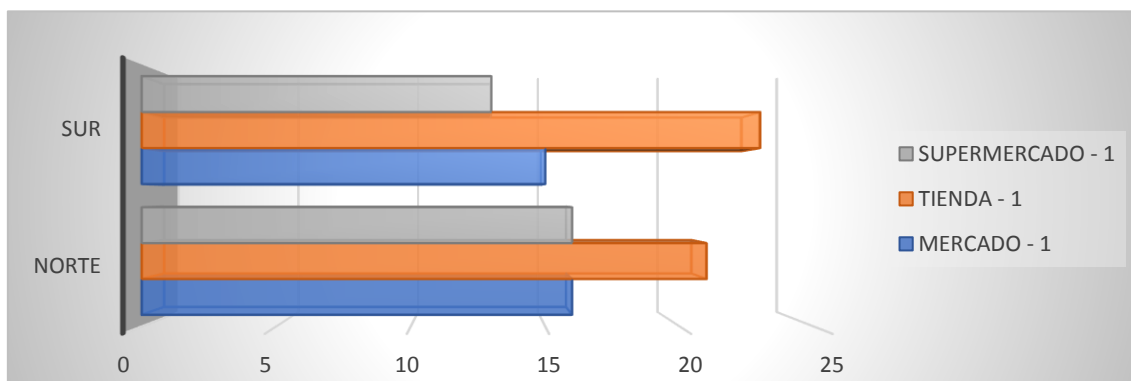


Figura 2. Representación del total de muestras positivas al aislamiento de *Campylobacter* spp. en carcasas de pollo en percha en supermercados, mercados y tercenas de dos zonas (Norte y Sur) del distrito metropolitano de Quito.

Cuantificaciones:

Se realizó la cuantificación de las muestras positivas a *Campylobacter* spp. en agar RC, obteniendo los promedios de UFC/g de cada sector, y punto de muestreo. Las sumas totales fueron expresadas en log₁₀ (ver tabla 2).

	Aislamientos positivos	Total UFC/g	Total UFC/g log ₁₀
MERCADO	31	67910	4,8
Norte	16	38610	4,6
Sur	15	29300	4,5
TIENDA	44	35680	4,6
Norte	21	16160	4,2
Sur	23	19520	4,3
SUPERMERCADO	29	23190	4,4
Norte	16	13960	4,1
Sur	13	9230	4,0
Total	104	126780	5,1

Tabla 2. Resultados totales de la cuantificación de *Campylobacter* spp. de los aislamientos positivos en agar RC.

Prueba de Normalidad:

- El análisis se lo realizó mediante la aplicación de la prueba Shapiro-Wilk (menos de 50 casos), la cual determino la normalidad de los datos de *Campylobacter* spp (ver tabla 3).

	Minoreo	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Log_10	Supermercados	,942	29	,114
	Tiendas	,978	44	,541
	Mercados	,961	31	,315

Tabla 3. Prueba de normalidad de la carga bacteriana de *Campylobacter* spp. en los distintos puntos de muestreo.

Por consiguiente, se cuenta con normalidad en los datos.

Análisis de Diferencias Significativas.

Al existir normalidad entre los datos, se realizó un Análisis de Varianza de un factor (ANOVA) a un IC del 95% y 0.5 de error (ver tabla 4). El análisis identificó la existencia de diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en la cuantificación de *Campylobacter* spp. entre mercados, supermercados y despensas.

Log_10	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	6,468	2	3,234	5,564	0,005
Dentro de grupos	58,704	101	0,581		
Total	65,172	103			

Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de muestreo IC95% y 0.5 error

Además, se realizó la prueba HSD Tukey como prueba post hoc. La prueba determinó una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en cuanto a la cuantificación de *Campylobacter* spp. entre supermercados y mercados de todo el muestreo. No se encontró diferencias en cuanto a tiendas (ver tabla 5).

Pruebas post hoc - Comparaciones múltiples						
Comparaciones múltiples , Variable dependiente, Log_10						
log_10	(I) Minoreo	(J) Minoreo	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	Supermercados	Tiendas	0,182	0,162	-0,7692	0,0983
		Mercados	0,197	0,003	-1,1255	-0,1885
	Tiendas	Supermercados	0,182	0,162	-0,0983	0,7692
		Mercados	0,179	0,175	-0,7468	0,1037
	Mercados	Supermercados	0,197	0,003	0,1885	1,1255
		Tiendas	0,179	0,175	-0,1037	0,7468

Tabla 5. **Pruebas post hoc** HSD Tukey para determinar significancia
*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Prueba de normalidad de datos por sector.

Se realizó las pruebas de normalidad por sector (Norte y Sur). la cual determino la normalidad de los datos de *Campylobacter* spp. en el sector Norte (ver tabla 9), y en el sector Sur (ver tablas 6 y 7)

Normalidad Norte.

	Minoreo	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Log_10	Supermercados	,952	16	,524
	Tiendas	,975	20	,850
	Mercados	,912	15	,147

Tabla 6. Prueba de normalidad de la carga bacteriana de *Campylobacter* spp. en los distintos puntos de muestreo en

Normalidad Sur.

	Minoreo	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Log_10	Supermercados	,922	13	,269
	Tiendas	,978	24	,861
	Mercados	,972	16	,869

Tabla 7. Prueba de normalidad de la carga bacteriana de *Campylobacter* spp. en los distintos puntos de muestreo en el sector sur.

Análisis de Diferencias Significativas por Sector (Norte y Sur).

Se realizó un Análisis de Varianza de un factor (ANOVA) a un IC del 95% y 0.5 de error de los sectores Norte y Sur (ver tablas 8 y 9). El análisis identificó la existencia de diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en la cuantificación de *Campylobacter* spp. entre mercados, supermercados y despensas del sector Norte y del Sur.

Sector Norte.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3,118	2	1,559	2,434	0,098
Dentro de grupos	30,746	48	0,641		
Total	33,864	50			

Tabla 8. Análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de muestreo en el sector norte.

Sector Sur.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3,522	2	1,761	3,192	0,05
Dentro de grupos	27,585	50	0,552		
Total	31,108	52			

Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de muestreo en el sector sur.

Pruebas de normalidad de datos entre sectores.

Se realizó las pruebas de normalidad entre los sectores Norte y Sur, la cual determino la normalidad de los datos de *Campylobacter* spp (ver tabla 13).

Normalidad Norte vs Sur.

Log_10	Tratamiento	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
	Norte-Super	,952	16	,524
	Norte-Tienda	,975	20	,850
	Norte-Mercado	,912	15	,147
	Sur-Super	,922	13	,269
	Sur-Tienda	,978	24	,861
	Sur-Mercado	,972	16	,869

Tabla 10. Prueba de normalidad de la carga bacteriana de *Campylobacter* spp. en los distintos puntos de muestreo entre el sector norte y sur.

Análisis de Diferencias Significativas entre Sectores (Norte y Sur).

Se realizó un Análisis de Varianza de un factor (ANOVA) a un IC del 95% y 0.5 de error entre los sectores Norte y Sur (ver tabla 11). El análisis identificó la existencia de diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en la cuantificación de *Campylobacter* spp. entre los sectores Norte y Sur.

Log_10	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	6,841	5	1,368	2,299	,051
Dentro de grupos	58,331	98	,595		
Total	65,172	103			

Tabla 11. Análisis de varianza (ANOVA) entre grupos de muestreo entre sectores norte y sur.

PCR multiplex.

Se realizó la PCR multiplex del total de cepas de *Campylobacter* spp. aisladas en agar RC (n= 104). En total se obtuvo 65 aislados positivos a *C. coli* (364 pb) y 36 aislados positivos a *C. jejuni* (773 pb) (ver figura 3).

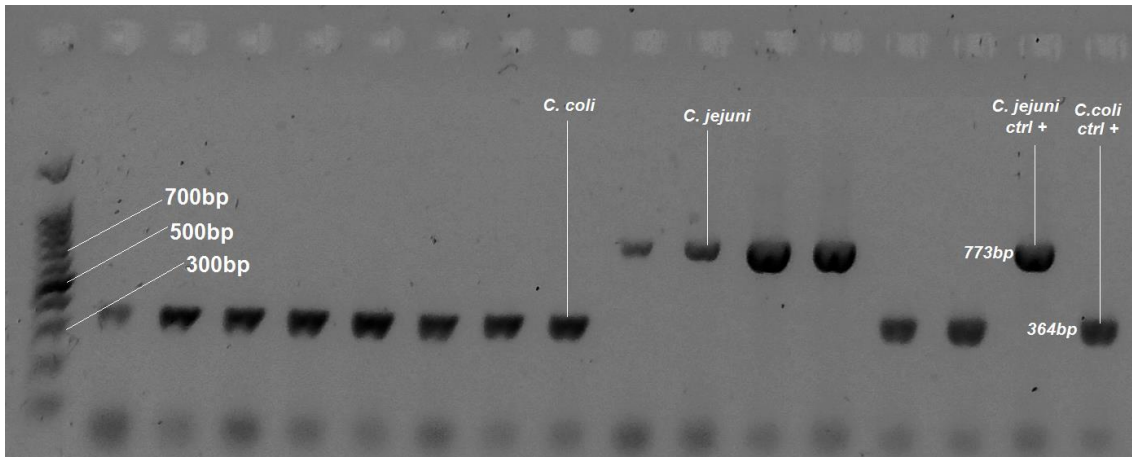


Figura 3. Resultado de la electroforesis en gel de agarosa mostrando las bandas específicas para *Campylobacter jejuni* y *Campilobacter coli*. Se muestra una escalera (ladder) de 100bp, control positivo para *C. coli* (364bp) y control positivo para *C. jejuni* (773bp).

FlaA PCR.

Se realizó el PCR del gen *flaA* de las cepas positivas a *C. coli* (n= 65) y *C. jejuni* (n= 36). De las 104 muestras analizadas, 101 amplificaron para el gen (1728 pb) (ver figura 4).

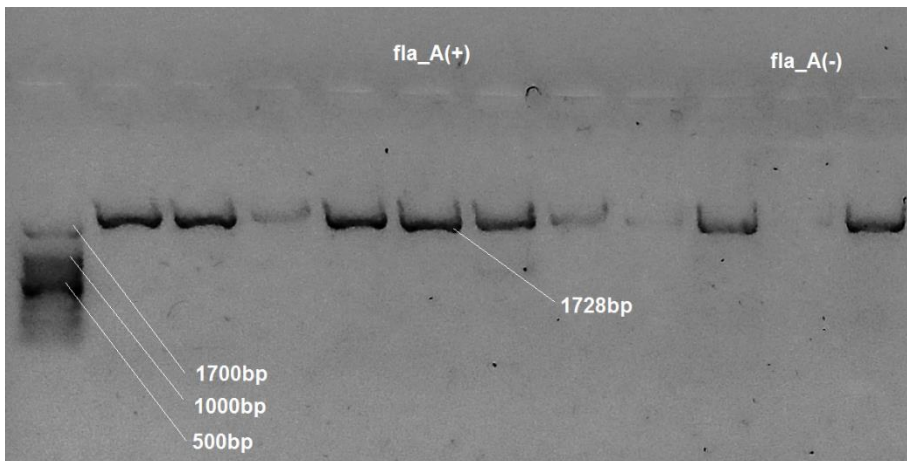


Figura 4. Resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando las bandas específicas para la amplificación del gen *fla_A* de *Campylobacter jejuni* y *Campilobacter coli*. Se muestra una escalera (ladder) de 100bp, las muestras positivas marcarán bandas específicas (1728bp).

RFLP.

Se realizó la genotipificación y diferenciación de la cepa de *Campylobacter coli* y *C. jejuni*, mediante la técnica de RFLP (ver figura 5). Se analizó la relación genética a través de dendogramas.

