

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y  
BIOQUÍMICA  
MAESTRIA EN BROMATOLOGIA**



**EVALUACION DE LA PRESENCIA DE  
*Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Salmonella* spp.  
EN CARNE CRUDA DE POLLO, DE EXPENDIO  
EN LA CIUDAD DE LA PAZ**

Tesis de postgrado presentada para la obtención del grado *Mágister Scientiarum* en  
“Bromatología”

**POR: Lic. Esp. MARCELINA CONDORI TICONA**

**LA PAZ - BOLIVIA  
Octubre, 2022**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y  
BIOQUÍMICA  
MAESTRIA EN BROMATOLOGIA**



**EVALUACION DE LA PRESENCIA DE  
*Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Salmonella* spp.  
EN CARNE CRUDA DE POLLO, DE EXPENDIO  
EN LA CIUDAD DE LA PAZ**

Tesis de postgrado presentada para la obtención del grado *Mágister Scientiarum* en  
“Bromatología”

**POR: Lic. Esp. MARCELINA CONDORI TICONA**

**TUTOR: ANGELICA MARIA ESPADA SILVA M.Sc  
PILAR DONADO GODOY Ph.D.**

**LA PAZ - BOLIVIA  
Octubre, 2022**

*Dedico con mucho cariño éste trabajo de investigación:*

*A mis hijos Katty Diana, José Manuel y Pedro Manuel por hacer de mi hogar un lugar de paz y refugio.*

*A mi esposo Freddy Pérez por su incondicional apoyo.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darme la vida, una familia y acompañarme en los momentos más difíciles de mi vida.

Al Postgrado Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, por acogerme durante mi formación en el Postgrado de Bromatología.

A la Dra. Angélica Espada Silva, por guiarme en la realización de este trabajo que no hubiera sido posible sin su ayuda.

A la Ph.D. Pilar Donado Godoy, por brindarme su amistad y apoyarme en las bases del trabajo de investigación.

A mis tribunales Dra. María Teresa Alvares Aliaga, Dra. Carla Crespo Melgar y Dra. Aneth María Vasquez Michel, por sus valiosos aportes en la revisión del trabajo de investigación.

A la Dra. Romina Segurondo Loza, Directora del Postgrado, por su apoyo en la culminación de mi trabajo de investigación.

Al Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico en Salud (SELADIS), laboratorio de Microbiología de Alimentos, por acogerme durante el trabajo de investigación 2018 al 2019.

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>1 INTRODUCCION</b> .....	<b>3</b>
<b>2 ANTECEDENTES</b> .....	<b>5</b>
<b>3 MARCO TEORICO</b> .....	<b>7</b>
3.1 Enfermedad de transmisión por alimentos (ETA).....	7
3.1.1 Transmisión alimentaria.....	7
3.1.1.1 Carne de pollo y contaminación.....	8
3.2 <i>Campylobacter</i> .....	12
3.2.1 Epidemiología.....	12
3.2.2 Características microbiológicas de <i>Campylobacter</i> spp. ....	14
3.2.2.1 Taxonomía.....	14
3.2.2.2 Morfología y características fisiológicas.....	14
3.2.2.1 Aislamiento de <i>Campylobacter</i> .....	16
3.2.3 Patogénesis de las infecciones por <i>Campylobacter</i> . ....	18
3.3 <i>Salmonella</i> .....	20
3.3.1 Taxonomía y nomenclatura.....	20
3.3.2 Morfología y características fisiológicas de <i>Salmonella</i> .....	23
3.3.3 Patogénesis de las infecciones por <i>Salmonella</i> .....	24
3.3.4 Epidemiología.....	26
3.3.5 Aislamiento de <i>Salmonella</i> .....	28

3.4	Método de ensayo microbiológico.....	30
3.4.1	Selección de métodos .....	30
3.5	Validación de métodos microbiológicos cualitativos .....	31
3.5.1	Tipos de validación.....	31
3.5.1.1	Validación primaria .....	32
3.5.1.2	Validación secundaria o verificación.....	32
3.5.2	Parámetros de desempeño de validación .....	33
3.5.2.1	Verificación, método cualitativo.....	33
3.5.2.1.1	Límite de detección.....	33
3.5.2.1.2	Inclusividad.....	34
3.5.2.1.3	Exclusividad .....	34
3.5.2.1.4	Sensibilidad analítica .....	34
3.5.2.1.5	Especificidad analítica .....	35
<b>4</b>	<b>JUSTIFICACION.....</b>	<b>36</b>
<b>5</b>	<b>PREGUNTA DE INVESTIGACION .....</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
6.1	Objetivo general.....	38
6.2	Objetivos específicos .....	38
<b>7</b>	<b>PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS .....</b>	<b>38</b>
<b>8</b>	<b>DISEÑO METODOLOGICO .....</b>	<b>39</b>
8.1	Tipo de investigación.....	39
8.2	Diseño de investigación.....	39

<b>9</b>	<b>MÉTODO</b> .....	<b>42</b>
9.1	Sitio o contexto del estudio.....	42
9.1.1	Ubicación.....	42
9.1.2	Descripción del ámbito de estudio.....	42
9.1.3	Descripción del ambiente de estudio .....	43
9.2	Definición de la muestra .....	43
9.3	Tamaño de muestra .....	44
9.4	Factores de estudio y variables de respuesta.....	45
9.4.1	Verificación de método analítico.....	45
9.4.2	Evaluación de la presencia de <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> y <i>Salmonella</i> spp. en carne cruda de pollo de expendio en la ciudad de La Paz .....	46
9.4.3	Material Biológico .....	47
9.4.4	Equipos .....	47
9.4.5	Reactivos y materiales .....	47
9.5	Procedimiento .....	47
9.5.1	Verificación de métodos analíticos de ISO 10272-1:2017 y NB/ISO 6579:2008	47
9.5.1.1	Verificación del método analítico ISO 10272-1:2017 .....	50
9.5.1.1.1	Verificación de Limite detección.....	51
9.5.1.1.2	Determinación Inclusividad.....	52
9.5.1.1.3	Determinación de Exclusividad .....	53
9.5.1.1.4	Características fenotípicas de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> .....	54
9.5.1.2	Verificación del método NB/ISO 6579:2008 .....	55

9.5.1.2.1	Determinación de Limite detección.....	55
9.5.1.2.2	Determinación Inclusividad.....	56
9.5.1.2.3	Determinación de Exclusividad.....	58
9.5.1.2.4	Sensibilidad y especificidad de los métodos ISO 10272:2017 y NB/ISO 6579:2008 .....	59
9.5.1.2.5	Características fenotípicas de <i>Salmonella</i> Thypimurium .....	60
9.5.2	Evaluación de la presencia de <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> y <i>Salmonella</i> spp. en carne de pollo. ....	60
9.5.2.1	Procedimiento Norma ISO 10272-1:2017 .....	61
9.5.2.2	Procedimiento NB/ISO 6579:2008.....	62
<b>10</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>65</b>
<b>11</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>66</b>
11.1	Verificación de indicadores de desempeño del método analítico ISO 10272-1: 2017 y NB/ISO 6579: 2008.....	66
11.1.1	Verificación del método analítico ISO 10272-1: 2017 .....	66
11.1.1.1	Límite de Detección (LD).....	67
11.1.1.2	Inclusividad.....	68
11.1.1.3	Exclusividad.....	69
11.1.1.4	Sensibilidad y Especificidad .....	70
11.1.1.5	Características fenotípicas de cepas de <i>Campylobacter</i> con la norma ISO 10272: 1- 2017 .....	71



11.1.2 Determinar indicadores de desempeño del método analítico NB/ISO 6579:2008	73
11.1.2.1 Límite de Detección	73
11.1.2.2 Inclusividad	74
11.1.2.3 Exclusividad	75
11.1.2.4 Sensibilidad y especificidad del método	76
11.1.2.5 Características Fenotípicas de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311	77
11.2 Determinación de <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> y <i>Salmonella</i> spp. en carne cruda de pollo de expendio en la ciudad de La Paz	79
11.3 <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> y <i>Salmonella</i> spp. en carne cruda de pollo por factores de estudio	83
11.3.1 Macrodistrictos	83
11.3.2 Tipo de Mercado	88
11.3.3 Modo de expendio	93
11.3.4 Procedencia avícola	98
<b>12 DISCUSIONES</b>	<b>104</b>
<b>13 CONCLUSIONES</b>	<b>116</b>
<b>14 RECOMENDACIONES</b>	<b>118</b>
<b>15 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>119</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Condiciones para crecimiento de las especies termotolerantes de <i>Campylobacter</i> .....	9
<b>Tabla 2</b> Requerimiento microbiológico para pollo crudo fresco .....	12
<b>Tabla 3</b> Factores de virulencia de <i>Campylobacter jejuni</i> .....	19
<b>Tabla 4</b> Nomenclatura de <i>Salmonella</i> en uso en los CDC .....	21
<b>Tabla 5</b> Pruebas bioquímicas para <i>Salmonella</i> enterica subesp. enterica (I) .....	24
<b>Tabla 6</b> Factores de virulencia de <i>Salmonella</i> .....	26
<b>Tabla 7</b> Pruebas bioquímicas para <i>Salmonella</i> spp. ....	30
<b>Tabla 8</b> Diseño de investigación para la verificación de los métodos analíticos de la Norma ISO: 10272: 2017 y NB/ISO 6579:2008.....	40
<b>Tabla 9</b> Diseño de la evaluación de la presencia de <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Campylobacter coli</i> y <i>Salmonella</i> spp., en carne cruda de pollo .....	41
<b>Tabla 10</b> Distribución del número de muestras de carne de pollo por macrodistrito de la ciudad de La Paz .....	45
<b>Tabla 11</b> Tabla de contingencia 2x2, Determinación de la Sensibilidad y Especificidad del método.....	59
<b>Tabla 12</b> Resultados de Verificación de Indicadores de Desempeño del Método Analítico ISO 10272-1: 2017 .....	66
<b>Tabla 13</b> Determinación de Limite de Detección del Método ISO 10272 para <i>Campylobacter jejuni</i> en carne cruda de pollo.....	67

<b>Tabla 14</b> Resultados de Inclusividad de <i>Campylobacter</i> spp. (cepas nativas), ATCC 33291 y ATCC 33559 .....	68
<b>Tabla 15</b> Resultados de Exclusividad de <i>Campylobacter</i> spp .....	69
<b>Tabla 16</b> Tabla de Contingencia para la Determinación Sensibilidad y Especificidad ..	70
<b>Tabla 17</b> Características fenotípicas de <i>Campylobacter jejuni</i> (ATCC 33291) y <i>Campylobacter coli</i> (ATCC 33559).....	71
<b>Tabla 18</b> Resultados de verificación de indicadores de Desempeño del Método Analítico NB/ISO 6579:2008 .....	73
<b>Tabla 19</b> Resultados de LD de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311, en carne cruda de pollo.....	73
<b>Tabla 20</b> Resultados de Inclusividad de <i>Salmonella</i> sp. ....	74
<b>Tabla 21</b> Resultados de nivel de detección de Interferentes para <i>Salmonella</i> spp. ....	75
<b>Tabla 22</b> Determinación Sensibilidad y Especificidad .....	76
<b>Tabla 23</b> Resultados de las características fenotípicas de <i>Salmonella</i> Typhimurium cepa ATCC 13311 .....	77
<b>Tabla 24</b> Resultado de pruebas serológicas para <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311 .....	78
<b>Tabla 25</b> Tabla de Contingencia entre <i>Campylobacter</i> spp. en carne cruda de pollo en macrodistritos de la Ciudad de La Paz.....	84
<b>Tabla 26.</b> Prueba de Chi Cuadrado entre <i>Campylobacter</i> spp. en carne cruda de pollo y macrodistritos de la Ciudad de La Paz.....	85

<b>Tabla 27</b> Tabla de contingencia de <i>Salmonella</i> spp. en carne cruda de pollo por macrodistrito .....	86
<b>Tabla 28</b> Prueba de Chi Cuadrado, <i>Salmonella</i> spp en carne cruda de pollo por macrodistrito .....	87
<b>Tabla 29.</b> Tabla de contingencia entre <i>Campylobacter</i> spp. en carne cruda de pollo por tipo de mercado de la ciudad de La Paz.....	89
<b>Tabla 30</b> Prueba de Chi cuadrado entre <i>Campylobacter</i> spp. en carne cruda de pollo y tipo de mercado de la Ciudad de La Paz.....	90
<b>Tabla 31</b> Tabla de contingencia de <i>Salmonella</i> spp. en carne cruda de pollo por tipo de mercado.....	91
<b>Tabla 32</b> Prueba de Chi cuadrado de <i>Salmonella</i> spp. en carne cruda de pollo y tipo de mercado de la ciudad de La Paz.....	92
<b>Tabla 33</b> Tabla de contingencia de <i>Campylobacter</i> spp. en carne cruda de pollo por tipo de expendio .....	94
<b>Tabla 34</b> Prueba de Chi cuadrado <i>Campylobacter</i> spp. en carne cruda de pollo por tipo de expendio .....	94
<b>Tabla 35</b> Tabla de contingencia de <i>Salmonella</i> spp. en carne cruda de pollo por tipo de expendio .....	96
<b>Tabla 36</b> Prueba de Chi cuadrado de <i>Salmonella</i> spp. en carne cruda de pollo por tipo de expendio .....	97
<b>Tabla 37</b> Tabla de contingencia entre <i>Campylobacter</i> spp. en carne cruda de pollo y marca de pollo.....	99

<b>Tabla 38</b> Prueba de Chi cuadrado de <i>Campylobacter</i> spp. en carne cruda de pollo por marca de pollo .....	100
<b>Tabla 39</b> Tabla de contingencia entre marca de pollo y presencia de <i>Salmonella</i> spp. en carne de pollo .....	102
<b>Tabla 40</b> Prueba de Chi cuadrado <i>Salmonella</i> spp. en carne cruda de pollo por marca de pollo .....	102

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Clasificación de Salmonella .....	23
<b>Figura 2</b> Flujograma de la verificación de los métodos analíticos ISO 10272-1 y ISO/NB 6579.....	49
<b>Figura 3</b> Identificación de Colonias Típicas de <i>C. jejuni</i> ATCC 33291 en mCCDA en LD .....	67
<b>Figura 4</b> Características de las colonias de <i>Campylobacter</i> spp. en mCCDA .....	68
<b>Figura 5</b> Características Fenotípicas de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> .....	72
<b>Figura 6</b> Prueba de Hidrolisis de Hipurato para <i>C. coli</i> y <i>C. jejuni</i> .....	72
<b>Figura 7</b> LD en matriz carne de pollo fortificada con <i>Salmonella</i> Typhimurium cepa ATCC 1331 .....	74
<b>Figura 8</b> Característica de las colonias de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311 y cepa nativa.....	78
<b>Figura 9</b> Resultados de pruebas bioquímicas y serológica de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311 .....	78
<b>Figura 10</b> Presencia de <i>Campylobacter</i> spp. en Carne Cruda de Pollo, de expendidos en la ciudad de La Paz .....	79
<b>Figura 11</b> Presencia de <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> en carne cruda de pollo que se expende en la Ciudad de La Paz .....	80
<b>Figura 12</b> Resultados de presencia de <i>Salmonella</i> spp., en carne cruda de pollo que se expende en la ciudad de La Paz .....	81

<b>Figura 13</b> Porcentaje de presencia de Salmonella spp. y Campylobacter spp. por unidad de carne de pollo crudo que se expende en la ciudad de La Paz.....	82
<b>Figura 14</b> Presencia C. jejuni y C. coli en carne cruda de pollo por macrodistritos de la ciudad de La Paz .....	83
<b>Figura 15</b> <i>Porcentaje de presencia de Campylobacter spp. en carne cruda de pollo por macrodistrito de la ciudad de La Paz</i> .....	85
<b>Figura 16</b> Porcentaje de presencia de Salmonella spp. en carne cruda de pollo por macrodistrito .....	87
<b>Figura 17</b> Presencia de C. jejuni y C.coli en carne cruda de pollo por tipo de mercado	88
<b>Figura 18</b> Porcentaje de presencia de Campylobacter spp. en carne cruda de pollo por tipo de mercado.....	90
<b>Figura 19</b> Porcentaje de Presencia de Salmonella spp. en Carne Cruda de Pollo por Tipo de Mercado .....	92
<b>Figura 20</b> Presencia de C. jejuni y C. coli en carne cruda de pollo por modo de expendio .....	93
<b>Figura 21</b> Porcentaje de Presencia de Campylobacter spp. en carne de pollo por modo de expendio .....	95
<b>Figura 22</b> Porcentaje de presencia de Salmonella spp. en carne de pollo por modo de expendio .....	97
<b>Figura 23</b> Presencia de C. jejuni y C. coli en carne cruda de pollo por procedencia avícola.....	98

<b>Figura 24</b> Porcentaje de la presencia de <i>Campylobacter</i> spp. en carne cruda de pollo por procedencia avícola.....	101
<b>Figura 25</b> Porcentaje de presencia de <i>Salmonella</i> spp. en carne cruda de pollo por procedencia avícola.....	103



## RESUMEN

La campilobacteriosis y la salmonelosis son enfermedades zoonóticas transmitidas al hombre por alimentos, siendo la fuente principal la carne de pollo contaminada. En Bolivia no se tienen datos actualizados de contaminación en éste alimento. Con el objeto de evaluar la presencia de *Campylobacter* y *Salmonella* en carne cruda de pollo en puntos de expendio de la ciudad de La Paz, se analizaron 108 muestras, con criterios definidos. El tipo de investigación es descriptivo y observacional, según el diseño es transversal. Para el análisis estadístico se utilizó el paquete Info Estat 2014. Se trabajó con los métodos analíticos ISO 10272-1:2017 y NB/ISO 6579:2008 verificados en condiciones propias del laboratorio de Microbiología de Alimentos del Instituto SELADIS, con un Límite de Detección de 3 UFC/25g. Los resultados de la presencia de *Campylobacter* spp. es 80% y *Salmonella* ssp 69 % en carne cruda de pollo. Además, se evidencio en un 57% la contaminación mixta por ambos microorganismos en una misma muestra. En la identificación de especies termófilas de *Campylobacter* por pruebas bioquímicas, se determinó la presencia de *C. jejuni* 93% y *C. coli* 7%. De acuerdo al análisis estadístico de Chi cuadrado de la frecuencia de *Campylobacter*, se acepta la hipótesis alterna (Ha), demostrando que las variables tipo de mercado, tipo de expendio y Marca es dependiente de la variable presencia de *Campylobacter* spp., con un 95% de confianza. Para *Salmonella* spp. se acepta la hipótesis nula (Ho).

Los valores hallados en la investigación serán un aporte significativo en el manejo de datos epidemiológico correctos de nuestro departamento incluso del país. Esto conlleva a la toma de medidas preventivas por parte de las autoridades departamentales y nacionales, para evitar las contaminaciones de los alimentos.

## ABSTRACT

Campylobacteriosis and salmonellosis are zoonotic diseases transmitted to man by food, being chicken meat the main contaminated source. In Bolivia there are no updated data about the contamination in this food. In order to determine the presence of *Campylobacter* and *Salmonella* in raw chicken meat at points of sale in the city of La Paz, 108 samples were analyzed, with well-defined criteria, the type of research is descriptive and exploratory, and cross according to the design. For the statistical analysis the package Info Status 2014 was used. We worked with the analytical methods ISO 10272-1: 2017 and NB / ISO 6579: 2008, verified under conditions of the Food Microbiology laboratory of the SELADIS Institute, with a Detection Limit of 3 UFC/25g. The results of the presence of *Campylobacter* spp. are 80% and *Salmonella* ssp. and 69% in raw chicken meat. In addition, 57% of mixed contamination by both microorganisms was evidenced in the same sample. In the identification of thermophilic *Campylobacter* species by biochemical tests, the presence of *C. jejuni* 93% and *C. coli* 7% was determined. The Chi-square statistical analysis of the frequency of *Campylobacter*, the alternative hypothesis (Ha) is accepted, showing that the variable type of market, type of outlet and Brand and dependent on the variable presence of *Campylobacter* spp, at a level of 95% of confidence. For *Salmonella* spp the null hypothesis (Ho) was accepted.

It should be noted that the values found in the investigation will be a significant contribution in the management of correct epidemiological data from our department, including the country. This leads to the taking of preventive measures by the national departmental authorities, to avoid contamination of food.

## 1 INTRODUCCION

Campilobacteriosis y la salmonelosis son enfermedades zoonóticas, causantes de gastroenteritis humana, afectando principalmente a niños, adultos de la tercera edad y personas inmunocomprometidas. También, está asociado al aumento del consumo de carne de pollo. En Bolivia, cada ciudadano consume en promedio 43 kilos de carne de pollo por año, según datos de la Asociación Nacional de Avicultores (ANA). Si el consumo se analizará por departamento, la balanza se inclina para La Paz y El Alto con un consumo per cápita de 60 kilogramos de carne de pollo por año, en Latinoamérica el promedio es 34 kilogramos y el más alto está en Argentina con 60 kg. (El Mundo, 2018). Datos actualizados muestran que la demanda de consumo per cápita es 44 kg fue el 2021 en Bolivia (ANA, 2022)

En Estados Unidos, la infección por campilobacteriosis es la segunda causa más común de infecciones bacterianas después de salmonelosis, con 2,4 millones de casos estimados que se producen al año (Schielke et al., 2014).

Desde el año 2005 al año 2013, *Campylobacter* es el patógeno bacteriano gastrointestinal más comúnmente reportado en humanos en la Unión Europea (UE). El número de casos confirmados de campilobacteriosis humana fue de 214,779 con una tasa de notificación de la UE de 64.8 por 100,000 habitantes que estaba al mismo nivel que en 2012. Teniendo en cuenta el alto número de casos de campilobacteriosis humana, la gravedad en términos de letalidad reportada fue baja (0.05%) (European Food Safety Authority, 2015).

En Bolivia, se tiene pocos datos publicados sobre la presencia de *Salmonella* y *Campylobacter* en carne de pollo. Se evidencia, la falta de trabajos de investigación respecto a los dos microorganismos objeto de este trabajo, además resaltar que en la Ciudad de La Paz ningún laboratorio realiza el diagnóstico de *Campylobacter* spp. de rutina, estas deficiencias, incrementan el manejo de datos epidemiológico no correctos de nuestro departamento incluso de nuestro país. Esto conlleva a la no toma de medidas preventivas por parte de las autoridades departamentales nacionales, para evitar las contaminaciones de los alimentos.

Por todo lo mencionado el trabajo de investigación tiene dos aportes importantes, primero, la verificación de los métodos de diagnóstico microbiológico para *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp. en el laboratorio de Microbiología de Alimentos del Instituto SELADIS, y la evaluación de la presencia *C. jejuni*, *C. coli* y *Salmonella* spp. en carne cruda de pollo en puntos de expendio de la ciudad de La Paz (trabajo realizado de enero 2018 a febrero del 2019).

## 2 ANTECEDENTES

En Bolivia se tienen pocos trabajos de investigación y no son actuales. El año 2009 el laboratorio de la cátedra de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Mayor de San Andrés, publicaron un trabajo de investigación “Pesquisa de *Campylobacter* spp. en heces de palomas y gallinas” dando como resultado 29% de positivos, el año 2008 a través de la FAO el Instituto Nacional de Laboratorios de Salud (INLASA) y la Red de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos (RELOAA) reportan algunos alimentos contaminados por *Salmonella* spp., en carne cruda de pollo 26% de positivos. El año 2015 la Dirección Universitaria de investigación dependiente de la Universidad Gabriel René Moreno, publica un proyecto de investigación “Epidemiología participativa con impacto en salud pública por riesgo de expendio de alimentos de origen animal (carne de pollo) contaminados por *Salmonella* spp., en mercados públicos de la ciudad de Santa Cruz de la Sierra, los resultados que obtienen en esta investigación son: de 112 puestos de venta de carne de pollo 2 positivos (método microbiológico convencional) que es igual 1,79% de positivos a *Salmonella*.

En México el año 2016, los investigadores Rodríguez, Gómez y Vásquez, realizaron un trabajo titulado “Presencia de *Campylobacter* y *Salmonella* en pollo a la venta en Gómez Palacio Durango, México “trabajaron con 76 muestras de carne cruda de pollo expendidos en centros de abasto, donde se aisló *Campylobacter* spp. en el 89% de las muestras analizadas y *Salmonella* en el 63%. Sus resultados coinciden con los de otros estudios que demuestran que *Campylobacter* y *Salmonella* se asocian comúnmente con productos de pollo.

En Lima Perú, los investigadores: Anampa D, Benites C, Lázaro C, Espinoza J, Angulo P, Díaz D, et al (2020), analizaron 120 muestras de piel de pollo provenientes de tres mercados de los distritos de San Martín de Porres (n = 30), Santa Anita (n = 20) e Independencia (n = 70), ubicados en la Provincia de Lima, Perú. Realizaron el análisis microbiológico de las muestras según las recomendaciones de la norma ISO 10272-1:2017. Además, realizaron la confirmación por reacción en cadena de la polimerasa de género y especie. Sus resultados son: de 120 muestras de piel de pollo, 117 dieron positivas (97,5%), de las cuales 100% fueron compatibles con *Campylobacter coli*, este trabajo no tienen relación con otros trabajos de investigación ya que la mayoría reporta *Campylobacter jejuni* en pollo,

### 3 MARCO TEORICO

#### 3.1 Enfermedad de transmisión por alimentos (ETA)

La Organización Mundial de la Salud (OMS), (2015) menciona que “las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) constituyen una importante causa de morbilidad y mortalidad, y un significativo impedimento al desarrollo socioeconómico en todo el mundo”. Además, en una publicación, *Estimaciones de la OMS, Carga Mundial de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (2007 – 2015)* afirma que “cada año en todo el mundo, los alimentos inseguros causan 600 millones de casos de enfermedades transmitidas por alimentos y 420 000 muertes. La OMS estimó que se pierden 33 millones de años de vidas saludables” (p. 83).

Entre los patógenos de transmisión alimentaria más comunes se encuentra *Salmonella*, *Campylobacter* y *Escherichia coli* enterohemorrágica, que afectan a millones de personas cada año, a veces con consecuencias graves o mortales, (I.World Health Organization, 2015).

##### 3.1.1 Transmisión alimentaria

Los casos de infección por *Campylobacter* son causados principalmente por la ingestión de leche cruda, carne de ave cruda o poco cocinada y agua potable. Los alimentos asociados con los brotes de salmonelosis son: huevos, carne de ave y otros productos de origen animal. *Escherichia coli* enterohemorrágica se asocia con el consumo de leche no pasteurizada, carne poco cocinada, fruta y hortalizas frescas (I.World Health Organization, 2015).

### 3.1.1.1 Carne de pollo y contaminación

La carne de pollo es uno de los vehículos alimentarios más importantes para transmisión de *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp.