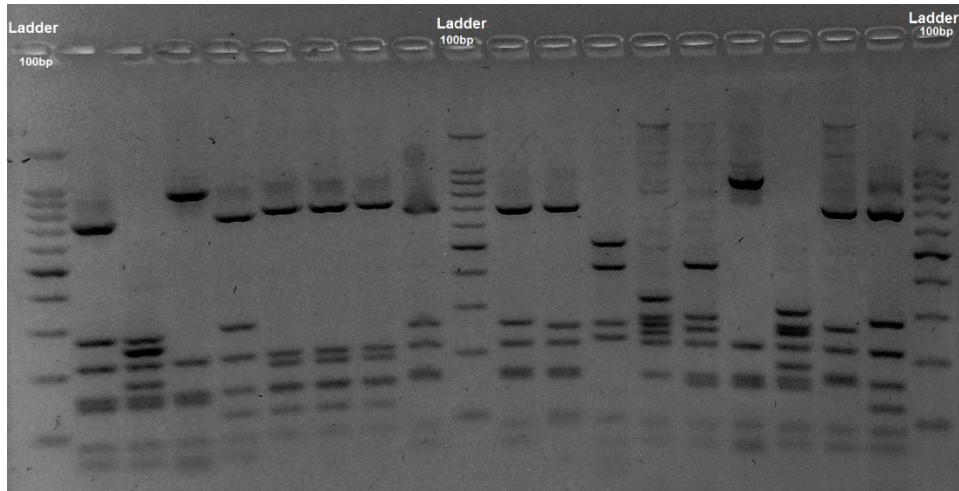


Figura 5. Resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 2% mostrando el perfil PCR-RFLP de los fragmentos digeridos con endonucleasa Ddel, en el centro y los extremos se muestra el Ladder de 100pb utilizadas como marcador molecular.

Los dendogramas revelaron la relación genotípica entre las cepas *C. coli*, y *C. jejuni* aisladas de los diferentes puntos de muestreo (ver figura 6 y 7).

C. coli

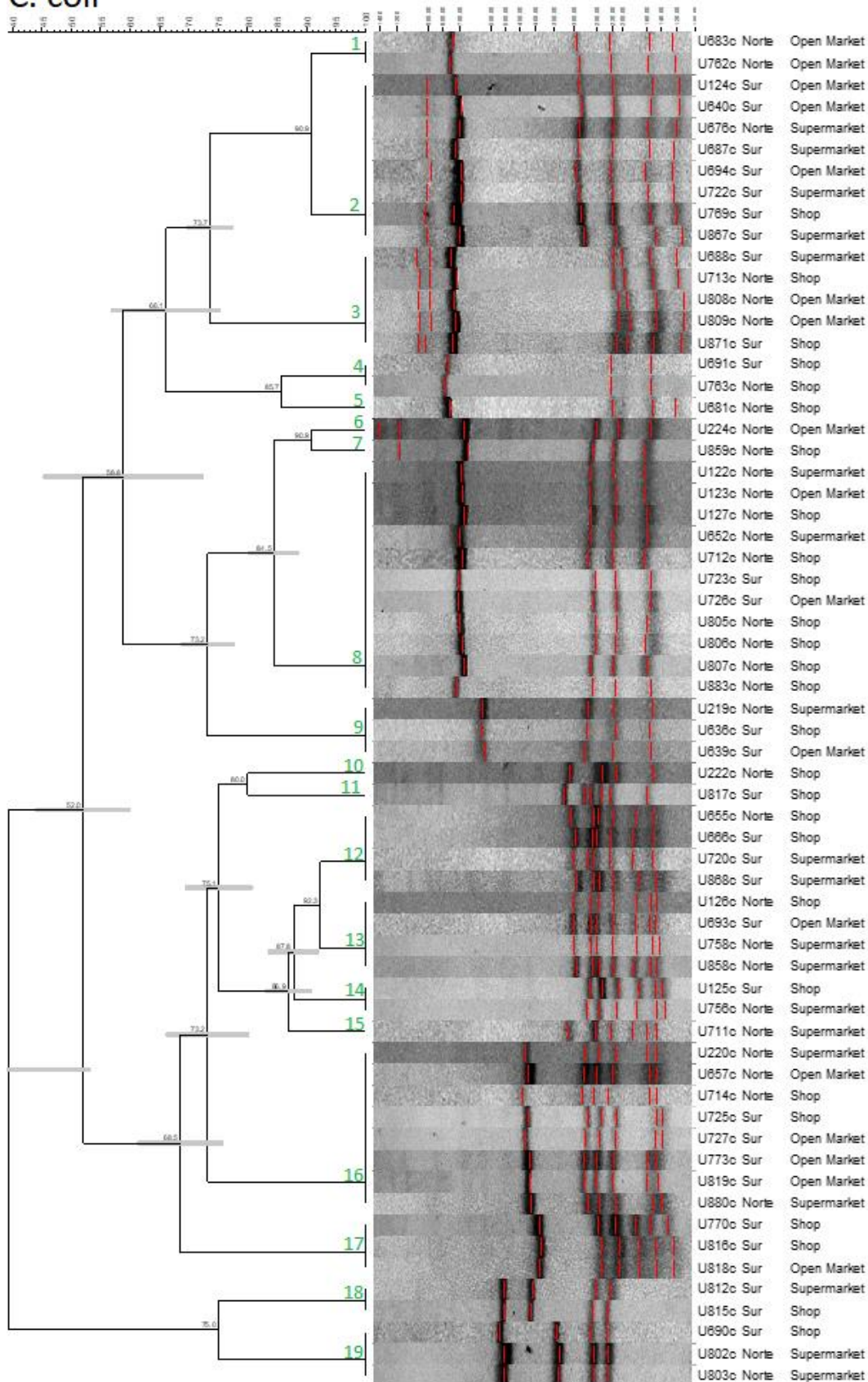


Figura 6. Dendrograma basado en el análisis genotípico (1% de optimización, 1,5% de tolerancia), muestra la diversidad de cepas y genotipos aislados (n=19) de *C. coli* en los distintos puntos de muestreo.

C. jejuni

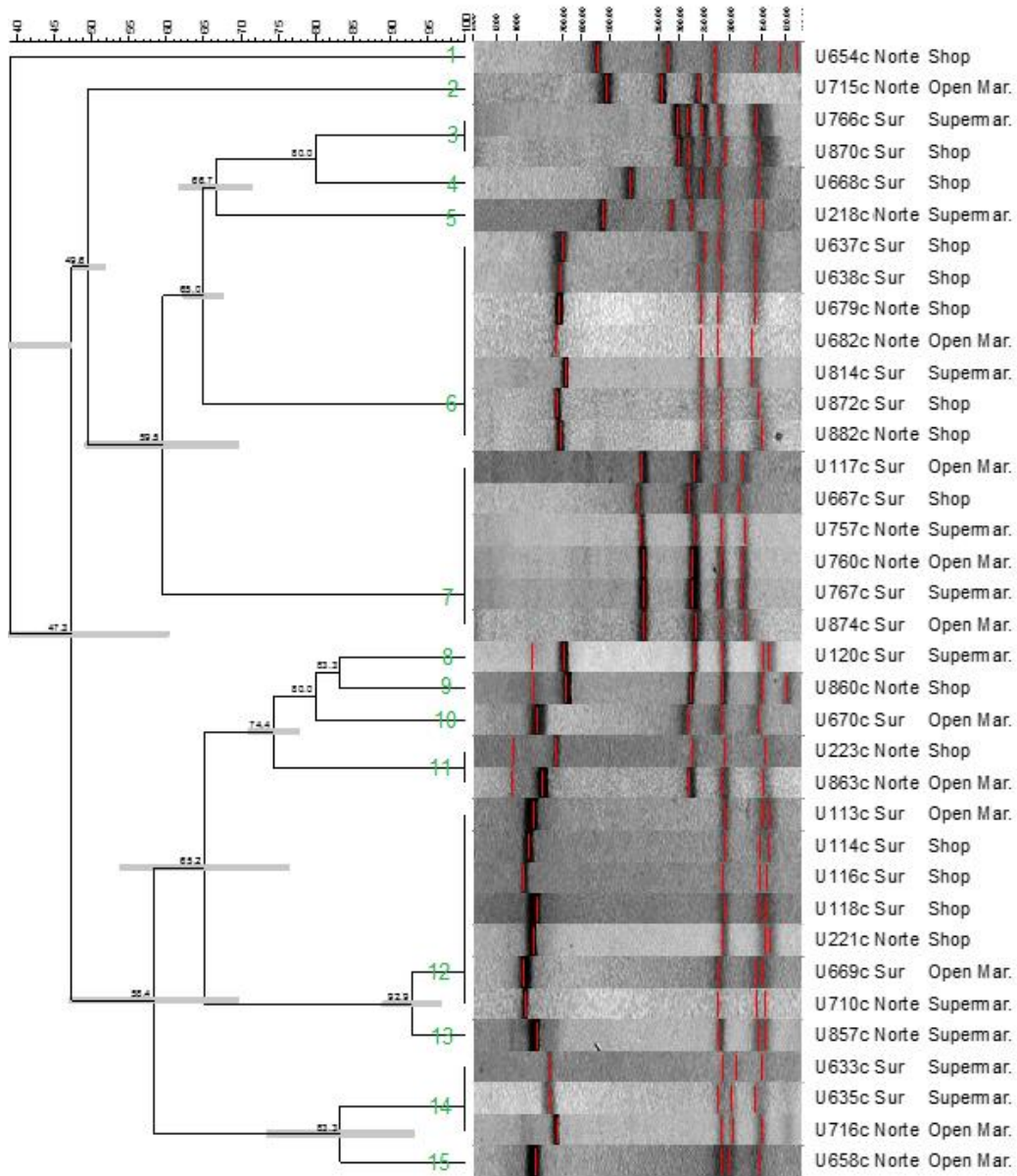


Figura 7. Dendrograma basado en el análisis genotípico (1% de optimización, 1,5% de tolerancia), muestra la diversidad de cepas y genotipos aislados(n=15) de *C. jejuni* en los distintos puntos de muestreo

Se identificaron 19 genotipos entre los 63 aislamientos de *C. coli*, siendo el genotipo 8 el más prevalente, con el 17,5% (n= 11/63). Los genotipos 5, 6, 7 y 15 presentaron el 1,6% cada uno respectivamente, es decir solamente un aislado por genotipo (n= 1/63 cada uno). El resto de genotipos (1, 2, 3, 4, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18 y 19) presentaron porcentajes variados tal como se observa en la tabla 12.

Genotipos definidos de <i>Campylobacter coli</i>					
Genotipo	Mercado	Supermercado	Tienda	total	%
	total	total	total		
1	2	0	0	2	3,2%
2	3	4	1	8	12,7%
3	2	1	2	5	7,9%
4	0	0	2	2	3,2%
5	0	0	1	1	1,6%
6	1	0	0	1	1,6%
7	0	0	1	1	1,6%
8	2	2	7	11	17,5%
9	0	1	1	3	4,8%
10	0	0	1	1	1,6%
11	0	0	1	1	1,6%
12	0	2	2	4	6,3%
13	1	2	1	4	6,3%
14	0	1	1	2	3,2%
15	0	1	0	1	1,6%
16	4	2	2	8	12,7%
17	0	1	2	3	4,8%
18	0	1	1	2	3,2%
19	0	2	1	3	4,8%
Total	15	20	27	63	100,0%

Tabla 12. Resultados de los patrones de bandas determinando los genotipos presentes de *C. coli* en los puntos de muestreo y las zonas norte y sur.

Se identificaron 15 genotipos entre los 36 aislamientos de *C. jejuni*, siendo los genotipos 6 y 12 los más prevalentes, con el 19,4% (n= 7/36). Los genotipos 1, 2, 4, 8, 9, 10 y 13 presentaron el 1,6% cada uno respectivamente, es decir solamente un aislado por genotipo (n= 1/36 cada uno). El resto de genotipos (3, 5, 7, 11, 14 y 15) presentaron porcentajes variados tal como se observa en la tabla 13.

Genotipos definidos de <i>Campylobacter jejuni</i>					
Genotipo	Mercado	Supermercado	Tienda	total	%
	total	total	total		
1	0	0	1	1	2,8%
2	1	0	0	1	2,8%
3	0	1	1	2	5,6%
4	0	0	1	1	2,8%
5	0	1	0	1	2,8%
6	1	1	5	7	19,4%
7	3	2	1	6	16,7%
8	0	1	0	1	2,8%
9	0	0	1	1	2,8%
10	1	0	0	1	2,8%
11	1	0	1	2	5,6%
12	2	1	4	7	19,4%
13	0	1	0	1	2,8%
14	1	2	0	3	8,3%
15	1	0	0	1	2,8%
total	11	10	15	36	100,0%

Tabla 13. Resultados de los patrones de bandas determinando los genotipos presentes de *C jejuni* en los puntos de muestreo y las zonas norte y sur.

CAPITULO VI

Discusión

El objetivo del presente estudio fue el de cuantificar, e identificar fenotípica y genotípicamente, aislados de *Campylobacter* spp. a partir de muestras de carcasas de pollos en percha en la ciudad de Quito.