En Bolivia, cada ciudadano consume en promedio 43 kilos de carne de pollo por año, según datos que maneja la Asociación Nacional de Avicultores (ANA) (Opinion Diario de circulación Nacional, 2019). Las ciudades de La Paz y El Alto, tienen un consumo per cápita de 60 kilogramos de carne de pollo por año, siendo el departamento con mayor consumo de pollo en Bolivia. Cifra que ubica a este país como el segundo consumidor latinoamericano de esta proteína animal (Gutierrez, 2019). Datos que contribuyen al incremento de la posibilidad de que la carne de pollo constituya el principal vehículo para la transmisión de *Campylobacter* y *Salmonella*.

El pollo vivo y su carne cruda son un excelente sustrato de crecimiento para *Campylobacter* por sus características fisicoquímicas de crecimiento, como se describe en la Tabla 1. La carne de pollo se caracteriza por tener una actividad de agua ( $a_w$ ) alta, entre 0,98 y 0,99, su pH varía ligeramente dependiendo de la presa: la pechuga de pollo tiene un pH entre 5,7 y 5,9 mientras que el pH del músculo de la pierna oscila entre 6,4 y 6,7, parámetros que se encuentran dentro de los requerimientos de crecimiento de *Campylobacter* (Klotz et al, 2013).



**Tabla 1**

*Condiciones para crecimiento de las especies termotolerantes de Campylobacter*

<b>Condiciones</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Óptimo</b>	<b>Máximo</b>
Temperatura (°C)	32	42 – 43	45
pH	4,9	6,5 – 7,5	~ 9
Cloruro de sodio	-	0,5	1,5
Actividad del agua (a <sub>w</sub> )	>0,987	0,997	-
Atmosfera	-	5% O <sub>2</sub> + 10% CO <sub>2</sub>	-

Nota: (-) Indica ausencia de información específica. Fuente: Klotz et al, 2013

Por lo mencionado el pollo y su carne se contaminan con *Campylobacter* en las diferentes etapas de su producción desde la granja a la mesa.

En la etapa de producción primaria -comprende granja y su transporte- las medidas de bioseguridad deficientes en los galpones de pollos de engorde están relacionadas con la prevalencia de *Campylobacter* en los lotes de pollos de engorde y existe una relación lineal entre la prevalencia de *Campylobacter* en los lotes de pollos de engorde y el riesgo para salud pública, (Klotz, 2013). La temperatura ideal para el desarrollo de *Campylobacter* es de 40 a 42 °C, temperatura interna de los pollos es 40 °C, factor que favorece al desarrollo del microorganismo termotolerante. El número de células requeridas para infectar a aves es 500 UFC aproximadamente. Una vez en el intestino de las aves colonizada con *Campylobacter* se multiplican rápidamente, eliminando heces con altas cargas patógenas, contaminando el medio donde habitan, facilitando la coprofagia y diseminación del microorganismo. (Di Pillo & Sotomayor, 2017) .

En la etapa de faenado, en esta área la contaminación en la carcasa de pollo tiene una prevalencia alta. Di Pillo y Sotomayor (2017) mencionan: “Según referencias

internacionales, entre el 60% y 80% de los lotes de pollos de engorde están colonizados con *Campylobacter* spp. en la edad del sacrificio” (p. 19). Demostrado que generalmente la prevalencia de la bacteria en carcasa, se encuentra en la fase de desplumado y eviscerado, considerándose como la mayor fuente de contaminación durante el procesamiento.

En la etapa de desprese, retiro de piel y fileteado -procesamiento secundario- comprende actividades de alta manipulación sobre las canales de pollo. Las exigencias microerofílicas de *Campylobacter* hacen que no crezca en esta etapa (Klotz, 2013).

En la etapa de comercialización -punto de expendio- en varios trabajos de investigación dan positivo a *Campylobacter*, esto se podría relacionar con fallas en la cadena de frío del producto, prácticas higiénicas deficientes en los establecimientos y contaminación cruzada con otros productos o el manipulador. En Costa Rica en un trabajo de investigación se determinó una frecuencia de aislamiento de *Campylobacter* spp. en 50% de los muslos (Zumbado, Arévalo, Donado, & Romero, 2014).

Una vez que el pollo crudo llega a la mesa del consumidor, la carne de ave poco cocida, muestra una asociación significativa entre la infección en humanos y el consumo alto de carne de pollo (Klotz, 2013).

La salmonelosis es una de las enfermedades bacterianas transmitidas por los alimentos más comunes en el mundo, principalmente a través de la carne de pollo. La inmensa mayoría de las infecciones humanas por *Salmonella* son transmitidas por los alimentos y se deben, en la mayor parte de los casos, a los serotipos de *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium, la prevalencia del microorganismo pueden ser muy distintos

según la localidad, el distrito, la región y el país; por tanto, la vigilancia y la identificación de los serotipos prevalentes en los humanos y en las aves de corral deberán llevarse a cabo con vistas a elaborar un programa de control para el área en cuestión (OIE.Organizacion Mundial de Sanidad Animal, 2018).

Las especies del género *Salmonella* son habitantes normales del intestino de las aves, en las que no producen sintomatología evidente principalmente *Salmonellas* móviles y su detección en el matadero sugiere la alta prevalencia de animales portadores que debe existir en las granjas de origen. Actualmente, en Bolivia, no existen datos publicados sobre la prevalencia de la salmonelosis en granjas de pollos parrilleros.

Existen numerosos estudios que señalan que el grado de contaminación de los productos cárnicos tiene una relación directa con la frecuencia de animales portadores que son sacrificados en el matadero (Marin, 2011). Por lo tanto, resulta prioritario llevar a cabo estudios epidemiológicos que permitan determinar la prevalencia y los factores de riesgo asociados a la presencia de *Salmonella* spp. en las explotaciones de origen, para reducir el nivel de contaminación en los mataderos. Los estudios publicados recientemente demuestran que existen varios factores de riesgo para la presencia de *Salmonella* en la producción de aves a nivel de granja, entre ellos los más importantes son los niveles de contaminación de las naves, el estado sanitario de los pollitos de un día, el agua y alimento y la presencia de vectores (Marin, 2011).

En Bolivia, la Norma Boliviana que se utiliza actualmente (Tabla 2), para evaluar los requisitos microbiológicos de carne de pollo es la NB 310013 Carnes y derivados - Carne de aves - Requisitos microbiológicos. Reportan como requisito microbiológico la ausencia

de *Salmonella* spp. en 25 gramos de alimento. Además, se observa que no está incluido el diagnóstico de *Campylobacter* spp.

**Tabla 2**

*Requerimiento microbiológico para pollo crudo fresco*

Requisitos	Plan de Muestreo		Valor de Referencia	
	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i> UFC/g	5	3	1 x10 <sup>2</sup>	1 x10 <sup>3</sup>
<i>Salmonella</i> spp.	5	0	Ausencia en 25g	
Aerobios mesófilos UFC/g	5	3	1 x10 <sup>5</sup>	1 x10 <sup>6</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> . UFC/g	5	1	1 x10 <sup>3</sup>	1 x10 <sup>4</sup>

Fuente: NB 310013 (2003)

### 3.2 **Campylobacter**

Según Procop (2017) afirma: “El microorganismo clasificado en la actualidad como *Campylobacter jejuni* fue descubierto 1931 por Jones y cols. como el agente causal de la de disentería invernal en ganado vacuno” (p. 432).

#### 3.2.1 **Epidemiología**

Las campilobacteriosis difieren en relación a la incidencia y fuentes entre los países desarrollados y los países en desarrollo. La transmisión de persona a persona se considera poco frecuente en los países desarrollados. Sin embargo, en los países en desarrollo los portadores humanos pueden tener una función más importante en la transmisión de la infección. Los pollos, las aves de corral y otros alimentos son las fuentes de infección más probables en los países desarrollados. En los países en desarrollo, la transmisión a través del agua, el contacto directo con animales y las fuentes del entorno son las principales vías

de infección en seres humanos. Las personas que trabajan en la producción o elaboración de alimentos también pueden constituir fuentes importantes de campilobacteriosis. (Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO], 2009)

*Campylobacter* es una de los cuatro principales patógenos causales mundiales de enfermedad diarreica. La elevada incidencia de diarrea por *Campylobacter*, su duración y sus posibles complicaciones le confieren gran importancia desde el punto de vista socioeconómico. En los países en desarrollo, las infecciones por *Campylobacter* son especialmente frecuentes en menores de 2 años, en los que a veces son mortales. También son afectados personas de la tercera edad e individuos inmunodeprimidos (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2018)

La incidencia máxima se produce en lactantes y niños pequeños, con un segundo pico de incidencia en adultos de 20 a 40 años. En países en vías de desarrollo la incidencia es mayor y la enfermedad sintomática ocurre en los niños pequeños, mientras que en el estado de portador crónico asintomático se observa en los adultos (Murray, 2014).

Ahora bien, no se conoce con exactitud cómo es que *C. jejuni* se encuentra asociado al síndrome de Guillain-Barré. Se piensa que este microorganismo induce una respuesta inmunológica de origen humoral y celular, y que debido a la forma homóloga -en el nivel molecular- de sus antígenos con los del tejido neuronal se produce una reacción cruzada con el componente gangliósido de la superficie de los nervios periféricos. La reacción inmune contra el antígeno “blanco” en la superficie de la membrana de la célula de Schwann o mielina, dando como resultado la neuropatía desmielinizante inflamatoria aguda (85% de los casos) o, si reacciona contra antígenos contenidos en la

membrana del axón, 15% de los casos en la forma axonal aguda (Hernández, Aguilera, & Castro, 2013)

### **3.2.2 Características microbiológicas de *Campylobacter* spp.**

#### **3.2.2.1 Taxonomía.**

*Campylobacter*, es un bacilo Gram negativo microaerófilico, pertenece a la clase Epsilonproteobacteria, orden Campylobacterales, familia Campylobacteriaceae, género *Campylobacter*. En la actualidad, existen 39 especies y 16 subespecies de *Campylobacter* reconocidas, la mayoría se asocia con enfermedades en humanos y animales (List of prokaryotic names with standing in nomenclature, 2018).

Según Murray (2014) solo 4 son especies patógenas frecuentes para el ser humano: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus* y *Campylobacter upsaliensis*.

#### **3.2.2.2 Morfología y características fisiológicas**

Las bacterias del género *Campylobacter* son bacterias Gram negativas, con forma de S, espiral o alas de gaviota de 0,2–0,8 µm de ancho y 0,5–5 µm de largo, con flagelos polares generalmente monótrico o a ambos extremos anfítrico, poseen una movilidad característica, como la de un sacacorchos o tirabuzón, campilobacterias termófilas pequeñas tienen un movimiento rápido, sin embargo, *Campylobacter fetus* tiene movilidad más lento. Son bacterias microaerófilas, necesitan cantidades pequeñas de oxígeno (5%), capnófilas necesitan cantidades altas de dióxido de carbono (10%) y 85% de nitrógeno (Stanchi, 2007).

Según Silva, y etal. (2011, como se citó en Lapierre, 2013) menciona que la mayoría de las especies de éste género crecen a una temperatura de 37°C, sin embargo *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lary* pueden crecer a 42°C, son oxidasa y catalasa positiva, además, éstas tres especies son cepas resistentes a la cefalotina (p.26). El metabolismo de *Campylobacter* está caracterizado por no oxidar ni fermentar carbohidratos, obtienen su energía a partir de aminoácidos y los intermediarios de cuatro a seis carbonos del ciclo de Krebs (Procop, 2017).

Se han descrito dos morfologías de *C. jejuni*: espiral y cocoide, debido a que se han descrito estados en los cuales cesan su metabolismo y pierden la capacidad de reproducirse *in vitro*, estado conocido como “viable pero no cultivable” (VPNC); tal estado es una manera de sobrevivir al estrés por falta de nutrientes, en el cuál la bacteria no puede ser cultivada *in vitro*, pero mantiene sus factores de virulencia como es el caso *C. jejuni*. este mismo mecanismo también se encontró en bacterias como *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli*, y otros. VPNC es un importante factor de virulencia, un potencial riesgo en la salud pública debido a que el agente no puede detectarse en cultivos, pero sí tiene la posibilidad de infectar al huésped. La manifestación fenotípica observable en *C. jejuni* es el cambio de formas en espiral (cultivables) a formas cocoides (no cultivables, pero viables), que también se caracterizan por desarrollar en su periferia un material viscoso (biopelícula) que les provee un microambiente que prolonga su sobrevivencia (Klotz, Vega, Mantilla, Ramirez, & Romero, 2013).

### 3.2.2.1 Aislamiento de *Campylobacter*

Para el aislamiento de *C. jejuni* y *C. coli* a partir de alimentos, heces y otros, se necesitan medios de cultivo enriquecidos, selectivos y diferenciales, debido a que éstos microorganismos son termófilos y microaerófilos, estas características hacen que su recuperación de los alimentos sea difícil.

También dificulta el aislamiento de *Campylobacter* termófilo, la toma de muestra, por lo mencionado, se debe utilizar normas ISO (International Standards Organization). Las normas para el método de muestreo recomendado se detallan en la ISO/TS 17728: Técnicas de muestreo para el análisis microbiológico de muestras de alimentos y alimentos para animales, en la ISO 13307 para muestreo en la etapa de producción primaria, en la ISO 17604 para el muestreo de canales, y en la ISO 18593 para muestreo de superficies. Dado que la bacteria es muy sensible a la temperatura de congelación, pero sobrevive mejor a bajas temperaturas, las muestras no deben congelarse, sino almacenarse a 3°C y sometido a análisis lo más rápido posible, evitando que las muestras se sequen. (International Standard ISO 10272-1, 2017)

En laboratorios de microbiología de alimentos se trabaja con normas verificadas, actualmente se usa norma ISO 10272-1, 2017 como método horizontal, aceptado para el aislamiento de *Campylobacter* a partir de: Productos destinados al consumo humano, productos destinados a la alimentación de los animales, muestras ambientales en el área de la producción de alimentos y piensos, manipulación y muestras de la etapa de producción primaria, como heces de animales, polvo e hisopos.



El análisis microbiológico convencional basado en la norma ISO 10272-1, utiliza medios de cultivo enriquecidos y selectivos para las diferentes fases del método analítico para su aislamiento:

**Medios de cultivo para aislamiento de *Campylobacter* spp.:**

*Campylobacter* utiliza como fuente de nutrientes a las peptonas, no fermenta carbohidratos, se utilizan caldo Bolton y Preston modificado, medios de cultivo selectivos. Los medios cultivo mencionados deben añadirse sangre de equino al 5%, para eliminar los compuestos tóxicos del oxígeno, que se forman cuando los medios de cultivo son expuestos a la luz (Procop, 2017). *C. jejuni* y *C. coli* son resistentes a varios antibióticos, esta capacidad se utiliza para eliminar microorganismos acompañantes en la muestra, por lo mencionado los antibióticos que se incluyen en los caldos son: vancomicina (inhibe cocos Gram positivos); polimixina B (inhibe *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas* spp.), trimetoprim (inhibe *Proteus* spp. y cocos Gram positivos) y cefalosporinas (inhiben *Enterobacter* spp., especies de *Serratia*, *Pseudomonas aeruginosa*, algunos *Proteus* spp. y *Yersinia enterocolitica*). La rifampicina fue sustituida por vancomicina en el medio Preston (Solis, 2011)

Para el aislamiento se utiliza el medio de cultivo agar de desoxicolato de cefoperazona de carbón modificado (mCCD agar), este medio de cultivo no contiene sangre, contiene: extracto de carne, enzimas digestivas de tejido animal, enzima digestiva de caseína, carbón activado, sulfato hidratado hierro, utilizados como nutrientes base para *Campylobacter* y antibiótico: Cefoperazona (inhibe desarrollo de hongos) y Anfotericina B (inhibe desarrollo de bacterias gram positiva y gram negativas) (ISO 10272-1, 2017)

### 3.2.3 Patogénesis de las infecciones por *Campylobacter*.

*Campylobacter* spp. ha sido descrito como uno de los principales agentes bacterianos de gastroenteritis aguda en humanos, las especies termófilas como *C. jejuni* y *C. coli* son las que se aislaron de humanos con enteritis, con mayor frecuencia *C. jejuni*, por lo mencionado es la especie más estudiada.

La infección por *Campylobacter* en humanos se adquiere por vía oral, por la ingestión de alimentos contaminados o por contacto con animales infectados, principalmente por aves de corral. La dosis mínima infectante de *Campylobacter jejuni* es  $10^4$  -éste inoculo es similar al que se necesita para la infección por *Salmonella* y *Shigella*- los microorganismos una vez que pasan la barrera de jugo gástrico, proliferan en el intestino delgado, invaden el epitelio y producen inflamación que da por resultado la aparición de eritrocitos y leucocitos en las heces. En ocasiones, la circulación sanguínea es invadida y se presenta un cuadro clínico de fiebre. Al parecer la invasión de tejido circunscrito junto con la actividad tóxica son la causa de la enteritis (Brooks, 2016).

La presencia de factores de virulencia de *Campylobacter* spp., mencionados en la Tabla 3, son los responsables del desarrollo de las patologías gastrointestinales, que facilitan la invasión y colonización de las bacterias en la mucosa intestinal.

**Tabla 3***Factores de virulencia de Campylobacter jejuni*

<b>Factor de virulencia</b>	<b>Papel que desempeña en el mecanismo de patogenicidad</b>
Presencia de flagelos	Motilidad, adherencia, colonización del hospedero, secreción e invasión. Secreción de proteínas: Cia ( <i>Campylobacter</i> invasión antigens).
Cápsula	CPS ( <i>C.jejuni</i> polysaccharide capsule). La ausencia de cápsula afecta la adherencia, Resistencia al suero y reduce la colonización en hurones ( <i>in vitro</i> ).
Lipopolisacarido (LPS)	Actividad endotóxica típica.
Producción de proteínas citotóxicas	Interviene en el desarrollo clínico de la enfermedad.
Toxinas extracelulares	Actividad citopática y enterotoxinas clásicas parecidas a las <i>E. coli</i>
Toxina distentora citoletal (CDT, cytolethal distending toxin)	Codificada por 3 genes (cdtA, cdtB, cdtC). Ocasiona distensión de la célula y provoca su muerte, que se observa con el plegado y la desintegración de la membrana celular y núcleo fragmentado.
Plásmido pVier	Codifica para un sistema de secreción tipo IV (SSTIV) que participa en la invasión celular y patogenicidad.
Gen tipo O	Codifica para una hipuricasa, principal gen para la identificación de cepas.

Fuente: Cervantes y Cravioto, 2007; Poly y Guerry, 2008 enunciado por Hernández, Aguilera, & Castro (2013)

Los mecanismos de virulencia más relevantes son la quimiotaxis, motilidad por la presencia de flagelos, la capacidad de adherencia e invasión a la célula eucariota, la producción de citotoxinas y lipopolisacaridos (Lapierre, 2013).

Los reservorios principales de *Campylobacter* spp son: Aves de corral, bovinos, ovinos, suinos, roedores, perros y gatos. La cantidad de hospederos varía con la especie,

*C. jejuni* tiene un amplio rango mientras que *C. coli* es más frecuentemente aislado de suinos. En ovejas clínicamente sanas no parece haber diferencias entre *C. jejuni* (34,1 %) y *C. coli* (33,1%) y la prevalencia de *Campylobacter* en gatos y perros sanos (18%, 23%) no parece ser significativamente diferente de aquellos con diarrea (16%, 27%) (Rodríguez, 2015).

### **3.3 Salmonella**

#### **3.3.1 Taxonomía y nomenclatura**

Las formulas antigénicas de los serotipos de *Salmonella* son definidas y mencionadas por el centro colaborativo para la referenciación e investigación de *Salmonella* de la Organización Mundial de La Salud (OMS) en el instituto Pasteur de Paris, Francia y los nuevos serotipos se exponen en las actualizaciones anuales del esquema Kauff-mann-White (Procop, 2017). *Salmonella* forma parte de la división Bacteriana:

Phylum: Proteobacteria,

Clase: Gamma-proteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

La nomenclatura de *Salmonella*, según la OMS comenzó a nombrar sólo de la subespecie I, los Centros de Control y Prevención de Enfermedades, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), de igual manera que la OMS, usan nombres para los serotipos de la subespecie I. el nombre del serotipo no se escribe con letras itálicas y la primera letra se escribe con mayúscula (Tabla 4).

*Salmonella* con más de 2400 serotipos descritos en el esquema actual de Kauffmann-White, son las más complejas de todas las Enterobacteriaceae (Procop, 2017). Actualmente se divide *Salmonella* en más de 2600 serotipos basados en sus reacciones serológicas a los antígenos lipopolisacárido somático (O), flagelar (H) y capsular (Vi) (Grimont & Weill, 2007).

**Tabla 4**

*Nomenclatura de Salmonella en uso en los CDC*

Posición Taxonómica	Nomenclatura Actual
Género (itálicas)	<i>Salmonella</i>
Especies (itálicas)	<i>enterica</i> , La cual incluye las subespecies I,II,IIIa, IIIb, IV, y VI <i>bongori</i> (antes subespecie V)
Serotipo (primera letra mayúscula, sin letras itálicas)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La primera vez que se menciona un serotipo en el texto, el nombre debe estar precedido por la palabra “serotipo” o “ser”.</li> <li>- Los serotipos que se nombren en subespecies I y se designa por la formula antigénica en las subespecies II, III, IV, VI y <i>S. bongori</i> (p. ej., <i>Salmonella</i> serotipo [ser.] Typhimurium, <i>Salmonella</i> II. 50:b:z6, <i>Salmonella</i> IIIb 60:k:z).</li> <li>- Los miembros de las subespecies II, IV, VI, y <i>S. bongori</i> conservan sus nombres si se les nombró antes del año 1966 (p. ej., <i>Salmonella</i> ser. Marina [IV 48: g, z51])</li> </ul>

Fuente: Procop, 2017

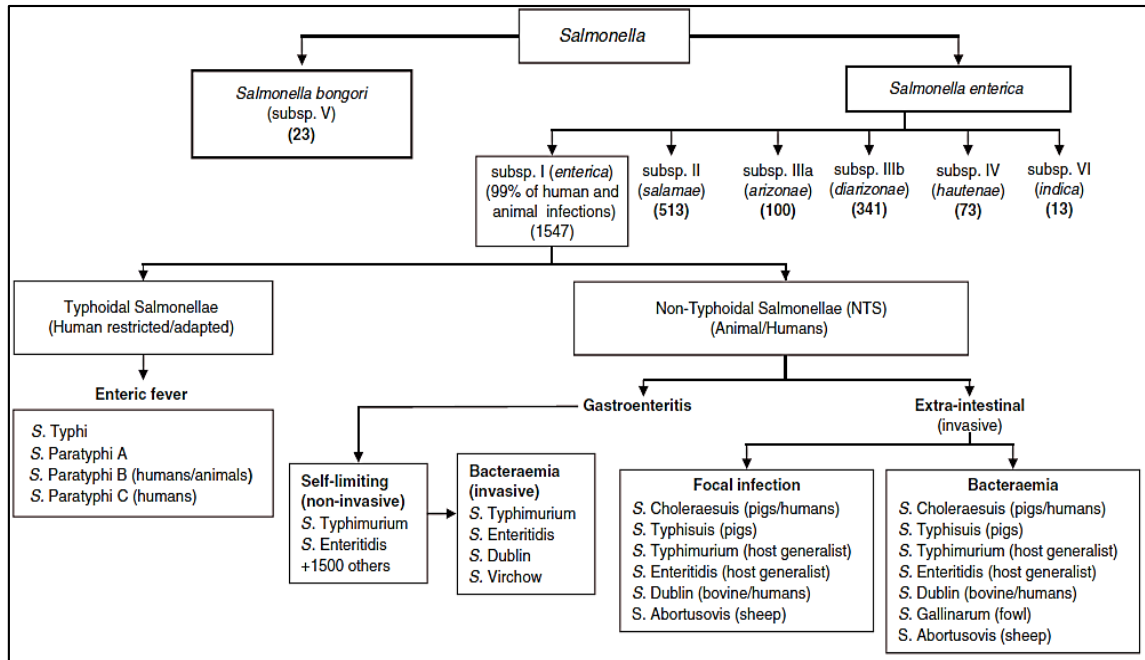
Según Betancor y Yim (2012) mencionan, que el género *Salmonella*, abarca 2 especies diferentes *S. enterica* y *S. bongori*. La *S. bongori* es patógena para el hombre, se aislaron de animales de sangre fría, principalmente reptiles. *S. enterica* incluye cepas patógenas, tanto para el hombre como para diferentes especies de reptiles, aves y mamíferos. La especie *S. enterica* se divide en 6 subespecies diferentes: subespecie enterica (I), salamae (II), arizonae (IIIa), diarizonae (IIIb), houtenae (IV) e indica (VI). *S. enterica* subespecie

*enterica*, es aislada fundamentalmente de mamíferos y aves, alcanzando la cadena alimenticia e infectando accidentalmente al hombre. Se estima que el 99% de los casos de salmonelosis humana están causados por cepas de la subespecie I.

Uzzau et al., 2000; Stevens et al., 2009 citado en Sanderson & Nair (2013) menciona que estos serotipos de *Salmonella*, descritos en la Figura 1, pueden subdividirse según el tipo de hospedero, y de acuerdo al tipo de hospedero las manifestaciones clínicas son diferentes de acuerdo a su hospedero se dividen en tres grupos: Primer grupo; Hospedero generalista (serovares ubicuos) incluye *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) y *Salmonella* Enteritidis que causan infecciones en diversos huéspedes humanos y animales; producen varios síntomas clínicos, principalmente gastroenteritis aguda y autolimitada. Le Minor, 1991; Langridge et al., 2008; Stevens et al., 2009. citado en Sanderson & Nair (2013). Segundo grupo; *Salmonella* adaptada al huésped (confinada a un pequeño número de huéspedes) como *Salmonella* Dublin en animales bovinos y *Salmonella* Choleraesuis en cerdos produce infecciones sistémicas, pero estos serovares también pueden infectar a humanos y a un número limitado de otras especies. Le Minor, 1991; Langridge et al., 2008; Stevens et al., 2009, citado en Sanderson & Nair (2013). Tercer grupo; *Salmonella* restringida al huésped, está asociada con infecciones sistémicas graves en un solo huésped: *S. typhi* y *S. paratyphi* hospedero exclusivo del hombre, causa fiebre entérica. *S. typhisuis* causa paratifoidea en cerdos, *S. gallinarum* causa fiebre tifoidea en aves y *S. abortusovis* causa abortos en ovejas, Le Minor, 1991; Stevens et al., 2009, citado en Sanderson & Nair (2013).

**Figura 1**

*Clasificación de Salmonella*



Fuente: Sanderson & Nair, 2013

### 3.3.2 Morfología y características fisiológicas de *Salmonella*

Los miembros del género *Salmonella* son bacilos Gram-negativos, miden 0,7-1,5 µm de ancho y 2 a 5 µm de largo, tienen flagelos peritricos rectos, la mayoría móviles con flagelos peritricos, solo dos especies son inmóviles *S. gallinarum-pullorum*, responsables del tifus aviar y pullorosis. Son anaerobios facultativos, no forman esporas. (Stanchi, 2007). En la tabla 5, se describe las pruebas bioquímicas de *Salmonella*, las características comunes son: reducen los nitratos a nitritos, en general fermentan la glucosa con producción de gas, producen sulfuro de hidrógeno y son capaces de desarrollar en medios de cultivo que sólo disponen de citrato como única fuente de carbono. Además, no

hidrolizan el indol ni la urea, no fermentan la lactosa, sacarosa, salicina e inositol y descarboxilan la lisina y orinitina, (Robles, 2017).