El uso de medios específicos y cromógenos como el agar Rapid Campylobacter® (RC) en condiciones de microaerofilia, ha demostrado ser efectivo para el aislamiento y cuantificación de *Campylobacter* spp. (Falcon, 2015). En este contexto, Seliwiorstow y colaboradores en el 2015, identificaron en su estudio, la presencia de colonias típicas de *Campylobacter* spp., cuantificándolo en un medio específico en diversas etapas de la línea de producción, evidenciando la utilidad de este tipo de medios para identificación morfológica de colonias de *Campylobacter* ssp. (Seliwiorstow, Baré, Van Damme, Uyttendaele, & De Zutter, 2015).

La cuantificación es un método adecuado y fiable para la determinación de la prevalencia de un patógeno y su efecto en la salud pública (Habib et al., 2011) . En el estudio realizado por Berghaus y colaboradores en el 2013 se determinó una prevalencia de *Campylobacter* spp del 70,8% mediante la cuantificación de carcasas, superando a la presencia de *Salmonella* en dichas muestras (Berghaus et al., 2013).

En el estudio realizado por Berrang y colaboradores en el 2007 en los EEUU, se demostró mediante cuantificación e identificación de morfología de colonia en agar Campy-cefex®, una prevalencia de 2,66 log¹⁰ UFC/ml de *Campylobacter* spp., a partir de lavados de carcasas de pollos en 20 plantas de procesamiento (Berrang et al., 2007). La prevalencia varió, dependiendo de la cantidad de cloro en el agua y del tiempo de enfriamiento previo a la salida del producto a percha (Berrang et al., 2007).

A fin de conocer la cantidad de microorganismos presentes a nivel de las carcasas de pollo, Berrang y Dickens en el 2000, en su estudio determinaron la presencia y nivel de *Campylobacter* spp. en carcasas de pollos de engorde en

plantas de procesamiento. Esta investigación demostró la prevalencia de esta bacteria, mediante el conteo de colonias específicas de *Campylobacter spp.*, confirmando posteriormente las cepas, mediante métodos moleculares. Los niveles de *Campylobacter spp.* presentes en las carcasas de pollos durante la línea de procesamiento, fueron disminuyendo de 4,7 log₁₀ UFC/ml a 1,5 log₁₀ UFC/ml teniendo así presencia del patógeno al final de la línea de producción con un alto índice de riesgo al consumidor final (Berrang & Dickens, 2000).

Según la EFSA (European Food Safety Authority) cargas menores a 1000 UFC/g (3,0 log₁₀ UFC/g), disminuyen hasta en un 50% el riesgo de contraer una infección, y cargas de 500 UFC/g (2,7 log₁₀ UFC/g), disminuirían esta probabilidad, hasta en un 90% (Efsa, 2011).

En los mercados de las dos zonas geográficas de muestreo en nuestro estudio, se determinaron cargas bacterianas de 4,6 log₁₀ UFC/g en el norte y de 4,5 log₁₀ UFC/g en el sur. Estos datos difieren de los reportados por Habib, et al., en el 2008, quienes demostraron una cuantificación menor de *Campylobacter spp.*, a razón de 2,2 log₁₀ UFC/g en muestras tomadas de diferentes zonas de las carcasas, tales como alas, piernas, muslos y pechugas (Habib et al., 2008). Las cargas determinadas podrían atribuirse a las condiciones de manejo sanitario de las carcasas, la interrupción de la cadena de frío en los sitios de expendio y la exposición a condiciones ambientales adversas.

A nivel de tercenas se determinaron cargas de 4,2 log₁₀ UFC/g en el norte y 4,3 log₁₀ UFC/g en el sector sur. Estos resultados difieren un poco de los determinados en mercados, pero que se encuentran relacionados al estudio de Scherer, et al., en el 2006, quienes obtuvieron cargas de 4,2 log₁₀ UFC/g a partir de piernas de pollo muestreadas en lugares de expendio de carne al por menor (Scherer et al., 2006). Los autores concluyen que a pesar de que la carne al por menor requiere de enriquecimiento previo debido a los niveles mínimos detectables que podría tener *Campylobacter spp.*, esta sería más propensa a contaminarse en la faena, y posteriormente transmitir al consumidor (Scherer et al., 2006). De manera similar, el estudio de Sasaki et al., durante 2014, identificaron niveles de *Campylobacter spp.* de 3,8 log₁₀ UFC/g a partir de

carcasas obtenidas de pollos procedentes de plantas de faenamiento comerciales; Sasaki y colaboradores resaltan que la prevalencia de *Campylobacter* spp. se mantiene desde sus inicios de contaminación en granja en despresados que se venden al minoreo (Sasaki et al., 2014). De acuerdo al estudio realizado por Sampers et al., en el 2008, demostraron que cerca del 1,68 \log_{10} UFC/g presentes en carne de pollo expuesta a la venta, podría deberse a las prácticas de manufactura aplicadas tanto en la planta de faenamiento como en los centros de acopio, pudiendo aumentar al someter el producto a condiciones adversas de humedad y temperatura así como también disminuir, por mantener una cadena de frío estándar tanto en la venta como en el almacenamiento de derivados cárnicos (Sampers et al., 2008).

La ligera disminución de la carga en relación con las de mercado, podría deberse a que las carcasas se encuentran generalmente en refrigeración o congelación. Esto lo demostró El-shibiny y colaboradores en el 2009, quienes observaron y monitorearon a *Campylobacter* spp., en piel de pollo de engorde, estableciendo una disminución de casi 5 \log_{10} UFC/cm² al congelar o refrigerar los pollos por más de 9 días (El-shibiny et al., 2009); sin embargo la manipulación de las mismas continúa siendo inadecuada al tomarlas con las manos sin protección y juntar carcasas sin empacar, con las empacadas dentro de un mismo refrigerador.

En los supermercados se obtuvieron cargas de *Campylobacter* spp. de 4,1 \log_{10} UFC/g en el norte y 4,0 \log_{10} UFC/g en el sur. Estos resultados difieren con los datos obtenidos del estudio de Figueroa, et al., en el año 2009, quienes cuantificaron niveles de *Campylobacter* spp. de 2 y 1,6 \log_{10} UFC/g, a partir de muestras de piel de cuello y pechuga de carcasas de pollo respectivamente, llevadas a expendio desde distintas plantas de faenamiento en Chile. Los investigadores además realizaron un análisis de los puntos críticos de control de dichas procesadoras, obteniendo cargas de *Campylobacter* spp. de 3,3 y 7,7 \log_{10} UFC/g, siendo el mayor número de UFC, después de la evisceración, y el menor posterior al enjuague (Figueroa et al., 2009). Como se puede evidenciar en este estudio, existiría una disminución evidente en la carga de *Campylobacter* spp., dependiendo del punto de muestreo. En nuestro estudio, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la carga de *Campylobacter* spp.

de mercados y supermercados, por lo que se podría inferir que cargas altas a nivel de expendio, estarían relacionadas a factores como el manejo de la cadena de frío y las carcasas empacadas a nivel de supermercado.

La identificación molecular de las especies de *Campylobacter* spp. mediante PCR múltiple, ha demostrado ser un método eficaz y confiable. Esto se evidencia en el estudio de Habib, et al., en el 2008, donde mediante esta técnica, identificaron 73,1% de las cepas de *C. jejuni* aisladas directamente de carne de pollo, y el 66,4% aisladas de cultivos selectivos (Habib et al., 2008). De la misma manera, Johannessen, et al., en el 2007, determinaron molecularmente la presencia predominante de *C. jejuni* y *C. coli* a partir de hisopados cloacales, y de *C. jejuni* a partir de muestras de carcasas de pollos, (Johannessen et al., 2007).

En nuestra investigación, de un total de 104 aislados de *Campylobacter* spp, se identificaron por PCR múltiple a 65 cepas (62,5%) como *C. coli*, a 36 cepas (34,6%) como *C. jejuni*, y 3 cepas (2,88%) no se pudieron identificar como dentro de ninguna de las 2 especies mencionadas. Las cepas que no fueron identificadas como *C. coli* o *C. jejuni*, pudieron tratarse de especies como *Campylobacter lari*, el cual es un patógeno aislado con menor frecuencia en muestras de productos cárnicos (Kamei et al., 2014; O. A. Oyarzabal, Wesley, Barbaree, Lauerman, & Conner, 1997). Para su identificación son necesarios métodos como la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) o la determinación del gen *tlyA* el cual codifica para una citotoxina / hemolisina presente en esta especie (Matsubara et al., 2015)

La prevalencia de *C. coli* fue evidentemente mayor a la de *C. jejuni* y se encuentra en concordancia con otros estudios realizados en Ecuador, tales como los de Poma Vivanco en el 2014; Falcon en el 2015 y Medina en el 2015, quienes presentan datos similares en cuanto a la prevalencia de *C. coli*. Sin embargo nuestro estudio difiere de los resultados obtenidos por Elvers, et al., en el 2011, quienes identificaron a *C. jejuni* como la especie más prevalente. Así también, Giombelli y colaboradores en 2014 determinaron la presencia de un 52% (n=21/40) de *C. jejuni*, con relación a *C. coli* identificado en tan solo un

11.6% (n=5/40) de las carcasas de pollo analizadas al final de la planta procesadora (Giombelli & Gloria, 2014). Esta diferencia posiblemente se pueda deber a factores ambientales y geográficos de las zonas de muestreo, así como el origen de las muestras, que en el caso de los estudios en Ecuador provendrían de integraciones avícolas comunes.

La técnica de PCR –RFLP demostró ser un método eficaz para mostrar la diversidad genética de las cepas de *Campylobacter coli* y *Campylobacter jejuni*. De las 104 cepas aisladas, se tipificaron con *flaA*-PCR RFLP a 63 cepas de *C. coli* (n= 63/65) y a 36 (n=36/36) cepas de *C. jejuni*; es decir, que del total de cepas, un 97,12% resultó positivo a la amplificación del gen *flaA*. Usualmente el *flaA*-RFLP es un método más sensible que la tipificación Multilocus de Secuencias (MLST), el cual es más utilizado en estudios poblacionales (Kudirkiene et al., 2013). Mediante este análisis, se determinaron diversos genotipos (19 para *C. coli* y 15 para *C. jejuni*). Estos datos son similares a los obtenidos en el Ecuador por Paganquiza en 2016, quien observó una amplificación del 80% de las cepas de *Campylobacter* al gen *flaA* (n=183) por la técnica de RFLP, identificando 11 y 15 genotipos para *Campylobacter* spp. en dos muestreos diferentes. (Paganquiza, 2016). Estudios similares como el de Behringer en 2011 señalan la confiabilidad del método, permitiendo el 100% de tipificación de un total de 100 aislamientos de *Campylobacter* obtenidos a partir de carne de pollos broiler al por menor (Behringer et al., 2011).

En el presente estudio se realizó el análisis filogenético para *C. coli* y *C. jejuni*. Los dendogramas identificaron 19 genotipos para *C. coli* y 15 para *C. jejuni*. Estos datos concuerdan con varias investigaciones que señalan la presencia de diferentes genotipos dentro de una misma población de *Campylobacter* spp. (Duffy, Blackall, Cobbold, & Fegan, 2015). Los genotipos se muestran agrupados indistintamente del punto de muestreo o la zona geográfica. El genotipo 8 de *C. coli* (17%) fue el predominante en muestras provenientes de supermercados, tiendas y mercados del norte y sur de la ciudad de Quito; además este genotipo se identificó en 4 de las 7 marcas comerciales registradas en el muestreo, así como también de pollos sin marca. Estudios han demostrado, que la transmisión de *Campylobacter* sería horizontal, por lo que probablemente las muestras

positivas al genotipo 8, tendría una misma fuente de contaminación (Thomrongsuwannakij, Blackall, & Chansiripornchai, 2017),. Si bien, el RFLP es una herramienta confiable para la realización de estudios epidemiológicos, sería necesario un estudio genotípico más profundo a fin de poder concluir a ciencia cierta el origen de esta contaminación.

La presente investigación muestra una gran diversidad de genotipos tanto para *C. coli* (n=19) como para *C. jejuni* (n=15), la diversidad genética del gen *flaA* amplificado podría deberse a las distintas fuentes de muestreo y a la procedencia de las carcasas. Estos datos concuerdan con el estudio de Zorman en 2007, quien observó una alta diversidad de genotipos en carne de pollo de mercados y muestras clínicas de seres humanos (Zorman & Možina, 2002). La diversidad de resultados presentes en la investigación, podrían ser explicados por factores tales como el origen, la geografía y orografía de la procedencia de las carcasas, tamaño de la muestra y número de aislados (Behringer et al., 2011; El-Adawy et al., 2013; Ibrahim, Bilal, & Hamid, 2014; Kudirkiene et al., 2013). Se considera también que la diversidad genética que presenta *Campylobacter* spp. es indispensable para la supervivencia y adaptación de este microorganismo en nuevos hábitats (Zorman & Možina, 2002).