**Tabla 5**

*Pruebas bioquímicas para Salmonella enterica subesp. enterica (I)*

<b>Pruebas bioquímicas</b>	<b>Reacción</b>	<b>Prueba bioquímica</b>	<b>Reacción</b>
Motilidad	+	Glucosa (fermentación)	+
Reacción del nitrito	+	Manitol (fermentación)	+
Oxidasa	-	Maltosa	+
O/F	F	Lactosa	-
Hidrolisis de la urea	-	Adonitol	-
Indol	-	Dulcitol	+
Prueba de H <sub>2</sub> S	+	Sacarosa	-
Utilización de citrato	+	Lisina descarboxilasa	+
Malonato sódico	-	Ornitina descarboxilasa	+
Crecimiento en KCN	-	Arginina dihidrolasa	+
Rojo de metilo	+	Voges Proskauer	-
ONPG	-		

Fuente: García 2011 citado por Chinillach, 2017

### **3.3.3 Patogénesis de las infecciones por *Salmonella***

La dosis infecciosa media es  $10^5$  a  $10^8$  salmonelas para producir la enfermedad sintomática en el ser humano. Los microorganismos generalmente ingresan por vía oral, por lo general con alimentos y bebidas contaminadas. Las salmonelas producen tres tipos



de enfermedad en el ser humano: Fiebre entérica, septicemia, y enterocolitis, pero son frecuentes las formas mixtas (Brooks, 2016).

Una vez que ingresa al hospedador la *Salmonella*, resiste el ambiente ácido del estómago, luego pasa al intestino delgado y coloniza, penetra las células epiteliales y migra a la lámina propia de la región ileocecal, se multiplica en los folículos de la región linfóide presentándose hiperplasia e hipertrofia reticuloendotelial. Los neutrófilos son estimulados y fagocitan por lo que la infección se limita, en el caso de enteritis, a nivel del tracto gastrointestinal. Si son serotipos productores de fiebre entérica no son retenidas a este nivel, sino que migran a hígado y bazo por circulación hemática y se produce la bacteriemia. La respuesta inflamatoria media también la liberación de prostaglandina, estimula la producción de AMP cíclico y la secreción activa de líquidos, produciendo diarrea en el caso específico de la enteritis (Sánchez & Cardona, 2003).

Se pueden distinguir dos grupos de factores de virulencia en *Salmonella*: estructuras superficiales de la bacteria que son células diana del sistema inmune y genes de virulencia localizados en los cromosomas (Tabla 6).

**Tabla 6***Factores de virulencia de Salmonella*

<b>Factor de virulencia</b>	<b>Patogenia</b>
Lipopolisacárido (LPS) con actividad tóxica por el lípido A	Lípido A libera la endotoxina durante la lisis celular, este proceso hace que se active el complemento, liberación de citosinas, leucocitosis, trombocitopenia, fiebre, disminución de la circulación periférica y muerte
Cápsula	Relacionada con la capacidad invasiva, se protegen de la fagocitosis, mediante los antígenos capsulares hidrofílicos, los cuales repelen la superficie hidrofóbica de la célula fagocítica.
Flagelos	Dan movimiento a la bacteria hacia el epitelio y contribuyen en la inflamación.
Fimbrias	Le dan la capacidad de adherencia a la superficie del epitelio
El sistema de secreción de tipo III <i>Salmonella</i> es la única especie que se conoce tiene dos sistemas de secreción tipo III	SPI 1 es requerida para la penetración inicial a la mucosa intestinal  SP2 necesaria para los estados subsecuentes de infección sistémica

Fuente: Elaboración propia basado en: Murray (2014), Sánchez & Cardona (2003) y Sanderson & Nair (2013)

**3.3.4 Epidemiología**

*Salmonella* puede colonizar a casi todos los animales, incluidos a las aves de corral, reptiles, ganado, roedores, animales domésticos, aves y el ser humano. La propagación de un animal a otro y el uso de pisos contaminados con *Salmonella* mantienen un reservorio animal. Algunos serotipos, como *Salmonella* Typhi y *Salmonella* Paratyphi, están muy bien adaptados al ser humano y no producen enfermedad en otros hospedadores. Otros serotipos de *Salmonella* (por ejemplo, *Salmonella choleraesuis*) están adaptadas a los animales y cuando infectan al ser humano pueden producir una enfermedad grave.

Además, a diferencia de otros serotipos de *Salmonella*, las cepas muy adaptadas a los seres humanos (*Salmonella Typhi*, *Salmonella Paratyphi*) pueden sobrevivir en la vesícula biliar y establecer un estado de portador crónico, Por ultimo muchas cepas carecen de especificidad para un hospedador y causan enfermedad tanto en los hospedadores humanos como en los animales.

La mayoría de las infecciones son consecuencia de la ingestión de productos alimentarios contaminados y en los niños es una transmisión directa, por vía fecal oral. La incidencia de la enfermedad es más elevada en niños menores de 5 años y en adultos mayores de 60 años que se infectan durante los meses de verano y otoño cuando los alimentos contaminados se consumen en reuniones sociales al aire libre. Las principales fuentes de infecciones para el ser humano son las aves de corral, los huevos los productos lácteos y los productos preparados sobre superficies contaminadas. Se registraron más de 50 000 casos de infecciones por *Salmonella* -no tifoidea- en EEUU, en el año 2010 aunque se ha estimado que acurren más de 1,4 millones de infecciones y 600 muertes cada año. Las infecciones por *Salmonella typhi* se contraen al ingerir agua o alimentos contaminados por un manipulador infectado. No existe ningún reservorio animal. (Murray, 2014). Cada año se notifican en EEUU, un promedio de 400 a 500 infecciones por *Salmonella typhi*, la mayor parte de las cuales se adquieren durante viajes al extranjero. A diferencia de lo anterior, se estima que cada año se producen 21 millones infecciones y 200000 muertes por *Salmonella typhi* a nivel mundial. El riesgo de padecer la enfermedad es más alto en los niños desfavorecidos de los países en vías de desarrollo (Murray, 2014)

La dosis infecciosa por *Salmonella typhi* es baja  $10^4$  (OPS, 2019), por lo que es frecuente la transmisión de una persona a otra. Por el contrario, se necesita un gran inóculo  $10^6$  a  $10^8$  bacterias, para que se produzca enfermedad sintomática en el caso de otros serotipos de salmonella. Estos microorganismos se pueden multiplicar hasta alcanzar concentraciones elevadas cuando los alimentos contaminados no se conservan adecuadamente. La dosis infecciosa es menor en personas de riesgo para la enfermedad debido a su edad, estado de inmunodepresión o coexistencia de una enfermedad subyacente, reducción de pH gástrico. (Murray, 2014)

### **3.3.5 Aislamiento de *Salmonella***

El cultivo microbiológico y las pruebas bioquímicas son los procedimientos comunes para el aislamiento de *Salmonella*, también se realizan pruebas moleculares como Reacción de Cadena de la Polimerasa (Ruiz, y otros, 2018).

Para el aislamiento de *Salmonella* a partir de alimentos, heces y otros, se necesita medios de enriquecimiento, selectivos y diferenciales, debido a que los alimentos tienen flora acompañante.

#### **Medios de cultivo:**

Para el aislamiento de *Salmonella*, por método microbiológico convencional en nuestro medio se utiliza la Norma Boliviana NB/ISO 6579: 2008, que utiliza medios de cultivo basales, enriquecidos, selectivos y diferenciales. El proceso de aislamiento e identificación tiene 4 etapas fundamentales en alimentos:

- Preenriquecimiento: es el paso en donde el microorganismo se recupera en medio de agua peptonada tamponada para alimentos ácidos (Norma boliviana NB/ISO

6579, 2008), esta etapa tienen la función de normalizar metabólicamente las células de *Salmonella* spp. que se encuentra en una matriz para su desarrollo (Gonzales, Pereira, Soto, Hernández, & Villarreal, 2014), logrando de esta manera una condición fisiológica estable.

- Enriquecimiento selectivo: los medios de cultivo que utilizan son caldo Muller-Kauffmann tetracionato novobiosina (MKTTn) y medio de Rappaport-Vassiliadis con soya (RVS) (Norma boliviana NB/ISO 6579, 2008). Éstos medios incrementan las poblaciones de *Salmonella* e inhiben otros microorganismos presentes en la muestra.
- Siembra en medios selectivos sólidos: se utiliza el agar Xilosa Lisina Desoxicolato (Agar XLD) y otro medio selectivo complementario al XLD y que sea especialmente adecuado para el aislamiento de cepas de *Salmonella* de lactosa positiva; *Salmonella* Typhi y *Salmonella* Paratyphi. Según la NB/ISO 6579: 2008, menciona: “La elección del segundo medio se deja al criterio del laboratorio de análisis. Es conveniente seguir de manera precisa las instrucciones del fabricante en referente a su preparación” (p.4). Se deben utilizar medios selectivos, que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a *Salmonella* y que permitan el reconocimiento visual característico de colonias sospechosas.
- Confirmación de las colonias sospechosas: se subcultivan y se confirma mediante pruebas bioquímicas y serológicas (Tabla 7). Ésta fase permite la identificación genérica de los cultivos de *Salmonella* y la eliminación de cultivos sospechosos falsos.

**Tabla 7**

*Pruebas bioquímicas para Salmonella spp.*

<b>Pruebas Bioquímicas</b>	<b>Salmonella spp.</b>
Agar triple azúcar (TSI) glucosa	Glucosa + ácido
Agar triple azúcar (TSI) lactosa	Lactosa – básico
Agar triple azúcar (TSI) Producción de sulfuro de hidrógeno	Positivo
Hidrolisis de la Urea	Negativo
Descarboxilación de la lisina	Positivo
Reacción de la beta galactosidasa	Positivo
Reacción de Voges Proskauer	Negativo
Producción de Indol	Negativo

Fuente: Elaboración propia tomada de NB/ISO 6579:2008 y Procop, 2017

### **3.4 Método de ensayo microbiológico**

#### **3.4.1 Selección de métodos**

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), (2005) define que “El análisis microbiológico tiene como fin proporcionar información confiable acerca de la inocuidad y calidad sanitaria de los alimentos” (p.11). Es por ello que es indispensable la elección de un método de ensayo adecuado.

Según la norma ISO/IEC 17025:2005 requisito 5.4.2, menciona “El laboratorio debe utilizar los métodos de ensayo o de calibración que satisfagan las necesidades del cliente y que sean apropiados para los ensayos o las calibraciones que realiza” (p. 13).

El laboratorio debe aplicar métodos y procedimientos apropiados para todos los ensayos dentro de su alcance (incluye muestreo, manipulación, transporte, almacenamiento, preparación de las muestras a ensayar, estimación de la incertidumbre y empleo de técnicas estadísticas para el análisis de datos de los ensayos).

Según la Norma ISO 17025:2017 requisito 7.2.1.1 afirma que “El laboratorio debe usar métodos y procedimientos apropiados para todas las actividades de laboratorio y, cuando sea apropiado, para la evaluación de la incertidumbre de medición, así como también las técnicas estadísticas para el análisis de datos” (p.12).

### **3.5 Validación de métodos microbiológicos cualitativos**

La Norma ISO 9000:2005 requisito 3.8.5, define validación como la “confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista” (p.18). Evidencia objetiva se define como los datos que respaldan la existencia o veracidad de algo.

El objetivo de la validación de procedimientos de una técnica analítica, es garantizar que los métodos cumplen determinados criterios, en términos de precisión, exactitud y otros. El proceso de validación es variable en función de diferentes criterios, como si se trata de un método normalizado o no y el tipo de método según sea un método cualitativo o cuantitativo. (Camaró, et al., 2015)

#### **3.5.1 Tipos de validación**

Camaró, et al., (2015) menciona “En función del método que se emplee los requisitos de validación varían. Así, se definen la validación primaria y la secundaria o verificación” (p. e32). Para los métodos normalizados, tales como los publicados por, ejemplo, ISO, no es necesario validar el método utilizado por el laboratorio (Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores, 2016). Sin embargo, el laboratorio necesita verificar el desempeño del método como se detalla en la norma ISO/IEC 17025:2017 requisito 7.2.1.5 describe que “El laboratorio debe verificar que puede llevar a cabo

apropiadamente los métodos antes de utilizarlos, asegurando que se pueda lograr el desempeño requerido” (p. 12). La Norma ISO 9000:2005 requisito 3.8.4. define verificación, como la confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos especificados.

#### **3.5.1.1 Validación primaria**

La validación primaria o completa se refiere al establecimiento de las especificaciones para el desempeño de un método nuevo y/o una verificación experimental que un método teóricamente cumple con criterios de calidad deseados.

#### **3.5.1.2 Validación secundaria o verificación**

Validación secundaria o verificación se utiliza, para indicar el proceso que lleva a cabo el laboratorio con el fin de demostrar su capacidad para ejecutar correctamente un método normalizado cuando lo realiza exactamente como está descrito en la norma (Organismo Argentino de Acreditación (OAA), 2013).

La Norma ISO 1640 (2003) describe que un método normalizado ha sido exhaustivamente estudiado y describe de forma clara y exacta las condiciones de realización del ensayo. Sus características de funcionamiento deben ser acordes con el uso previsto. Estos métodos normalizados son considerados métodos de referencia ya que pueden ser utilizados para evaluar otros métodos desarrollados para la misma determinación (citado en Entidad Nacional de Acreditación ENAC NT 32, 2010)

La validación secundaria, tienen la función de reunir las evidencias de que el laboratorio está capacitado para cumplir las especificaciones establecidas en la validación primaria. Algunos organismos lo denominan verificación y es la confirmación, mediante



el aporte de pruebas objetivas, de que se cumplen los requisitos establecidos en las condiciones de uso de ese laboratorio. (Camaró, y otros, 2015)

### **3.5.2 Parámetros de desempeño de validación**

La Norma ISO 17025 (2017) en su requisito 7.2.2.3, describe que “Las características de desempeño de los métodos validados tal como fueron evaluadas para su uso previsto, deben ser pertinentes para las necesidades del cliente y deben ser coherentes con los requisitos especificados” (p.13).

#### **3.5.2.1 Verificación, método cualitativo**

El OAA (2013) en su requisito 6.2.2.1 describe el alcance de la Validación/verificación en métodos normalizados, donde el laboratorio debe confirmar que puede aplicarlo correctamente previo a su uso en ensayos, mediante la comprobación del cumplimiento de los parámetros estadísticos que figuran en el método normalizado (siempre y cuando se indiquen en la norma). Los parámetros de desempeño a determinar son: Limite de detección, verificación de la sensibilidad y especificidad.

IBMETRO DTA-CRI-016 V2 (2012) en su apartado 9.1.1. describe que “Cuando el laboratorio utiliza métodos cualitativos debe, más que en cualquier otro caso, tratar de utilizar métodos normalizados, ya que la disponibilidad de muestras del analito de concentración conocida es escasa” (p. 8).

##### **3.5.2.1.1 Límite de detección**

Aplicado a ensayos microbiológicos cualitativos, es el número mínimo de microorganismos que pueden ser detectados, pero en cantidades que no pueden estimarse con precisión (Organismo Argentino de Acreditacion [OAA], 2013).

#### **3.5.2.1.2 Inclusividad**

La inclusividad es la capacidad del método para detectar el analito diana entre un amplio grupo de cepas. El objetivo del estudio es verificar que todas las cepas son detectadas por el método. ( International Organization for Standardization ISO 16140, 2003)

#### **3.5.2.1.3 Exclusividad**

Exclusividad es la falta de interferencia, en un método alternativo, a partir de un rango amplio de cepas no-diana, ISO 16140 (2003).

#### **3.5.2.1.4 Sensibilidad analítica**

La sensibilidad analítica es el límite inferior de detección (LOD) de un analito en una prueba. En las pruebas de detección directa, esto se puede expresar como el número de copias del genoma, la dosis infecciosa, las unidades formadoras de colonias, las unidades formadoras de placas, etc. del agente que se pueden detectar y distinguir del resultado de una matriz sin el analito. Por lo general, esto se expresa como un número de copias, unidades de fijación del complemento o unidades formadoras de placa que dan al menos un 50% de resultados positivos entre las réplicas de una muestra de un volumen o peso determinado. En las pruebas de detección indirecta, es la menor cantidad de anticuerpos detectados, por lo general, la penúltima dilución de la muestra en la que el analito no es diferenciable de la actividad en una muestra de matriz control (Organizacion mundial de la Salud animal , 2012)

Según la ISO 13843 (2000), sensibilidad es la fracción del número total de cultivos o colonias positivos que son asignados correctamente con el método utilizado, citado en

(Instituto Boliviano de Metrología (IBMETRO) Dirección Técnica de Acreditación  
DTA-CRI-017 V2, 2012)

#### **3.5.2.1.5 Especificidad analítica**

Según la ISO 13843 (2000), especificidad es la fracción del número total de cultivos o colonias negativos que son asignados correctamente con el método utilizado, citado en FAO, 2005.

ANOR 1994 describe especificidad como “El grado en que un método analítico es adecuado exclusivamente para determinar la cantidad de analito bajo examen. Garantizando que la respuesta sólo se deriva de la analito” citado en IBMETRO DTA-CRI-016 V2 (2012).

## 4 JUSTIFICACION

*Campylobacter* y *Salmonella* son microorganismos patógenos que pueden encontrarse en carne de pollo y producir infección gastrointestinal en el ser humano, constituyéndose en un problema de Salud Pública. Además, los microorganismos mencionados son consideradas como enfermedades zoonóticas.

Los productos alimenticios provenientes de aves de corral han sido identificados como la vía de transmisión más importante de salmonelosis en humanos (Kimura *et al.*, 2004). La contaminación por *Salmonella* spp. de la carne de pollo puede ocurrir durante toda la cadena de producción. La transmisión puede ser de tipo vertical por parte de los reproductores al huevo y horizontal en la incubadora, granja, transporte y faenamiento, lo cual conlleva al aislamiento de una mayor variedad de serotipos (Heyndrickx *et al.*, 2002).

Podemos evidenciar un problema en nuestro país, la falta de trabajos de investigación respecto a éstos microorganismos, además cabe resaltar que en la Ciudad de La Paz ningún laboratorio de análisis microbiológico realiza el diagnóstico de *Campylobacter* spp. de rutina, esta carencia, conlleva manejo de datos epidemiológico no adecuados en el departamento de La Paz e incluso en el país. Esto conlleva a no tomar medidas preventivas por parte de las autoridades de vigilancia y control de alimentos tanto departamentales como nacionales, para evitar las contaminaciones de los alimentos.

El propósito del presente estudio es dar a conocer la presencia de *Salmonella* y *Campylobacter* en carne de pollo crudo y evaluar su dependencia de los factores: macrodistrito, tipo de mercado, tipo de expendio y procedencia avícola

En ésta investigación como metodología se utilizó el método convencional de aislamiento de los microorganismos por cultivo, se aplicó las normas verificadas 17025:2017 para el aislamiento de *Campylobacter* y la norma NB/ISO 6579:2008 para *Salmonella*.

Los resultados obtenidos, otorgan datos actualizados sobre estas bacterias en puntos de expendio de la ciudad de La Paz, permitiendo utilizar éstos datos para estudios epidemiológicos posteriores.

## **5 PREGUNTA DE INVESTIGACION**

¿Los valores de la evaluación de la presencia de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Salmonella* spp. en la carne cruda de pollo, de expendio en diferentes puntos de venta de la ciudad de La Paz serán dependientes por macrodistrito, tipo mercado, modo de expendio y procedencia avícola?

## 6 OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Evaluar la presencia de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Salmonella* spp. en carne cruda de pollo de expendio en la ciudad de la Paz.

### 6.2 Objetivos específicos

- Verificar los indicadores de desempeño del método analítico ISO 10272-1: 2017– Método horizontal para la detección de *Campylobacter* spp. y NB/ISO 6579: 2008. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. en carne cruda de pollo.
- Detectar la presencia de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Salmonella* spp. en carne cruda de pollo de expendio en la ciudad de La Paz.
- Determinar la frecuencia *Campylobacter* spp y *Salmonella* spp en carne cruda de pollo por macrodistrito, tipo de mercado, modo de expendio y procedencia avícola de carne cruda de pollo de expendio en la ciudad de La Paz.

## 7 PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS

Ho: La evaluación de la presencia de *Campylobacter* y/o *Salmonella* en carne cruda de pollo distribuidos en puntos de venta de la ciudad de La Paz, son independientes de macrodistrito, tipo de mercado, modo de expendio y procedencia avícola.

Ha: La evaluación de la presencia de *Campylobacter* y/o *Salmonella* en pollo, distribuidos en puntos de venta de la ciudad de La Paz, son dependientes de macrodistrito, tipo de mercado, modo de expendio y procedencia avícola.

## **8 DISEÑO METODOLOGICO**

### **8.1 Tipo de investigación**

#### **Observacional descriptiva**

Descriptiva porque busca desarrollar una fiel representación (descripción) del fenómeno estudiado: los estudios descriptivos miden o evalúan diversos aspectos, dimensiones o componentes del fenómeno a estudiar. (Hernández, Collado & Baptista, 1998). Además, basados por un periodo de tiempo, habitualmente corto y sin incluir grupos control (Manterola & Otzen, 2014)

Según los datos utilizados es cualitativa, por los resultados de presencia/ausencia en carne cruda de pollo de los microorganismos de *Campylobacter* y *Salmonella*.

### **8.2 Diseño de investigación**

Para la verificación de indicadores de desempeño de los métodos analíticos en estudio es experimental (Tabla 8), se trabajó con condiciones controladas e inoculaciones, con valores determinados de cepas de bacterias: ATCC, *Salmonellas* spp. nativas, *Campylobacter* spp. nativas e interferentes.

**Tabla 8**

*Diseño de investigación para la verificación de los métodos analíticos de la Norma ISO: 10272: 2017 y NB/ISO 6579:2008*

Indicadores de Verificación del método	Muestra	N ° Mediciones	
		<i>Campylobacter</i>	<i>Salmonella</i>
Límite de detección (LD)	Matriz: carne de pollo	30 muestras contaminadas con 3UFC <i>Campylobacter jejuni</i> en 25g de muestra	30 muestras contaminadas con 3UFC de <i>Salmonella</i> Typhimurium en 25g de muestra
Inclusividad	Sin matriz	30 muestras: 27 Cepas nativas y 3 cepas ATCC de <i>Campylobacter jejuni</i>	30 muestras: 28 Cepas nativas y 2 cepas ATCC de <i>Salmonella</i> Typhimurium
Exclusividad	Sin matriz	30 muestras Cepas ATCC y Cepas nativas de Interferentes	30 muestras Cepas ATCC y Cepas nativas de Interferentes
Sensibilidad	Matriz: carne de pollo	30 muestras: Resultados de LD muestras designados como positivas	30 Muestras: Resultados de LD muestras designados como positivas
Especificidad	Matriz: carne de pollo	12 muestras designadas como negativas sin contaminación de los analitos en estudio	12 muestras designadas como negativas sin contaminación de los analitos en estudio

Fuente: elaboración propia



Para la detección de *C. jejuni*, *C. coli* y *Salmonella* spp. en carne cruda de pollo que se expenden en la ciudad de La Paz, el trabajo de investigación es no experimental (Tabla 9).

**Tabla 9**

*Diseño de la evaluación de la presencia de C. jejuni, C. coli y Salmonella spp., en carne cruda de pollo*

<b>Muestra</b>	<b>Factor de Estudio</b>		<b>Variables de Respuesta</b>
Matriz : Carne cruda de pollo que se expende en la Ciudad de La Paz	Macro distrito	1. Cotahuma 2. Max Paredes 3. Periferia 4. San Antonio 5. Zona Sur 7. Zona Central	Presencia de: <i>Salmonella</i> spp. <i>Campylobacter jejuni</i> <i>Campylobacter coli</i>
	Tipo de venta al momento de la compra	Refrigerado No refrigerado	
	Tipo de mercado	Mercado Popular Supermercado	
	Procedencia avícola	Industrias avícolas Cooperativas avícolas Proveedores Individuales	

Fuente: Elaboración propia

## **9 MÉTODO**

### **9.1 Sitio o contexto del estudio**

#### **9.1.1 Ubicación**

El trabajo se realizó en 6 macrodistritos de la ciudad de La Paz- Bolivia, que pertenece a la provincia Pedro Domingo Murillo del departamento de La Paz, sede de Gobierno Central se halla ubicada en la posición geográfica de Sur 16° 30' 00.0" (latitud) y Oeste 68° 08' 24.0" (longitud). (Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología, SENAMHI). El clima de la ciudad es de montaña con condiciones extremas durante todo el año. La temperatura promedio anual de temperatura es de 14°C y tiene una precipitación fluvial promedio de 512 mm.

La ciudad de La Paz se encuentra dividida en nueve Macrodistritos dos rurales y siete urbanos. El muestreo de carne cruda de pollo se realizó en seis macrodistritos urbanos: Centro, Cotahuma, Max Paredes, Periférica, San Antonio y Zona Sur. Se excluyó macrodistrito Mallasa por no contar con mercado registrado en el municipio de La Paz.

#### **9.1.2 Descripción del ámbito de estudio.**

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos (LMA) del Instituto de Servicio de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud (SELADIS) de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA) ubicada en la ciudad de La Paz, avenida Saavedra N° 2224, Miraflores, frente al Hospital de Clínicas.

### **9.1.3 Descripción del ambiente de estudio**

El procesamiento de las muestras y la verificación de los protocolos normalizados ISO 10272-1:2017 y NB/ISO 6579:2008, se realizó en el laboratorio de Microbiología de Alimentos (LMA), ubicado en el cuarto piso del Instituto SELADIS, que cuenta con personal profesional calificado.

### **9.2 Definición de la muestra**

Para la verificación de las Normas: ISO 10272-1:2017 y NB ISO 6579:2008, la definición de la muestra se la realizó de forma no probabilística y por conveniencia con criterios de inclusión definidos

#### **Criterios de inclusión**

- Matriz: Pollo crudo no congelado de empresas con certificación ISO 22000
- Cepas de bacterias ATCC y cepas nativas del laboratorio de Microbiología de Alimentos

Para la evaluación de la presencia de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Salmonella* spp. en muestras de carne cruda de pollo expendidos en la ciudad de La Paz, la definición de la muestra se la realizó de forma no probabilística y por conveniencia aplicando criterios de inclusión y exclusión definidos.

#### **Criterios de inclusión**

- Ingresan al trabajo de investigación solo mercados y supermercados que están registrados en el municipio de la ciudad de La Paz

- Se tomaron muestras de carne cruda de pollo en lugares de expendio con licencia de funcionamiento, certificado por el Gobierno Autónomo Municipal de la ciudad de La Paz.