Los resultados mostrados en la presente investigación podrían darnos una idea de la situación actual de *Campylobacter* spp. a nivel de la carne de pollo que se encuentra en puntos de expendio y de su potencial repercusión sobre la salud pública, queda claro que la carne de pollo puede representar una posible fuente de infección para el consumidor, sea esta por el consumo de la carne y sus derivados o por contaminación cruzada con otros alimentos al momento de su preparación. Este estudio pretende contribuir a la disminución del riesgo de infección de *Campylobacter* spp. mediante la presentación de datos relevantes para promover la ejecución de medidas preventivas tanto para los productores como para los consumidores.

CAPITULO VII

Conclusiones

- Se determinaron microbiológica y molecularmente 101 cepas de *Campylobacter* spp. 65 cepas de *Campylobacter coli* y 36 cepas de *Campylobacter jejuni* aisladas de muestras de carcasas de pollos en percha, en la ciudad de Quito.
- Se logró aislar y cuantificar $4,8 \log^{10}$ UFC/g en mercados, $4,6 \log^{10}$ UFC/g en tiendas y $4,4 \log^{10}$ UFC/g en supermercados de *Campylobacter* spp. a partir de muestras de carcasas de pollos en percha, en la ciudad de Quito.
- Se subtipificó genéticamente 65 cepas contenidas en 15 genotipos de *Campylobacter coli* y 36 cepas contenidas en 11 genotipos *Campylobacter jejuni* a partir de muestras de carcasas de pollos en percha, en la ciudad de Quito.

CAPITULO VIII

Recomendaciones

- Realizar estudios epidemiológicos más amplios de cuantificación de *Campylobacter* spp., a fin de obtener datos completos sobre la situación de este agente patógeno a nivel nacional.
- Realizar estudios en pacientes humanos para analizar posibles infecciones de *Campylobacter* spp. y su relación con la contaminación de las carcasas de pollo.
- Realizar estudios moleculares más profundos como MLST para determinar el origen de las cepas obtenidas.

REFERENCIAS.

- Allen, V. M., Bull, S. A., Corry, J. E. L., Domingue, G., Jørgensen, F., Frost, J. A., ... Humphrey, T. J. (2007). Campylobacter spp. contamination of chicken carcasses during processing in relation to flock colonisation. *International Journal of Food Microbiology*, 113(1), 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.011>
- Alm, R. A., Guerry, P., & Trust, T. J. (1993). Distribution and polymorphism of the flagellin genes from isolates of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology*, 175(10), 3051–3057. <https://doi.org/10.1128/jb.175.10.3051-3057.1993>
- Ayling, R. D., Woodward, M. J., Evans, S., & Newell, D. G. (1996). Restriction fragment length polymorphism of polymerase chain reaction products applied to the differentiation of poultry campylobacters for epidemiological investigations. *Research in Veterinary Science*, 60(2), 168–172. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(96\)90013-2](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(96)90013-2)
- Bahrndorff, S., Rangstrup-Christensen, L., Nordentoft, S., & Hald, B. (2013). Foodborne disease prevention and broiler chickens with reduced *Campylobacter* infection. *Emerging Infectious Diseases*, 19(3), 425–30. <https://doi.org/10.3201/eid1903.111593>
- Barletta, F., Mercado, E. H., Lluque, A., Ruiz, J., Cleary, T. G., & Ochoa, T. J. (2013). Multiplex real-time PCR for detection of *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Shigella*. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(9), 2822–2829. <https://doi.org/10.1128/JCM.01397-13>
- Battersby, T., Walsh, D., Whyte, P., & Bolton, D. (2017). Evaluating and improving terminal hygiene practices on broiler farms to prevent *Campylobacter* cross-contamination between flocks. *Food Microbiology*, 64, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.018>
- Bauermeister, L. J., Bowers, J. W. J., Townsend, J. C., & McKee, S. R. (2008). The microbial and quality properties of poultry carcasses treated with peracetic acid as an antimicrobial treatment. *Poultry Science*, 87(11), 2390–2398. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00087>
- Behringer, M., Miller, W. G., & Oyarzabal, O. A. (2011). Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from live broilers and retail broiler meat by *flaA*-RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 84(2), 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.11.016>
- Bentley, J. (2017). Per Capita availability of chicken.
- Berg, H. (2012). Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. <https://doi.org/10.5772/37724>
- 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) Resumen Introducción, 3(1), 25–33.
- Burfoot, D., Hall, J., Nicholson, K., Hanson, C., Handley, S & Mulvey, E. (2017). Effect of rapid surface cooling o *Campylobacter* numbers on poultry carcasses. *Food Control*, 70(2), 168–172. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.041>

- CONAVE. (2013). Estadísticas avícolas, 2013.
- Cunha, M. V., & Inácio, J. (2015). *Veterinary Infection Biology: Molecular Diagnostics and High- Throughput Strategies* (Vol. 1247). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2004-4>
- Duffy, L. L., Blackall, P. J., Cobbold, R. N., & Fegan, N. (2015). Mapping the carriage of flaA-restriction fragment length polymorphism Campylobacter genotypes on poultry carcasses through the processing chain and comparison to clinical isolates. *Food Microbiology*, *48*, 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.12.009>
- Duim, B., Wassenaar, T. M., Rigter, A., & Wagenaar, J. (1999). High-resolution genotyping of Campylobacter strains isolated from poultry and humans with amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(6), 2369–2375.
- Efsa. (2011). Scientific Opinion on Campylobacter in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. *EFSA Journal*, *9*(4), 1–141. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2105>.
- El-Adawy, H., Hotzel, H., Tomaso, H., Neubauer, H., Taboada, E. N., Ehricht, R., & Hafez, H. M. (2013). Detection of Genetic Diversity in Campylobacter jejuni Isolated from a Commercial Turkey Flock Using flaA Typing, MLST Analysis and Microarray Assay. *PLoS ONE*, *8*(2), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051582>
- El-shibiny, A., Connerton, P., & Connerton, I. (2009). International Journal of Food Microbiology Survival at refrigeration and freezing temperatures of Campylobacter coli and Campylobacter jejuni on chicken skin applied as axenic and mixed inoculums. *International Journal of Food Microbiology*, *131*(2–3), 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.024>
- Elvers, K. T., Morris, V. K., Newell, D. G., & Allen, V. M. (2011). Molecular tracking, through processing, of Campylobacter strains colonizing broiler flocks. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(16), 5722–5729. <https://doi.org/10.1128/AEM.02419-10>
- Evans, T. (2016). Tendencias Avícolas Mundiales. *El Sitio Avícola*, 4–7.
- Falcon, J. (2015). *Cuantificación de Campylobacter spp. en 5 puntos críticos de control de dos camales industriales de pollos de la provincia de Pichincha*. Universidad Central del Ecuador.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2014). Tendencias y perspectivas del mercado mundial.
- FAO. (2013). *Revisión del Desarrollo Avícola. Revisión del desarrollo avícola* (FAO). Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura.
- Fernández, H. (2011). Campylobacter and campylobacteriosis: a view from South America. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, *28*(1), 121–127. <https://doi.org/10.1590/S1726-46342011000100019>
- Figueroa, G., Troncoso, M., López, C., Rivas, P., & Toro, M. (2009). Occurrence and enumeration of Campylobacter spp. during the processing of Chilean broilers. *BMC Microbiology*, *9*. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-94>
- Fitzgerald, C. (2015). Campylobacter. *Clinics in Laboratory Medicine*, *35*(2), 289–298. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.03.001>

- Franchin, P. R., Ogliari, P. J., & Batista, C. R. V. (2007). Frequency of thermophilic *Campylobacter* in broiler chickens during industrial processing in a Southern Brazil slaughterhouse. *British Poultry Science*, *48*(2), 127–132. <https://doi.org/10.1080/00071660701261286>
- Frasao, B. da S., Marin, V. A., & Conte-Junior, C. A. (2017). Molecular Detection, Typing, and Quantification of *Campylobacter* spp. in Foods of Animal Origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *16*(4), 721–734. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12274>
- Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. (2013). *Campylobacter*. *Elika*, 1–5.
- Galarraga Mora, A. I. (2014). *Aislamiento e identificación de Campylobacter spp. en ciegos de pollos faenados en mataderos industriales de la provincia de Pichincha*. Universidad Central del Ecuador.
- Ge, B., Wang, F., Sjölund-Karlsson, M., & McDermott, P. F. (2013). Antimicrobial resistance in *Campylobacter*: Susceptibility testing methods and resistance trends. *Journal of Microbiological Methods*, *95*(1), 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.06.021>
- Geilhausen, B., Mauff, G., Vlaes, L., Goossens, H., & Butzler, J. P. (1990). Restriction Fragment Length Polymorphism for the Identification of *Campylobacter jejuni*-Isolates. *Zentralblatt Fur Bakteriologie*, *274*(3), 366–371. [https://doi.org/10.1016/S0934-8840\(11\)80694-8](https://doi.org/10.1016/S0934-8840(11)80694-8)
- Giombelli, A., & Gloria, M. B. A. (2014). Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* on Broiler Chickens from Farm to Slaughter and Efficiency of Methods To Remove Visible Fecal Contamination. *Journal of Food Protection*, *77*(11), 1851–1859. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-200>
- Gonsalves, C. C., Borsoi, A., Perdoncini, G., Rodrigues, L. B., & do Nascimento, V. P. (2016). *Campylobacter* in broiler slaughter samples assessed by direct count on mCCDA and Campy-Cefex agar. *Brazilian Journal of Microbiology*, *47*(3), 764–769. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.025>
- Habib, I., Sampers, I., Uyttendaele, M., Berkvens, D., & De Zutter, L. (2008). Baseline data from a Belgium-wide survey of *Campylobacter* species contamination in chicken meat preparations and considerations for a reliable monitoring program. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(17), 5483–5489. <https://doi.org/10.1128/AEM.00161-08>
- Habib, I., Uyttendaele, M., & De Zutter, L. (2011). Evaluation of ISO 10272:2006 standard versus alternative enrichment and plating combinations for enumeration and detection of *Campylobacter* in chicken meat. *Food Microbiology*, *28*(6), 1117–23. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.03.001>
- Health Protection Agency. (2013). UK Standards for Microbiology Investigations Identification of *Campylobacter* species. *Standards Unit, Microbiology Services, ID23*, 1–22. <https://doi.org/ID 7>
- Hue, O., Le Bouquin, S., Laisney, M. J., Allain, V., Lalande, F., Petetin, I., ... Chemaly, M. (2010). Prevalence of and risk factors for *Campylobacter* spp. contamination of broiler chicken carcasses at the slaughterhouse. *Food Microbiology*, *27*(8), 992–999. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.06.004>
- Hungaro, H. M., Mendonça, R. C. S., Rosa, V. O., Badaró, A. C. L., Moreira, M. A. S., & Chaves, J. B. P. (2015). Low contamination of *Campylobacter* spp. on chicken

- carcasses in Minas Gerais state, Brazil: Molecular characterization and antimicrobial resistance. *Food Control*, 51, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.11.001>
- Ibrahim, M. E., Bilal, N. E., & Hamid, M. E. (2014). Comparison of phenotypic characteristics and antimicrobial resistance patterns of clinical *Escherichia coli* collected from two unrelated geographical areas. *Global Journal of Health Science*, 6(6), 126–135. <https://doi.org/10.5539/gjhs.v6n6p126>
- Ivanova, M., Singh, R., Dharmasena, M., Gong, C., Krastanov, A., & Jiang, X. (2014). Rapid identification of *Campylobacter jejuni* from poultry carcasses and slaughtering environment samples by real-time PCR. *Poultry Science*, 93(6), 1587–1597. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03736>
- Jamshidi, A., Bassami, M. R., & Farkhondeh, T. (2008). Isolation and identification of *Campylobacter* spp. and *Campylobacter coli* from poultry carcasses by conventional culture method and multiplex PCR in Mashhad, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 9(2), 132–137.
- Johannessen, G. S., Johnsen, G., Økland, M., Cudjoe, K. S., & Hofshagen, M. (2007). Enumeration of thermotolerant *Campylobacter* spp. from poultry carcasses at the end of the slaughter-line. *Letters in Applied Microbiology*, 2001(1), 92–97. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02026.x>
- Jonaidi-Jafari, N., Khamesipour, F., Ranjbar, R., & Kheiri, R. (2016). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from the avian eggs. *Food Control*, 70, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.018>
- Kamei, K., Asakura, M., Somroop, S., Hatanaka, N., Hinenoya, A., Nagita, A., ... Yamasaki, S. (2014). A PCR-RFLP assay for the detection and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. lari*, *C. helveticus* and *C. upsaliensis*. *Journal of Medical Microbiology*, 63(PART 5), 659–666. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.071498-0>
- Kudirkiene, E., Bunevičiene, J., Šerniene, L., Ramonaite, S., Olsen, J. E., & Malakauskas, M. (2013). Importance of the producer on retail broiler meat product contamination with *Campylobacter* spp. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(9), 2293–2298. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6042>
- Ljupco A.; Pavle S.; Dean J.; Marija R.; Mirko P.; and Sandra K., Ljupco, A., Pavle, S., Dean, J., Marija, R., Mirko, P., & Sandra, K. (2011). Antimicrobial Resistance of *Campylobacter Jejuni* and *Campylobacter Coli* Isolates From Broiler Flocks. *Mac. Vet. Rev.*, 34(1), 15–18.
- Malher, X., Simon, M., Charnay, V., Déserts, R. D. des, Lehébel, A., & Belloc, C. (2011). Factors associated with carcass contamination by *Campylobacter* at slaughterhouse in cecal-carrier broilers. *International Journal of Food Microbiology*, 150(1), 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.007>
- Man, S. M. (2011). The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 8(12), 669–685. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.191>
- Matsubara, K., Nakajima, T., Moore, J. E., Millar, B. C., Murayama, T., & Matsuda, M. (2015). Molecular analysis of the *tlyA* gene in *Campylobacter lari*. *Folia Microbiologica*, 60(6), 505–514. <https://doi.org/10.1007/s12223-015-0389-8>
- Medina, J. L. (2015). Cuantificación de *Campylobacter* spp. en un matadero Semi-industrial de Aves, y posterior identificación de especies (*C. jejuni* y *C. coli*)

mediante técnicas de Diagnóstico Molecular., 94. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/6787>

- Melero, B., Juntunen, P., Hänninen, M. L., Jaime, I., & Rovira, J. (2012). Tracing *Campylobacter jejuni* strains along the poultry meat production chain from farm to retail by pulsed-field gel electrophoresis, and the antimicrobial resistance of isolates. *Food Microbiology*, *32*(1), 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.020>
- Messad, S., Hamdi, T. M., Bouhamed, R., Ramdani-Bouguessa, N., & Tazir, M. (2014). Frequency of contamination and antimicrobial resistance of thermotolerant *Campylobacter* isolated from some broiler farms and slaughterhouses in the region of Algiers. *Food Control*, *40*(1), 324328. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.016>
- Mughini-Gras, L., Penny, C., Ragimbeau, C., Schets, F. M., Blaak, H., Duim, B., ... van Pelt, W. (2016). Quantifying potential sources of surface water contamination with *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Water Research*, *101*, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.069>
- Nebola, M., & Steinhauserova, I. (2006). PFGE and PCR/RFLP typing of *Campylobacter jejuni* strains from poultry. *British Poultry Science*, *47*(4), 456–461. <https://doi.org/10.1080/00071660600829159>
- Newell, D. G., & Fearnley, C. (2003). Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(8), 4343–4351. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4343>
- O'Mahony, E., Buckley, J. F., Bolton, D., Whyte, P., & Fanning, S. (2011). Molecular epidemiology of *Campylobacter* isolates from poultry production units in Southern Ireland. *PLoS ONE*, *6*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028490>
- OMS. (2016). *Campylobacter*. *Organización Mundial de La Salud*, *01*(01), 04.
- On, S. L. W., & Vandamme, P. A. R. (1997). Identification and Epidemiological Typing of *Campylobacter hyointestinalis* Subspecies by Phenotypic and Genotypic Methods and Description of Novel Subgroups. *Systematic and Applied Microbiology*, *20*(2), 238–247. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(97\)80071-9](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(97)80071-9)
- Oyarzabal, O. A., Macklin, K. S., Barbaree, J. M., & Miller, R. S. (2005). Evaluation of agar plates for direct enumeration of *Campylobacter* spp. from poultry carcass rinses. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(6), 3351–3354. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3351-3354.2005>
- Oyarzabal, O. A., Wesley, I. V., Barbaree, J. M., Lauerma, L. H., & Conner, D. E. (1997). Specific detection of *Campylobacter lari* by PCR. *Journal of Microbiological Methods*, *29*(2), 97–102. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(97\)00029-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(97)00029-8)
- Paguanquiza, J. L. (2016). *Genotipificación del gen flagelar A en Campylobacter jejuni provenientes de los procesos de faenamiento industrial de pollos broiler*. Universidad Central del Ecuador.
- Parkhill, J., Wren, B. W., Mungall, K., Ketley, J. M., Churcher, C., Basham, D., ... Barrell, B. G. (2000). The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, *403*(6770), 665–668. <https://doi.org/10.1038/35001088>
- Perales, M., Camiña, M., & Quiñones, C. (2002). Infección por *Campylobacter* y *Shigella* como causa de Diarrea Aguda Infecciosa en niños menores de dos años en el Distrito de la Victoria, Lima-Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, *19*(4),

- Persson, S., & Olsen, K. E. P. (2005). Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. *Journal of Medical Microbiology*, *54*(Pt 11), 1043–1047. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46203-0>
- Pierna Álvarez, M., de la Fuente del Río, R., Gaona Álvarez, C., & González Velasco, C. (2017). Bacteriemia por *Campylobacter coli* asociada a inmunosupresión. *Revista Del Laboratorio Clínico*, *10*(2), 109–112. <https://doi.org/10.1016/j.labcli.2016.10.005>
- Poma, V. S. (2014). Aislamiento Y Tipificación Molecular de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en Contenido Cecal de Pollos Faenados en Camales Industriales en la Provincia de Pichincha., 81. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/6606>
- Poma Vivanco, V. S. (2014a). *Aislamiento y tipificación molecular de Campilobacter jejuni y Campylobacter coli en contenido cecal de pollos faenados en camales industriales en la provincia de Pichincha*. Universidad Central del Ecuador.
- Poma Vivanco, V. S. (2014b). *Aislamiento Y Tipificación Molecular de Campylobacter jejuni y Campylobacter coli en Contenido Cecal de Pollos Faenados en Camales Industriales en la Provincia de Pichincha*. Universidad Central del Ecuador.
- Prachantasena, S., Charununtakorn, P., Muangnoicharoen, S., Hankla, L., Techawal, N., Chaveerach, P., ... Luangtongkum, T. (2016). Distribution and genetic profiles of campylobacter in commercial broiler production from breeder to slaughter in Thailand. *PLoS ONE*, *11*(2), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149585>
- Quetz, Josaine Da Silva. Nunes, Ila Fernanda Lima. Havt, Alexandre. De Carvalho, Bobo Eunice. Lima, Noelia Leal. Soares, Alberto Melo. Salani, Rosa María. Guerran, Richard and Moreira, A. (2013). *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in children from communities in Northeastern Brazil: molecular detection and relation to nutritional status. *National Institutes Of Health*, *80*(4), 631–637. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2012.01428.x>. Identification
- Quinn, P J. Markey, B K. Leonard, F C. FitzPatrick, E S. Fanning, S. Hatigan, P. J. (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease* (Second). Wiley-Blackwell.
- Rahimi, E., & Ameri, M. (2011). Antimicrobial resistance patterns of *Campylobacter* spp. isolated from raw chicken, turkey, quail, partridge, and ostrich meat in Iran. *Food Control*, *22*(8), 1165–1170. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.01.010>
- Rodríguez Gutiérrez, V., Guzmán Osorio, L., & Verjan García, N. (2015). *Campylobacter* spp. in poultry products and its impact in public health. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, *10*(2), 203–213.
- Sałamasyńska-Guz, A., Stefańska, I., Baçal, P., & Binek, M. (2018). Evaluation of selected phenotypic features among *Campylobacter* sp. strains of animal origin. *Veterinary Microbiology*, *216*(January), 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.01.010>
- Sampers, I., Habib, I., Berkvens, D., Dumoulin, A., Zutter, L. De, & Uyttendaele, M. (2008). Processing practices contributing to *Campylobacter* contamination in Belgian chicken meat preparations. *International Journal of Food Microbiology*, *128*(2), 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.024>
- Sasaki, Y., Haruna, M., Mori, T., Kusukawa, M., Murakami, M., Tsujiyama, Y., ... Yamada, Y. (2014). Quantitative estimation of *Campylobacter* cross-contamination

- in carcasses and chicken products at an abattoir. *Food Control*.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.015>
- Scherer, K., Bartelt, E., Sommerfeld, C., & Hildebrandt, G. (2006). Comparison of different sampling techniques and enumeration methods for the isolation and quantification of *Campylobacter* spp. in raw retail chicken legs. *International Journal of Food Microbiology*, *108*(1), 115–119.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.031>
- Seliwiorstow, T., Baré, J., Van Damme, I., Uyttendaele, M., & De Zutter, L. (2015). *Campylobacter* carcass contamination throughout the slaughter process of *Campylobacter*-positive broiler batches. *International Journal of Food Microbiology*, *194*, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.004>
- Signorini, M. L., Zbrun, M. V., Romero-Scharpen, A., Olivero, C., Bongiovanni, F., Soto, L. P., ... Rosmini, M. R. (2013). Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis by consumption of salad cross-contaminated with thermophilic *Campylobacter* spp. from broiler meat in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine*, *109*(1–2), 37–6. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.09.011>
- Skarp, C. P. A., Hänninen, M. L., & Rautelin, H. I. K. (2016). Campylobacteriosis: The role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, *22*(2), 103–109.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.11.019>
- Stella, S., Soncini, G., Ziino, G., Panebianco, A., Pedonese, F., Nuvoloni, R., ... Giaccone, V. (2017). Prevalence and quantification of thermophilic *Campylobacter* spp. in Italian retail poultry meat: Analysis of influencing factors. *Food Microbiology*, *62*, 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.028>
- Sukted, N., Tuitemwong, P., Tuitemwong, K., Poonlapdecha, W., & Erickson, L. E. (2017). Inactivation of *Campylobacter* during immersion chilling of chicken carcasses. *Journal of Food Engineering*, *202*, 25–33.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.02.007>
- Takahashi, R., Shahada, F., Chuma, T., & Okamoto, K. (2006). Analysis of *Campylobacter* spp. contamination in broilers from the farm to the final meat cuts by using restriction fragment length polymorphism of the polymerase chain reaction products. *International Journal of Food Microbiology*, *110*(3), 240–245.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.043>
- Thomrongsuwannakij, T., Blackall, P. J., & Chansiripornchai, N. (2017). A Study on *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* through Commercial Broiler Production Chains in Thailand: Antimicrobial Resistance, the Characterization of DNA Gyrase Subunit A Mutation, and Genetic Diversity by Flagellin A Gene Restr. *Avian Diseases*, *61*(2), 186–197. <https://doi.org/10.1637/11546-120116-Reg.1>
- Tsai, H.-J., Huang, H.-C., Tsai, H.-L., & Chang, C.-C. (2006). PCR-based restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of *Campylobacter jejuni* isolates from humans, chickens and dogs in northern Taiwan. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, *68*(8), 815–819.
<https://doi.org/10.1292/jvms.68.815>
- Urrestarazu, M. I., Liprandi, F., Pérez De Suárez, E., González, R., & Pérez-Schael, I. (1999). Características etiológicas, clínicas y sociodemográficas de la diarrea aguda en Venezuela. *Revista Panamericana Salud Pública*, *6*(3), 149–156.
<https://doi.org/10.1590/S1020-49891999000800001>
- USDA, U. S. of A. (2011). Brasil es el tercer consumidor mundial de carne de pollo.