#### **Criterio de exclusión**

- No ingresan al estudio carne de pollo congelado

### **9.3 Tamaño de muestra**

El tamaño de muestra para la verificación de métodos analíticos de *C. jejuni*, *C. coli* y *Salmonella* spp. fueron:

- 30 muestras de carne cruda de pollo libre de *Salmonella* spp.
- 30 muestras de carne cruda de pollo libre de *Campylobacter* spp.
- 28 cepas de *Salmonella* spp. nativas del laboratorio de Microbiología de Alimentos SELADIS
- 27 cepas de *Campylobacter* spp. nativas del laboratorio de Microbiología de Alimentos SELADIS
- 7 Cepas ATCC de: *Campylobacter jejuni* (33291), *Campylobacter coli* (33559), *Salmonella* Typhimurium (13311), *Escherichia coli* (10536), *Staphylococcus aureus* (25923), *Enterobacter aerogenes* (13048) y *Proteus mirabilis* (12453)

El tamaño de muestra para la determinación y evaluación de *C. jejuni*, *C. coli* y *Salmonella* spp. en carne cruda de pollo, de expendio de la ciudad de La Paz, son 108 muestras, 18 muestras por cada macrodistrito de tal manera que todos estén debidamente representados como se describe en la Tabla 10.

**Tabla 10**

*Distribución del número de muestras de carne de pollo por macrodistrito de la ciudad de La Paz*

Macrodistrito	Mercados populares y supermercado Seleccionados	Modo de expendio de carne de pollo		Sub total de muestras
		Refrigerado	No refrigerado	
1 Cotahuma	Félix Hinojosa (Av, Buenos aires)	3	3	6
	Sopocachi (c/ Guachalla) *Ketal	3	3	6
	Rodríguez (c/Rodríguez)	3	3	6
2 Max Paredes	Uruguay	3	3	6
	El Tejar	3	3	6
	Villa Victoria (Virrey Toledo)	3	3	6
3 Periferia	Villa Fátima (Av/Las Américas)	3	3	6
	Bolívar Central (Av. Sucre)	3	3	6
	Maracaná (Av. Periférica)	3	3	6
4 San Antonio	San Antonio (c/Josefa Mujica)	3	3	6
	San Isidro (Av. San Isidro)	3	3	6
	10 de enero (Av. Circunvalación)	3	3	6
5 Zona Sur	Achumani (c/16)	3	3	6
	14 de septiembre (obrajes c/17) *Hipermaxi	3	3	6
	24 de septiembre (c/18, 25) *Ketal	3	3	6
7 Zona Central	Lanza Central (Av. Evaristo Valle)	3	3	6
	Miraflores (c/ Díaz Romero) *Hipermaxi *Fidalga, *Ketal	3	3	6
	Yungas	3	3	6
Total		54	54	<b>108</b>

Nota: \*Supermercado. Fuente: Elaboración propia

## 9.4 Factores de estudio y variables de respuesta

### 9.4.1 Verificación de método analítico

Factor de estudio:

- Verificación NORMA ISO 10272-1:2017
- Verificación NORMA NB/ISO 6579:2008

Variables de respuesta:

- Límite de detección
- Inclusividad
- Exclusividad
- Sensibilidad
- Especificidad
- Características fenotípicas de la bacteria

#### **9.4.2 Evaluación de la presencia de *C. jejuni*, *C. coli* y *Salmonella* spp. en carne cruda de pollo de expendio en la ciudad de La Paz**

**Factor de estudio:**

- Macrodistrictos de la ciudad de La Paz: Cotahuma, Max Paredes, Periferia, San Antonio, Zona Central y Zona Sur.
- Tipo de mercado: Mercado popular y Supermercado
- Modo de expendio: carne cruda de pollo refrigerado y no refrigerado al momento de la toma muestra de pollo.
- Procedencia avícola de carne cruda de pollo: Industrias de beneficiado, Cooperativas de Beneficiado y productores individuales.

**Variables de respuesta:**

- Presencia/ausencia de *Salmonella* spp. en 25 g de carne de pollo
- Presencia/ausencia de *C. jejuni* y *C. coli* en 25g de carne de Pollo.

## **9.5 Materiales**

### **9.5.1 Equipos**

Los equipos del LMA - SELADIS, cuentan con certificados de calibración vigentes, provisto por el Laboratorios de Calibración del Instituto Boliviano de Metrología (IBMETRO).

### **9.5.2 Reactivos y materiales**

Se utilizaron reactivos y materiales según Norma: ISO: 10272-1:2017 para el aislamiento de *Campylobacter* spp.; NB/ISO: 6579-2008 para el aislamiento de *Salmonella* spp. y NB:310013 para determinar los requisitos microbiológicos de la carne de pollo cruda.

## **9.6 Procedimiento**

El trabajo de investigación se realizó en dos fases: 1.- Verificación de métodos normalizados y 2.- Evaluación de la presencia de *C. jejuni*, *C. coli* y *Salmonella* spp. en carne cruda de pollo.

### **9.6.1 Verificación de métodos analíticos de ISO 10272-1:2017 y NB/ISO 6579:2008**

Antes de iniciar el trabajo de investigación se realizó la verificación del LMA del Instituto de SELADIS el cual cumple con los requisitos para una verificación.

Por lo mencionado el laboratorio cuenta con:

- Equipos y trazabilidad metrológica. Los equipos están calibrados y con certificados de calibración vigentes, provistos por el Laboratorio de Calibración

del Instituto Boliviano de Metrología (IBMETRO), control de temperaturas de las estufas de cultivo y refrigeradores (Procedimiento de control de equipos).

- Control microbiológico de ambiente, pruebas que se realiza con placa expuesta de agar PCA, Mac ConKey y XLD por 15 minutos.

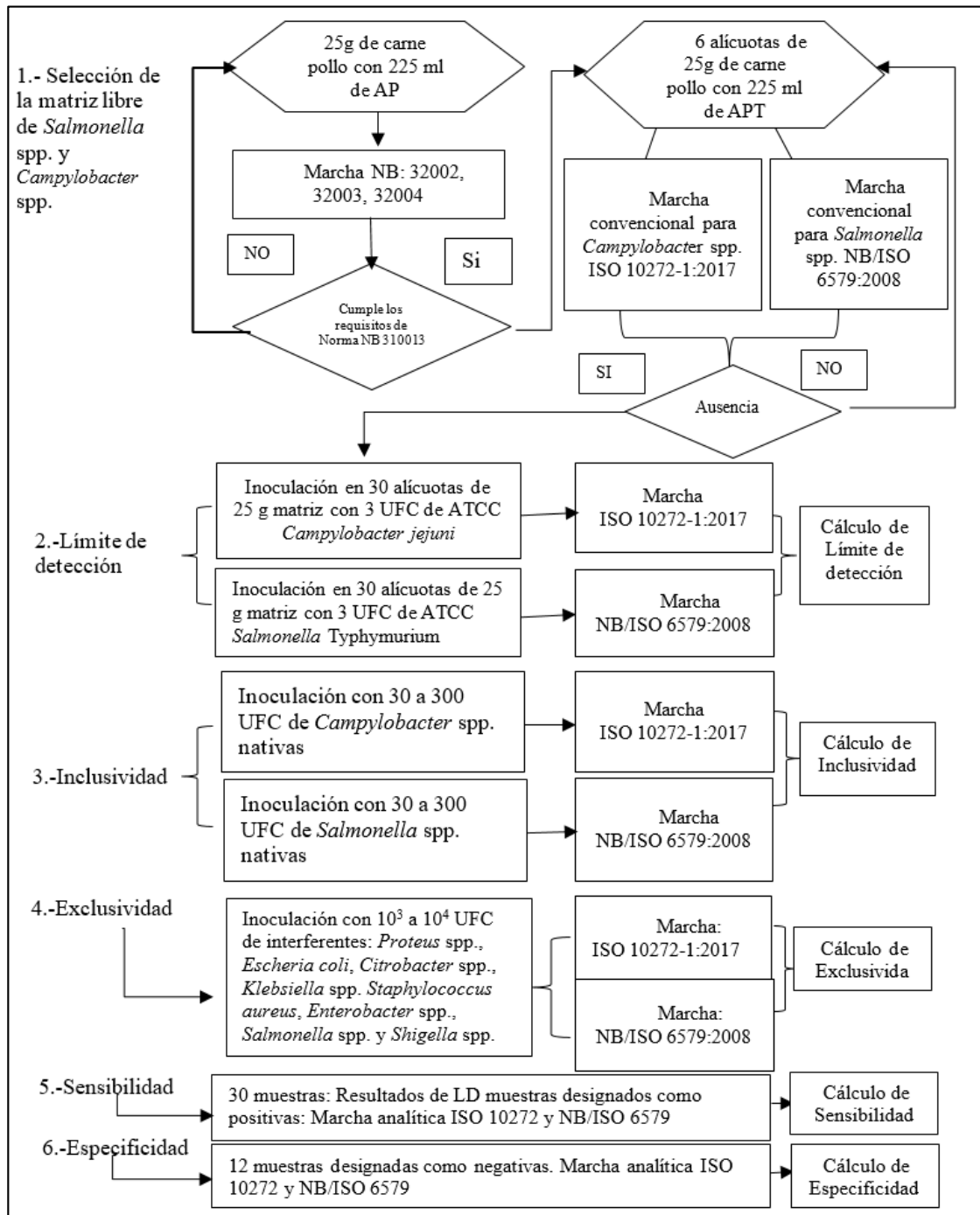
La adquisición y preparado de medios de cultivo y reactivo se realizó de acuerdo a las normas de: ISO: 10272-1: 2017 y norma NB/ISO 6579:2008.

Las cepas ATCC *C. jejuni*, *C. coli*, *Salmonella* Typhymurium e interferentes se hizo la adquisición con su certificación correspondiente y el manejo de las cepas se realizó en base al Instructivo de trabajo “manejo de cepas ATCC” del LMA del Instituto SELADIS. Las cepas nativas de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e interferentes, se obtuvieron de diferentes matrices: Carne de res, carne de cerdo, carne de pollo, carne molida de res, queso fresco, lechuga.



**Figura 2**

Flujograma de la verificación de los métodos analíticos ISO 10272-1 y ISO/NB 6579



### **9.6.1.1 Verificación del método analítico ISO 10272-1:2017**

- **Selección de la matriz libre de *Campylobacter* spp.**

Se realizó el muestreo de carne cruda de pollo de industrias avícolas con certificación ISO 22000: Sistemas de Gestión de Inocuidad Alimentaria, que tiene como objetivo principal garantizar la seguridad alimentaria durante las distintas fases de la cadena de suministro de los productos, el proceso abarca desde el lugar de producción hasta que el alimento llega a la mesa del consumidor (Norma ISO 22000 Sistemas de Gestión de Inocuidad Alimentaria , 2015).

Se realizó el muestreo de diferentes mercados de la ciudad de La Paz, tomando como requisito de muestreo: carne de cruda de pollo entero, embolsado y no congelado.

- **Verificación de ausencia de *Campylobacter* spp. en carne cruda de pollo**

Una vez que la carne de pollo ingresa dentro de los requisitos NB 310013, se desarrolla la verificación de la ausencia de *Campylobacter* spp. en 6 Repeticiones de acuerdo al siguiente proceso:

La Matriz, carne cruda de pollo entero, con un bisturí estéril se hacen cortes en rebanadas, para asegurar que se tomó muestras de todas las partes del pollo, tanto superficiales (piel) e internas (músculo) un total de 900 g, ésta cantidad de muestra se mezcló en forma homogénea. Se hace un pool y se fraccionó 6 alícuotas de 25 g para realizar la determinación de *Campylobacter* spp. aplicando la norma técnica ISO 10127-1:2017. Una vez que se demostró que la las muestras dieron resultado de ausencia para *Campylobacter* spp., el resto de muestra de carne de pollo

homogéneo se dividió en 30 muestras cada una de 25 g, que son 750 g en total, matriz que se utilizó para la fortificación y determinación del Límite de detección (LD).

#### **9.6.1.1.1 Verificación de Limite detección**

##### **Preparación de fase estacionaria de *C. jejuni***

La preparación de la fase estacionaria se realizó en caldo cerebro corazón (BHI) con sangre equina al 5% se incubó en microaerofilia a 42 °C por 24 h. Una vez que está en fase estacionaria de *C. jejuni*, se realizó diluciones seriadas 1/10 en Agua peptonada (AP) hasta 10<sup>-6</sup>, se sembraron por el método de inundación las diluciones 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-6</sup> por duplicado en agar mCCDA, se incubó en microaerofilia a 42 °C durante 48 h.

Una vez que se tiene los resultados, colonias de *C. jejuni*, se realizó el cálculo de la dilución para 3 UFC/mL, para la fortificación de la matriz.

##### **Fortificación de la matriz.**

Se preparó nueva fase estacionaria en caldo BHI con sangre de equino al 5%, del mismo lote evaluado en la etapa anterior, la dilución se preparó con valor conocido y cantidad necesaria para la fortificación, en el periodo de 20 minutos se realizó la fortificación con 3 UFC (para métodos que no poseen la declaración del valor del LD) a las 30 muestras de 25 g de carne de pollo en 225 mL de agua de peptona tamponada (APT), se procedió a la mezcla de la solución en un homogeneizador Stomacher<sup>R</sup> 400 (circulater *pbi international*) durante 30 s a 230 rpm. Las muestras se procesaron acorde al método analítico ISO 10272:2017.