- Villa, M. (2018). Bolivia es el quinto consumidor de carne de pollo en América Latina. *La Razón*, 2018.
- Vinueza, C. (2017). Salmonella and Campylobacter in broilers at slaughter age: a possible source for carcasses contamination in Ecuador, 152. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.20687.48803>
- Vinueza, C. (2018). Campylobacter, el “outsider” de la salud animal. | UNIETAR.
- Wieczorek, K., Denis, E., & Osek, J. (2015). Comparative analysis of antimicrobial resistance and genetic diversity of Campylobacter from broilers slaughtered in Poland. *International Journal of Food Microbiology*, 210, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.006>
- Yamazaki-Matsune, W., Taguchi, M., Seto, K., Kawahara, R., Kawatsu, K., Kumeda, Y., ... Tsukamoto, T. (2007). Development of a multiplex PCR assay for identification of Campylobacter coli, Campylobacter fetus, Campylobacter hyointestinalis subsp. hyointestinalis, Campylobacter jejuni, Campylobacter lari and Campylobacter upsaliensis. *Journal of Medical Microbiology*, 56(11), 1467–1473. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47363-0>
- Zbrun, M. V., Romero-Scharpen, A., Olivero, C., Zimmermann, J. A., Rossler, E., Soto, L. P., ... Signorini, M. L. (2017). Diversidad genética de Campylobacter spp. termotolerantes aislados de diferentes etapas de la cadena cárnica aviar en Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(3), 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.03.003>
- Zorman, T., & Možina, S. S. (2002). Classical and molecular identification of thermotolerant campylobacters from poultry meat. *Food Technology and Biotechnology*, 40(3), 177–184. <https://doi.org/10.3325/cmj.2007.6.842>
- Zweifel, C., Althaus, D., & Stephan, R. (2015). Effects of slaughter operations on the microbiological contamination of broiler carcasses in three abattoirs. *Food Control*, 51, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.11.002>

ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo.

Agar Rapid Campylobacter (RC)

Agar Base: 500g Código: 356-4295 más suplemento Liofilizado: 10 viales 400ml_{c/u}
Código 356-4296

Composición:

- Mezcla Nutritiva: 28.5g.
- Mezcla Reducida: 1g.
- Cloruro de Sodio: 5g.
- Buffer: 1.25 g
- Mezcla Selectiva: 0.082 g
- Substrato Cromógeno: 0.05 g
- Agar: 14 g

pH (25°C) final = 7.2 - 7.5

preparación de Agar (RC)

- Añadir 370ml de agua destilada
- Pesar 20g de agar RC (Base)
- Disolver mediante calor, hasta hervir por 1 minuto.
- Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.
- Dejar enfriar hasta 47 a 50°C
- Reconstituir un vial de complemento (RC) en 30ml de agua estéril.
- Agregar el complemento reconstituido al medio autoclavado a 50°C..
- Dispensar en cajas Petri estériles.
- Almacenar en completa oscuridad entre 18 y 24 horas.
- Almacenar entre 2 y 4°C hasta su utilización.

Agar Base selectivo para Campylobacter sin Sangre. (MCCDA-Preston).

Presentación:

Agar Base: 500g Código: CM0739 más suplemento Liofilizado: 10 viales 2L.c/u
Código SR0155H

Composición:

- Caldo Nutritivo No.2: 25.0g
- Carbón Bacteriológico: 4.0g
- Caseína Hidrolizada 3.0g
- Desoxicolato de Sodio 1.0g
- Sulfato Ferroso 0.25g
- Piruvato de Sodio 0.25g
- Agar 12.0g

pH 7.4 ± 0.2 (25°C)

Contenido del Vial (1L.)

- Cefoperazona 32mg.
- Anfotericina B 10mg

Protocolo para preparación de Agar Base selectivo para Campylobacter sin Sangre. (MCCDA-Preston).

- Añadir 500ml de agua destilada.
- Pesar 22.75g de agar MCCDA (Base)
- Hervir por un minuto
- Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.
- Enfriar hasta 47 a 50°C
- Reconstituir el complemento (CCDA) en 2ml de agua estéril.
- Agregar el complemento reconstituido al medio autoclavado en base a la cantidad preparada (vial para 2L.)
- Dispensar en cajas Petri estériles.
- Almacenar entre 2 y 4°C hasta su utilización.

Agar Sangre (AS)

Presentación:

Agar Base: 500g Código: 211037

Composición:

- Infusión de musculo cardiaco a partir de Solidos: 2g.
- Caseína digerida por enzimas pancreáticas: 13g.
- Extracto de Levadura: 5g.
- Agar: 15g.

pH 7.4 ± 0.2 (25°C)

Protocolo para preparación de Agar Sangre (AS)

- Añadir 500ml de agua destilada
- Pesar 20g de agar Sangre
- Hervir por un minuto
- Una vez disuelto autoclavar a 121°C durante 15 minutos.
- Dejar enfriar hasta 47 a 50°C
- Agregar el 5% de sangre desfibrinada estéril de ovino.
- Dispensar en cajas Petri estériles.
- Dejar enfriar y almacenar entre 2 y 4°C hasta su utilización.
- Dispensar en cajas Petri estériles.
- Almacenar entre 2 y 4°C hasta su utilización.

Anexo 2. Reactivos de Biología Molecular.

Kit “GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase” para PCR.

- GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase Cód. M780A
- 5X Green GoTaq® Flexi Buffer Cód. M891A
- 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer Cód. M890A
- Magnesium Chloride Solution, 25mM Cód. A351H

Primers

- Primers de Campylobacter col1 SY140127478-001, SYGMA
- Primers de Campylobacter col2 SY140127481-005, SYGMA
- Primers de Campylobacter jun3 SY130807052-019, SYGMA
- Primers de Campylobacter jun4 SY130807052-020, SYGMA

Nucleótidos

- dNTPMix, 10nM, 1000 µl Promega. Cód. U1515

Electroforesis.

- Agarose, LE, Analytical Grade Cód. V3125
- TAE Buffer, Molecular Biology Grade (Tris-acetate-EDTA) Cód. V4281
- SYBR® Safe DNA Gel Stain Cód. S33102
- 100 bp DNA Ladder Cód. 15628-050

Anexo 3. Resultados de cuantificaciones de *Campylobacter* spp.

Muestra ID	Sector o zona de Muestreo	Tipo de Minoreo	Temperatura en Percha	Tipo de empaque	Se mantiene en refrigeración	Hay contacto entre la carcasa y el vendedor	Resultado (1/0)	Cuantificación (UFC)
U113c	Norte	MERCADO	24,9	NADA	NO	SI	1	25
U123c	Norte	MERCADO	16,7	NADA	NO	SI	1	488
U224c	Norte	MERCADO	18,5	NADA	NO	SI	1	6
U225c	Norte	MERCADO	7,3	NADA	NO	SI	0	NA
U657c	Norte	MERCADO	8,1	NADA	SI	SI	1	8
U658c	Norte	MERCADO	6,5	FUNDA	SI	NO	1	2
U682c	Norte	MERCADO	15,8	NADA	NO	NO	1	412
U683c	Norte	MERCADO	15	NADA	NO	NO	1	85
U715c	Norte	MERCADO	14,5	NADA	NO	SI	1	3
U716c	Norte	MERCADO	13,8	NADA	NO	SI	1	142
U760c	Norte	MERCADO	9,1	NADA	SI	SI	1	5
U762c	Norte	MERCADO	14,8	FUNDA	NO	SI	1	450
U808c	Norte	MERCADO	16,7	FUNDA	NO	NO	1	24
U809c	Norte	MERCADO	16,1	NADA	NO	SI	1	32
U862c	Norte	MERCADO	19,4	NADA	NO	SI	1	80
U863c	Norte	MERCADO	19,6	NADA	NO	SI	1	234
U885c	Norte	MERCADO	18,4	NADA	NO	SI	1	2
U886c	Norte	MERCADO	17,4	NADA	NO	SI	0	NA
U117c	Sur	MERCADO	13,3	NADA	SI	SI	1	147
U124c	Sur	MERCADO	12,8	NADA	SI	SI	1	159
U639c	Sur	MERCADO	16,1	NADA	NO	SI	1	56
U640c	Sur	MERCADO	20,5	NADA	NO	SI	1	100
U669c	Sur	MERCADO	15,5	FUNDA	NO	NO	1	3
U670c	Sur	MERCADO	4,43	FUNDA	NO	NO	1	5
U693c	Sur	MERCADO	10,3	FUNDA	SI	NO	1	61
U694c	Sur	MERCADO	23,5	FUNDA	NO	SI	1	11
U726c	Sur	MERCADO	15	NADA	NO	SI	1	54
U727c	Sur	MERCADO	10,7	NADA	NO	SI	1	8
U772c	Sur	MERCADO	4,5	NADA	NO	SI	0	NA
U773c	Sur	MERCADO	17,7	NADA	NO	SI	1	1
U818c	Sur	MERCADO	17,6	NADA	NO	SI	1	98
U819c	Sur	MERCADO	16,8	NADA	NO	SI	1	2
U873c	Sur	MERCADO	9.1	NADA	NO	NO	1	3
U874c	Sur	MERCADO	17	NADA	NO	NO	1	728

Tabla. Resultados de la cuantificación de *Campylobacter* spp. de carcasas de pollos en percha en mercados del Norte y Sur del DM de Quito, se muestran datos como las temperaturas en las que fueron tomadas, la presencia o ausencia de empaque y el contacto con el encargado de expendio.

Muestra ID	Sector o zona de Muestreo	Tipo de Minoreo	Temperatura en Percha	Tipo de empaque	Se mantiene en refrigeración	Hay contacto entre la carcasa y el vendedor	Resultado (1/0)	Cuantificación (UFC)
U115c	Norte	SUPERMERCADO	7,1	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	0	NA
U122c	Norte	SUPERMERCADO	7	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	1	590
U218c	Norte	SUPERMERCADO	4,3	FUNDA PLÁSTICA	SI	No	1	474
U219c	Norte	SUPERMERCADO	3,6	FUNDA PLÁSTICA	SI	No	1	3
U220c	Norte	SUPERMERCADO	3,2	FUNDA PLÁSTICA	SI	No	1	8
U651c	Norte	SUPERMERCADO	7,2	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	0	NA
U652c	Norte	SUPERMERCADO	4,4	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	1	19
U653c	Norte	SUPERMERCADO	5	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	0	NA
U676c	Norte	SUPERMERCADO	6	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	1	59
U677c	Norte	SUPERMERCADO	2,1	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	0	NA
U678c	Norte	SUPERMERCADO	4,8	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	0	NA
U709c	Norte	SUPERMERCADO	2,9	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	0	NA
U710c	Norte	SUPERMERCADO	7,2	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	1	8
U711c	Norte	SUPERMERCADO	9,4	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	1	2
U756c	Norte	SUPERMERCADO	6,5	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	1	2
U757c	Norte	SUPERMERCADO	7,42	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	1	35
U758c	Norte	SUPERMERCADO	6,3	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	1	24
U802c	Norte	SUPERMERCADO	4,6	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	1	3
U803c	Norte	SUPERMERCADO	6,6	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	1	119
U804c	Norte	SUPERMERCADO	4,9	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	0	NA
U856c	Norte	SUPERMERCADO	6,8	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	0	NA
U857c	Norte	SUPERMERCADO	5	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	1	1
U858c	Norte	SUPERMERCADO	4,7	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	1	1
U879c	Norte	SUPERMERCADO	5,5	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	0	NA
U880c	Norte	SUPERMERCADO	2,6	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	1	3
U881c	Norte	SUPERMERCADO	7,1	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	0	NA
U119c	Sur	SUPERMERCADO	8,4	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	0	NA
U120c	Sur	SUPERMERCADO	5,7	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	1	2
U121c	Sur	SUPERMERCADO	3,2	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	0	NA
U633c	Sur	SUPERMERCADO	1,8	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	1	1
U634c	Sur	SUPERMERCADO	5,4	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	0	NA
U635c	Sur	SUPERMERCADO	4,3	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	1	74
U663c	Sur	SUPERMERCADO	7,3	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	0	NA
U664c	Sur	SUPERMERCADO	6,4	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	0	NA
U665c	Sur	SUPERMERCADO	3,5	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	0	NA
U687c	Sur	SUPERMERCADO	6,6	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	1	5
U688c	Sur	SUPERMERCADO	6,1	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	1	48
U689c	Sur	SUPERMERCADO	4,1	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	0	NA
U720c	Sur	SUPERMERCADO	8,3	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	1	5
U721c	Sur	SUPERMERCADO	8,5	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	0	NA
U722c	Sur	SUPERMERCADO	9,3	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	1	2
U766c	Sur	SUPERMERCADO	5,1	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	1	27
U767c	Sur	SUPERMERCADO	8,8	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	1	5
U768c	Sur	SUPERMERCADO	8,7	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	0	NA
U812c	Sur	SUPERMERCADO	6,1	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	1	52
U813c	Sur	SUPERMERCADO	5,4	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	0	NA
U814c	Sur	SUPERMERCADO	4,2	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	1	8
U867c	Sur	SUPERMERCADO	6,2	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	1	21
U868c	Sur	SUPERMERCADO	3,1	FUNDA PLÁSTICA	SI	NO	1	7
U869c	Sur	SUPERMERCADO	4,2	FUNDA PLÁSTICA	SI	SI	0	NA

Tabla. Resultados de la cuantificación de *Campylobacter* spp. de carcasas de pollos en percha en supermercados del Norte y Sur del DM de Quito. Se muestran datos como las temperaturas en las que fueron tomadas, la presencia o ausencia de empaque y el contacto con el encargado de expendio

Muestra ID	Sector o zona de Muestreo	Tipo de Minoreo	Temperatura en Percha	Tipo de empaque	Se mantiene en refrigeración	Hay contacto entre la carcasa y el vendedor	Resultado (1/0)	Cuantificación (UFC)
U114c	Norte	TIENDA	4,2	FUNDA	SI	NO	1	64
U126c	Norte	TIENDA	8,2	FUNDA	SI	NO	1	241
U127c	Norte	TIENDA	1,5	FUNDA	SI	SI	1	5
U221c	Norte	TIENDA	19,5	NADA	NO	SI	1	159
U222c	Norte	TIENDA	11,5	FUNDA	SI	NO	1	4
U223c	Norte	TIENDA	12,1	NADA	SI	SI	1	16
U654c	Norte	TIENDA	18,8	NADA	NO	SI	1	53
U655c	Norte	TIENDA	15,5	NADA	NO	SI	1	46
U656c	Norte	TIENDA	8,5	FUNDA	SI	NO	0	NA
U679c	Norte	TIENDA	4,2	NADA	NO	NO	1	19
U680c	Norte	TIENDA	3,3	NADA	NO	NO	0	NA
U681c	Norte	TIENDA	3,5	NADA	NO	NO	1	67
U712c	Norte	TIENDA	2,6	NADA	NO	SI	1	1
U713c	Norte	TIENDA	7,6	FUNDA	SI	NO	1	2
U714c	Norte	TIENDA	8,7	FUNDA	SI	NO	1	25
U759c	Norte	TIENDA	2,8	NADA	SI	SI	0	NA
U761c	Norte	TIENDA	9,8	FUNDA	SI	NO	0	NA
U763c	Norte	TIENDA	14,5	FUNDA	NO	SI	1	55
U805c	Norte	TIENDA	9,7	FUNDA	SI	NO	1	98
U806c	Norte	TIENDA	9,6	FUNDA	SI	NO	1	2
U807c	Norte	TIENDA	9,8	FUNDA	SI	NO	1	3
U859c	Norte	TIENDA	6,1	FUNDA	SI	NO	1	55
U860c	Norte	TIENDA	7,3	FUNDA	SI	NO	1	12
U861c	Norte	TIENDA	6,1	FUNDA	SI	NO	0	NA
U882c	Norte	TIENDA	17,4	NADA	NO	SI	1	23
U883c	Norte	TIENDA	3,8	NADA	NO	SI	1	180
U884c	Norte	TIENDA	9,4	FUNDA	NO	SI	0	NA
U116c	Sur	TIENDA	16,6	NADA	SI	SI	1	68
U118c	Sur	TIENDA	18,4	NADA	SI	SI	1	39
U125c	Sur	TIENDA	13,2	NADA	SI	SI	1	113
U636c	Sur	TIENDA	1,3	FUNDA	SI	NO	1	2
U637c	Sur	TIENDA	11,5	NADA	SI	SI	1	3
U638c	Sur	TIENDA	5,5	NADA	SI	SI	1	62
U666c	Sur	TIENDA	15,11	NADA	NO	SI	1	15
U667c	Sur	TIENDA	8,4	FUNDA	SI	NO	1	1
U668c	Sur	TIENDA	15,9	NADA	NO	SI	1	213
U690c	Sur	TIENDA	13,6	FUNDA	SI	NO	1	13
U691c	Sur	TIENDA	11,2	FUNDA	SI	NO	1	25
U692c	Sur	TIENDA	3,1	FUNDA	SI	NO	1	63
U723c	Sur	TIENDA	11,6	NADA	NO	SI	1	14
U724c	Sur	TIENDA	14,1	NADA	NO	SI	1	388
U725c	Sur	TIENDA	15,4	NADA	NO	SI	1	5
U769c	Sur	TIENDA	9,9	FUNDA	SI	SI	1	3
U770c	Sur	TIENDA	13,2	NADA	NO	SI	1	4
U771c	Sur	TIENDA	12,6	NADA	NO	SI	0	NA
U815c	Sur	TIENDA	11,1	NADA	SI	SI	1	18
U816c	Sur	TIENDA	8,5	NADA	SI	SI	1	15
U817c	Sur	TIENDA	11,3	NADA	SI	SI	1	74
U870c	Sur	TIENDA	14	FUNDA	NO	NO	1	13
U871c	Sur	TIENDA	11,6	FUNDA	NO	NO	1	64
U872c	Sur	TIENDA	6,2	NADA	NO	NO	1	8

Tabla. Resultados de la cuantificación de *Campylobacter* spp. de carcasas de pollos en percha en tiendas y tercenas del Norte y Sur del DM de Quito. Se muestran datos como las temperaturas en las que fueron tomadas, la presencia o ausencia de empaque y el contacto con el encargado de expendio.

Anexo 4. Resultados de PCR multiplex para *Campylobacter* spp.

Muestra ID	Sector o zona de Muestreo	Tipo de Minoreo	Resultado (1/0)	Aislado A
U123c	Norte	MERCADO	1	C. coli
U224c	Norte	MERCADO	1	C. coli
U657c	Norte	MERCADO	1	C. coli
U683c	Norte	MERCADO	1	C. coli
U762c	Norte	MERCADO	1	C. coli
U808c	Norte	MERCADO	1	C. coli
U809c	Norte	MERCADO	1	C. coli
U862c	Norte	MERCADO	1	C. coli
U885c	Norte	MERCADO	1	C. coli
U124c	Sur	MERCADO	1	C. coli
U639c	Sur	MERCADO	1	C. coli
U640c	Sur	MERCADO	1	C. coli
U693c	Sur	MERCADO	1	C. coli
U694c	Sur	MERCADO	1	C. coli
U726c	Sur	MERCADO	1	C. coli
U727c	Sur	MERCADO	1	C. coli
U773c	Sur	MERCADO	1	C. coli
U818c	Sur	MERCADO	1	C. coli
U819c	Sur	MERCADO	1	C. coli
U122c	Norte	SUPERMERCADO	1	C. coli
U219c	Norte	SUPERMERCADO	1	C. coli
U220c	Norte	SUPERMERCADO	1	C. coli
U652c	Norte	SUPERMERCADO	1	C. coli
U676c	Norte	SUPERMERCADO	1	C. coli
U711c	Norte	SUPERMERCADO	1	C. coli
U756c	Norte	SUPERMERCADO	1	C. coli
U758c	Norte	SUPERMERCADO	1	C. coli
U802c	Norte	SUPERMERCADO	1	C. coli
U803c	Norte	SUPERMERCADO	1	C. coli
U858c	Norte	SUPERMERCADO	1	C. coli
U880c	Norte	SUPERMERCADO	1	C. coli
U687c	Sur	SUPERMERCADO	1	C. coli
U688c	Sur	SUPERMERCADO	1	C. coli
U720c	Sur	SUPERMERCADO	1	C. coli
U722c	Sur	SUPERMERCADO	1	C. coli
U812c	Sur	SUPERMERCADO	1	C. coli
U867c	Sur	SUPERMERCADO	1	C. coli
U868c	Sur	SUPERMERCADO	1	C. coli
U126c	Norte	TIENDA	1	C. coli
U127c	Norte	TIENDA	1	C. coli
U222c	Norte	TIENDA	1	C. coli

U655c	Norte	TIENDA	1	C. coli
U681c	Norte	TIENDA	1	C. coli
U712c	Norte	TIENDA	1	C. coli
U713c	Norte	TIENDA	1	C. coli
U714c	Norte	TIENDA	1	C. coli
U763c	Norte	TIENDA	1	C. coli
U805c	Norte	TIENDA	1	C. coli
U806c	Norte	TIENDA	1	C. coli
U807c	Norte	TIENDA	1	C. coli
U859c	Norte	TIENDA	1	C. coli
U883c	Norte	TIENDA	1	C. coli
U125c	Sur	TIENDA	1	C. coli
U636c	Sur	TIENDA	1	C. coli
U666c	Sur	TIENDA	1	C. coli
U690c	Sur	TIENDA	1	C. coli
U691c	Sur	TIENDA	1	C. coli
U723c	Sur	TIENDA	1	C. coli
U725c	Sur	TIENDA	1	C. coli
U769c	Sur	TIENDA	1	C. coli
U770c	Sur	TIENDA	1	C. coli
U815c	Sur	TIENDA	1	C. coli
U816c	Sur	TIENDA	1	C. coli
U817c	Sur	TIENDA	1	C. coli
U871c	Sur	TIENDA	1	C. coli

Tabla 15. Determinación de *C. coli* mediante PCR multiplex sectorizado por zonas y tipos de minoreo

Muestra ID	Sector o zona de Muestreo	Tipo de Minoreo	Resultado (1/0)	Aislado A
U113c	Norte	MERCADO	1	C. jejuni
U658c	Norte	MERCADO	1	C. jejuni
U682c	Norte	MERCADO	1	C. jejuni
U715c	Norte	MERCADO	1	C. jejuni
U716c	Norte	MERCADO	1	C. jejuni
U760c	Norte	MERCADO	1	C. jejuni
U863c	Norte	MERCADO	1	C. jejuni
U117c	Sur	MERCADO	1	C. jejuni
U669c	Sur	MERCADO	1	C. jejuni
U670c	Sur	MERCADO	1	C. jejuni
U874c	Sur	MERCADO	1	C. jejuni
U218c	Norte	SUPERMERCADO	1	C. jejuni
U710c	Norte	SUPERMERCADO	1	C. jejuni
U757c	Norte	SUPERMERCADO	1	C. jejuni
U857c	Norte	SUPERMERCADO	1	C. jejuni
U120c	Sur	SUPERMERCADO	1	C. jejuni
U633c	Sur	SUPERMERCADO	1	C. jejuni
U635c	Sur	SUPERMERCADO	1	C. jejuni
U766c	Sur	SUPERMERCADO	1	C. jejuni
U767c	Sur	SUPERMERCADO	1	C. jejuni
U814c	Sur	SUPERMERCADO	1	C. jejuni
U114c	Norte	TIENDA	1	C. jejuni
U221c	Norte	TIENDA	1	C. jejuni
U223c	Norte	TIENDA	1	C. jejuni
U654c	Norte	TIENDA	1	C. jejuni
U679c	Norte	TIENDA	1	C. jejuni
U860c	Norte	TIENDA	1	C. jejuni
U882c	Norte	TIENDA	1	C. jejuni
U116c	Sur	TIENDA	1	C. jejuni
U118c	Sur	TIENDA	1	C. jejuni
U637c	Sur	TIENDA	1	C. jejuni
U638c	Sur	TIENDA	1	C. jejuni
U667c	Sur	TIENDA	1	C. jejuni
U668c	Sur	TIENDA	1	C. jejuni
U870c	Sur	TIENDA	1	C. jejuni
U872c	Sur	TIENDA	1	C. jejuni

Tabla 16. Determinación de *C. coli* mediante PCR multiplex sectorizado por zonas y tipos de minoreo

Anexo 5. esquema de PCR multiplex.

PCR VANDAMME, Multiplex *C. coli*, *C. jejuni*

Fecha: 02 de Febrero de 2018
 Volumen final (µl): 15
 Número de muestras: 25 (mas 1)

Reactivo	Volumen total	C. inicial		C. final		Volumen para una reacción		VOLUMEN TOTAL	
		cantidad	unidad	cantidad	unidad	cantidad	unidad	cantidad	unidad
Agua	203,0					8,12	µl	203	µl
Template	25,0					1	µl	25	µl
Buffer	75,0	5	X	1	x	3	µl	75	µl
dNTP Mix	11,3	10	mM	0,3	mM	0,45	µl	11,25	µl
MgCl ₂	45,0	25	mM	3	mM	1,8	µl	45	µl
Col 1	3,0	100	mmol/µl	0,8	mmol/µl	0,12	µl	3	µl
Col 2	3,0	100	mmol/µl	0,8	mmol/µl	0,12	µl	3	µl
Jun 3	3,0	100	mmol/µl	0,8	mmol/µl	0,12	µl	3	µl
Jun 4	3,0	100	mmol/µl	0,8	mmol/µl	0,12	µl	3	µl
Taq	3,8	5	U/µl	0,05	U/µl	0,15	µl	3,75	µl
Total						15	µl	375	µl

PCR Programme

5 min 94°C
 1 min 94°C, 1 min 64°C, 1 min 72°C x2
 1 min 94°C, 1 min 62°C, 1 min 72°C x2
 1 min 94°C, 1 min 60°C, 1 min 72°C x2
 1 min 94°C, 1 min 58°C, 1 min 72°C x2
 1 min 94°C, 1 min 56°C, 1 min 72°C x2
 1 min 94°C, 1 min 54°C, 1 min 72°C x30
 10 min 72°C
 10°C

Agarosa 1% /30 min
***C. coli* 364 pb**
***C. jejuni* 773 pb**
 50 ml de TBE 0,5X + 0,5 g agarosa
4 µl de muestra
2 µl de marcador

Reacción	Muestra
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
14	
15	C. coli
16	C.jejuni
17	NEG

Anexo 6. Esquema de FlaA-PCR multiplex.

22 de Noviembre de
Fecha: 2017

Volumen final (µl): 30

Número de muestras: 31

Reactivo	VF Mastermix (µl)	C. inicial		C. final		Volumen para una reacción		VOLUMEN TOTAL DE MASTERMIX (µl)
		cantidad	unidad	cantidad	unidad	cantidad	unidad	
Agua	559,9	-		-		18,06	µl	559,86
Template		?		?		3	µl	<u>93</u>
Buffer	186,0	5	x	1	x	6	µl	186
MgCl ₂	55,8	25	mM	1,5	mM	1,8	µl	55,8
dNTP Mix	9,3	10	mM	0,1	mM	0,3	µl	9,3
CJUNF	9,3	100	pmol/µl	1	pmol/µl	0,3	µl	9,3
CJUNR	9,3	100	pmol/µl	1	pmol/µl	0,3	µl	9,3
Taq	7,4	5	U/µl	0,04	U/µl	0,24	µl	7,44
Total						30	µl	930

PCR Programme

1 min, 94°C

(15 seg 94°C, 45 seg 45°C, 2 min y 30 seg 72°C), x30

5 min 72°C

4°C infinito

Agarosa 1% / 35 min

flaA gene 1728 bp.

50 ml de TAE 0,5X 0,5 g agarosa

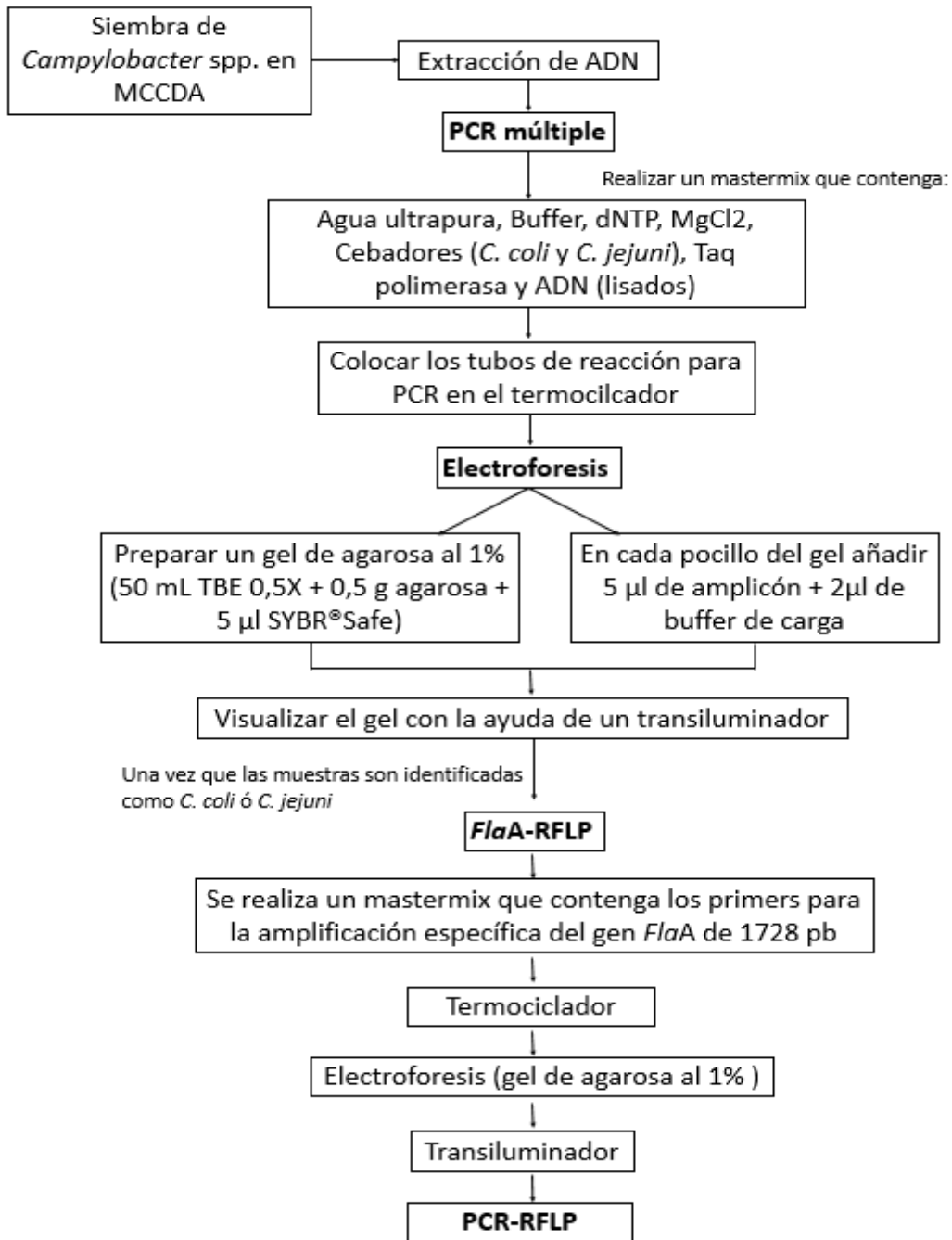
0,7µ Syber Safe/10ml TAE 0,5X

3,5µ de muestra

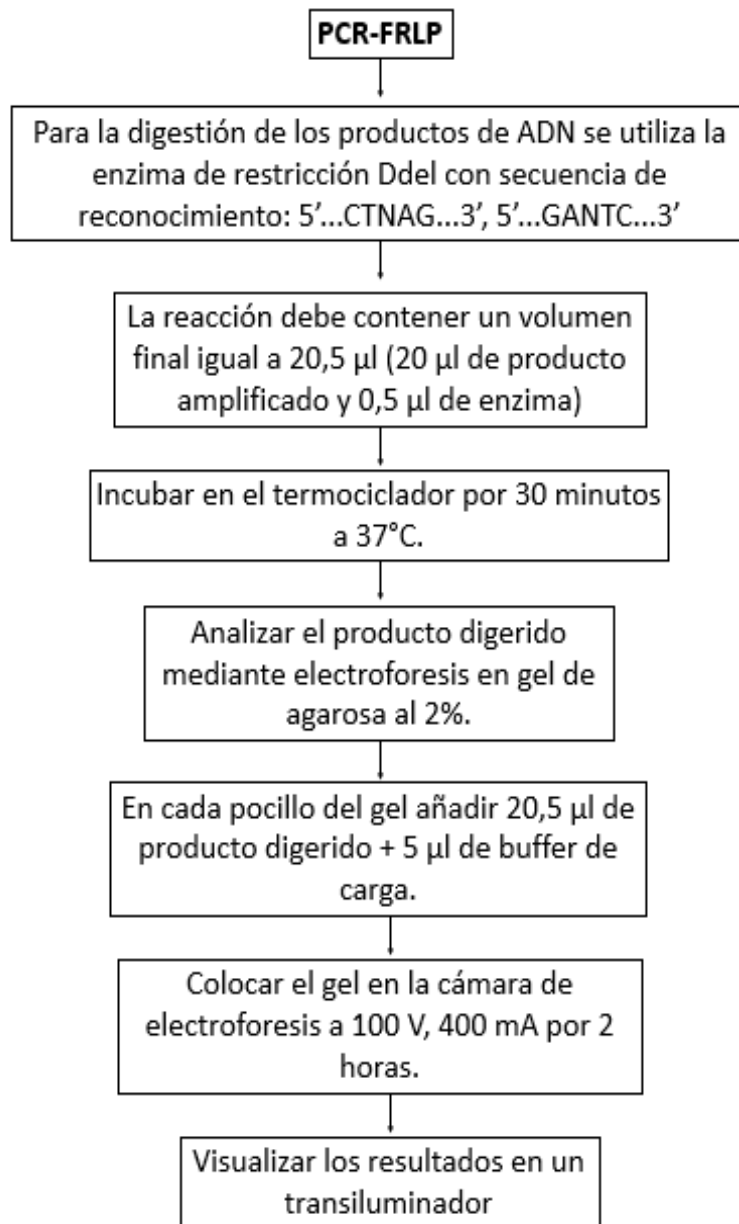
2,5µl de marcador

Anexo 7. flujogramas de PCR-RFLP para *Campylobacter* spp.

Flujograma PCR-RFLP para *Campylobacter coli* y *jejuni*



Flujograma PCR-RFLP para *Campylobacter coli* y *jejuni* (continuación)



Anexo 8. Carcasas en distintos puntos de muestreo.



Muestreo en mercado
Fuente: el autor



Muestreo en terцена
Fuente: el autor



Muestreo en supermercado mercado
Fuente: el autor



Toma de temperaturas
Fuente: el autor

Anexo 9. Procesamiento de carcasas.



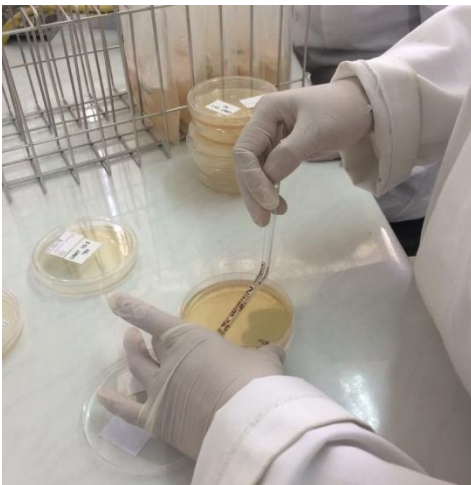
Muestra de piel
Fuente: el autor



Mezcla/dilución en agua peptonada
Fuente: el autor



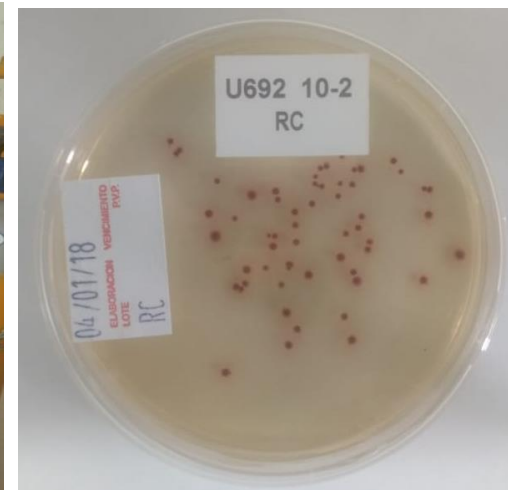
Siembra de diluciones
Fuente: el autor



Siembra por dispersión
Fuente: el autor



Incubación en microaerofilia
Fuente: el autor



Crecimiento positivo
Fuente: el autor

Anexo 10. Extracción, Pre-PCR, FlaA-PCR, PCR -RFLP.



Extracción ADN en termobloque
Fuente: el autor



Almacenamiento de lisados
Fuente: el autor



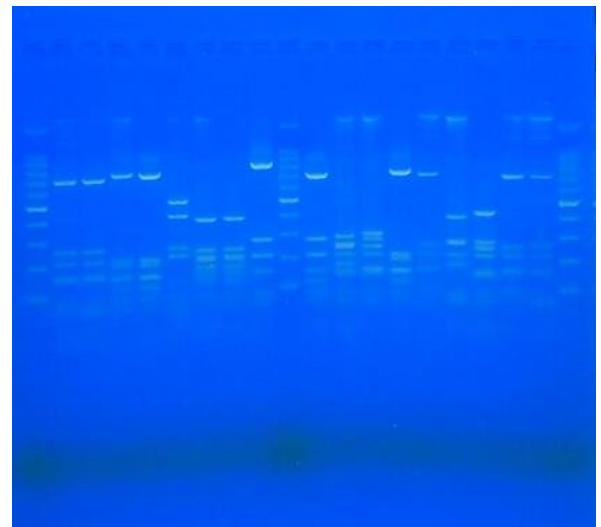
Elaboración de Mastermix
Fuente: el autor



Programación Termociclador
Fuente: el autor



Electroforesis
Fuente: el autor



Resultados en gel de agarosa
Fuente: el autor