### **Cálculo de Límite de Detección**

Considerando los resultados positivos, se determinó el porcentaje de recuperación, utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{n^{\circ} \text{ Pos} \times 100}{30}$$

#### **9.6.1.1.2 Determinación Inclusividad**

Como segunda etapa, de la verificación de un método normalizado, es la Inclusividad. Para esta etapa no se necesita una matriz, como analitos se utilizó cepas nativas de *Campylobacter* spp., aisladas con la norma técnica ISO 10272-1:2017, cepas obtenidas de diferentes matrices: carne de pollo entero, corte especial de pollo (pechuga y entrepierna), carne molida de pollo y menudencias de pollo, cepas conservadas en crioviales, en medio agar Columbia a -20° bien identificados. Además, de utilizar *C. jejuni* y *C. coli*. En total se trabajó con 30 cepas.

#### **Preparación de fase estacionaria de cepas de *Campylobacter*.**

Para la preparación de la fase estacionaria se trabajó con las cepas nativas de *Campylobacter* spp, *C. jejuni* y *C. coli*. Se inocularon las cepas en caldo BHI con sangre equina al 5%, se cultivó en microaerofilia a 41,5 °C por el periodo de 24 h, una vez en fase estacionaria las cepas de *Campylobacter*, se realizó diluciones seriadas 1/10 en Agua peptonada (AP) hasta 10<sup>-6</sup>, de las diluciones 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-6</sup> se sembró por el método de inundación por duplicado en agar mCCD, se incubó en microaerofilia a 41,5 °C por 48 h.

Una vez que se tiene los resultados, colonias de *Campylobacter* spp., se realizó el cálculo de las diluciones y tener el número real inoculado en cada caso, de 10 a 100 UFC/mL veces el LD.

### **Procedimiento para la inoculación**

Se realizó el cálculo de las diluciones de cada analito, la concentración para la inoculación fue de 30 a 300 UFC/mL. Una vez que se conoce las concentraciones de células de cada cepa nativa de *Campylobacter* spp., se preparó nuevamente la fase estacionaria de las cepas con valor conocido. Se inoculó los volúmenes y diluciones para cada analito, en el medio de enriquecimiento selectivo, Preston, luego se continuo con la ruta analítica de la Norma ISO:10272-1 2017.

### **Interpretación de resultados**

Los resultados se registran como presencia y ausencia tomado en cuenta características morfológicas de las colonias.

#### **9.6.1.1.3 Determinación de Exclusividad**

Como tercera etapa del procedimiento de la verificación de un método normalizado, es la determinación de la exclusividad. Para esta etapa no se utilizó matriz, pero, se trabajó con interferentes bacterianos que normalmente están presentes en la matriz de carne cruda de pollo. Se utilizaron 30 cepas puras: cepas de laboratorio de microbiología de Alimentos SELADIS, cepas ATCC y cepas que se aislaron e identificaron al inicio del trabajo de investigación, en total 30 cepas.

#### **Preparación de la fase estacionaria**

Para esta fase se trabajó con los siguientes interferentes: Cepas ATCC de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae* *Salmonella* Typhimurium y *Proteus mirabilis*; cepas nativas de *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*, se inoculó las cepas en caldo BHI, e incubó a 35,5 °C por 24 h. Una

vez, en fase estacionaria las cepas, se realizó diluciones seriadas 1/10 en AP hasta  $10^{-9}$ , se realizó el sembrado por el método de placa vertida, de las diluciones  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$ , por duplicado en agar PCA, se cultivó a  $35,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h.

Una vez que se tiene los resultados del número de colonias de los interferentes en las diluciones  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$ , se realizó el cálculo de las diluciones y tener el número real inoculado en cada cepa, de  $10^3$  a  $10^4$  UFC/mL.

### **Procedimiento para la fortificación**

Se realizó el cálculo de las diluciones de cada analito, la concentración para la inoculación fue de  $10^3$  a  $10^4$  UFC/mL. Una vez que se conoce las concentraciones de células de cada cepa interferente, se preparó nuevamente la fase estacionaria de las cepas con valor conocido. Se inoculo los volúmenes y diluciones para cada analito, en el medio de enriquecimiento selectivo, Preston, luego se continuo con la ruta analítica de la Norma ISO:10272-1 2017.

### **Interpretación de resultados**

Los resultados se registran tanto los aspectos cualitativos como cuantitativos (inhibición parcial o total) de los interferentes evaluados.

#### **9.6.1.1.4 Características fenotípicas de *C. jejuni* y *C. coli***

Se realizó una descripción de sus características fenotípicas: desarrollo en medio mCCDA en microerofilia a  $41,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  por  $44 \pm 4$  h; desarrollo en agar sangre en microerofilia a  $41,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; motilidad; morfología; desarrollo en agar sangre a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  aerobio; actividad de Oxidasa; actividad de Catalasa; hidrolisis de Indoxil Acetato; hidrolisis de Hipurato.

### **9.6.1.2 Verificación del método NB/ISO 6579:2008**

- **Selección de la matriz libre de *Salmonella* spp.**

Se realizó el muestreo carne cruda de pollo de industrias avícolas con certificación ISO 22000: Sistemas de Gestión de Inocuidad Alimentaria. Las muestras seleccionadas, son: Carne cruda de pollo entero, refrigerado, embolsado y no congelado.

- **Verificación de ausencia de *Salmonella* spp. en la matriz, carne cruda de pollo**

Seleccionada la carne de pollo que ingresa dentro de los requisitos NB 310013, se desarrolla la verificación de la ausencia de *Salmonella* spp. en 6 Repeticiones de acuerdo al siguiente proceso:

Con un bisturí estéril se realizaron cortes en rebanadas del pollo crudo entero, para asegurará que se tomó muestras de todas las partes del pollo, tanto superficiales (piel) e internas (músculo), un total de 900 g. Esta cantidad de muestra debe ser mezclada en forma homogénea. Se realizó un pool fraccionando 6 alícuotas de 25 g, se realizó la determinación de *Salmonella* spp. aplicando la norma técnica NB 32007. Una vez que se demostró que las muestras dieron resultado de ausencia para *Salmonella* spp., el resto de muestra de carne de pollo homogéneo se dividió en 30 muestras, que son 750 g, matriz que se utilizó para la fortificación y determinación del LD.

#### **9.6.1.2.1 Determinación de Limite detección**

##### **Preparación de fase estacionaria de *Salmonella* Typhimurium**

La preparación de la fase estacionaria, se realizó en caldo BHI se mezcló una colonia *Salmonella* Typhimurium, se incubó a 35,5 °C por 24 h, una vez que está en fase

estacionaria, se realizó diluciones seriadas 1/10 en AP hasta 10<sup>-9</sup>, se sembraron por el método de Placa vertida, de las diluciones 10<sup>-8</sup> y 10<sup>-9</sup> por duplicado en agar de recuento PCA, se incubó a 35,5 °C por 48 h.

Una vez que se tiene el recuento de colonias de *Salmonella* Typhimurium, se realizó el cálculo de la dilución para 3 UFC/mL

- **Fortificación de la matriz.**

Se preparó nueva fase estacionaria en caldo BHI del mismo lote evaluado en la etapa anterior, se realizó la dilución con valor conocido y se preparó la cantidad necesaria para la fortificación. En el periodo de 20 minutos se realizó la fortificación con 3 UFC a las 30 muestras, de 25g de carne cruda de pollo que están en 225 mL de APT, se procedió a la mezcla de la solución en un homogeneizador Stomacher<sup>R</sup> 400 (circulater *pbi international*) durante 30s a 230 rpm. Las 30 muestras se procesaron el mismo día con las mismas condiciones, con el método analítico NB/ISO 6579:2008.

### **Cálculo de Límite de Detección**

Considerando los resultados positivos, se determinó el porcentaje de recuperación utilizando la siguiente ecuación

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{n^{\circ} \text{ Pos} \times 100}{30}$$

#### **9.6.1.2.2 Determinación Inclusividad**

Para esta etapa no se necesita una matriz, como analito se trabajó con cepas nativas de *Salmonella* spp. aisladas con la norma técnica NB/ISO 6579:2008, que se obtuvo al inicio de la investigación de matrices: carne de pollo entero, corte especial de pollo (pechuga y



entrepiera), carne molida de pollo, cepas conservadas en medio semisólido Soft a -20°, bien identificados. Además, de utilizar *Salmonella* Typhimurium, en total 30 cepas.

### **Preparación de fase estacionaria de *Salmonella***

Para la preparación de la fase estacionaria se trabajó con cepas nativas de *Salmonella* spp y *Salmonella* Typhimurium. Se inocularon las cepas en caldo BHI y se incubó a 35,5 °C por 24 h. Una vez que está en fase estacionaria las cepas de *Salmonella* spp., se realizó diluciones seriadas 1/10 en AP, hasta 10<sup>-9</sup>, se realizó el sembrado por el método de placa vertida, de las diluciones 10<sup>-8</sup> y 10<sup>-9</sup>, por duplicado en PCA, se incubó a 35,5 °C por 48 h.

Una vez que se tiene los resultados del número de colonias de *Salmonella* spp., se realizó el cálculo de las diluciones para contar con el número real, inoculado en cada caso, de 10 a 100 UFC/mL veces el LD.

### **Procedimiento para la inoculación**

Se realizó el cálculo de las diluciones de cada analito, la concentración para la inoculación fue de 30 a 300 UFC/ml. Una vez que se conoce las concentraciones de células de cada cepa nativa de *Salmonella* spp., se preparó nuevamente la fase estacionaria de las cepas con valor conocido. Se inoculó los volúmenes y diluciones para cada analito, en el medio de enriquecimiento selectivo, MKTTn y RPV, luego se continuo con la ruta analítica de la Norma NB/ISO:16579 2008.

### **Interpretación de resultados**

Los resultados se registran como presencia y ausencia, evaluando las características morfológicas de las cepas.

### **9.6.1.2.3 Determinación de Exclusividad**

Para esta etapa no se utilizó matriz, pero, se trabajó con interferentes bacterianos que normalmente están presentes en carne cruda de pollo. Se utilizaron 30 cepas puras: cepas de laboratorio de microbiología de Alimentos SELADIS, cepas ATCC y cepas que se aislaron e identificaron al inicio del trabajo de investigación.

#### **Preparación de la fase estacionaria**

Para esta fase se trabajó con los siguientes interferentes: Cepas ATCC de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae* y *Proteus mirabilis*; cepas nativas de *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli*, se inoculó las cepas en caldo BHI, e incubó a 35,5 °C por 24 h. Una vez, en fase estacionaria las cepas, se realizó diluciones seriadas 1/10 en AP hasta 10<sup>-9</sup>, se realizó el sembrado por el método de placa vertida, de las diluciones 10<sup>-8</sup> y 10<sup>-9</sup>, por duplicado en agar PCA, se incubó a 35,5°C por 24 h.

Una vez que se tiene los resultados del número de colonias de los interferentes, se realizó el cálculo de las diluciones y tener el número real inoculado en cada cepa, de 10<sup>3</sup> a 10<sup>4</sup> UFC/mL.

#### **Procedimiento para la inoculación**

Se realizó el cálculo de las diluciones de cada analito, la concentración para la inoculación fue de 10<sup>3</sup> a 10<sup>4</sup> UFC/mL. Se preparó nuevamente la fase estacionaria de las cepas con valor conocido. Se inoculo los volúmenes y diluciones para cada analito, en el medio de enriquecimiento selectivo, MKTTn y RPV, luego se continuo con la marcha analítica de la Norma NB/ISO:16579 2008.

## Interpretación de resultados

Los resultados se registran como presencia y ausencia

### 9.6.1.2.4 Sensibilidad y especificidad de los métodos ISO 10272:2017 y NB/ISO 6579:2008

Para la determinación de sensibilidad y especificidad se utilizó la tabla de contingencia 2X2.

**Tabla 11**

*Determinación de la Sensibilidad y Especificidad del método*

<b>Resultados del Ensayo a Validar</b>	<b>Resultado Asignado Positivo</b>	<b>Resultado Asignado Negativo</b>	<b>Total</b>
Positivos	PV	DP	PV + DP
Negativos	DN	NV	DN + NV
<b>Total</b>	PV + DN	DP + NV	N

Donde:

PV = Positivo Verdadero

DP = Desviación Positiva:

DN = Desviación Negativa:

NV = Negativos Verdaderos:

#### Cálculo de Sensibilidad y Especificidad

$$\text{Sensibilidad (\%)} = \frac{PV}{N+} \times 100$$

$$\text{Especificidad (\%)} = \frac{NV}{N-} \times 100$$

**Donde:**

N: total de muestras (PV+DP+DN+NV)

N-: número total de resultados negativos con el método a validar (NV+DP)

N+: número total de resultados positivos con el método a validar (DP+NV)

**Criterio de aceptación de los resultados:**

ISO 10272-1:2017

-Especificidad = 99%

-Sensibilidad = 64 - 92 %

NB/ISO 6579:2008

-Especificidad (Carne de ave) = 100 %

-Sensibilidad (Carne de ave) = 98% - 100%

**9.6.1.2.5 Características fenotípicas de *Salmonella* *Thyphimurium***

Se realizó una descripción de sus características fenotípicas: Características de las colonias en **XLD** y **BS**; morfología; presencia de ácido a partir de la glucosa en TSI, gas a partir de glucosa en TSI, ácido a partir de lactosa; producción de Sulfuro de Hidrógeno en TSI; descarboxilación de la Lisina; producción de Sulfuro de Hidrógeno en LIA; producción de gas en LIA; producción de Indol; producción de Sulfuro de Hidrógeno en SIM; movilidad; hidrólisis de Urea; utilización del Citrato; reacción de Voges Proskauer; reacción de Rojo de metilo

**9.6.2 Evaluación de la presencia de *C. jejuni*, *C. coli* y *Salmonella* spp. en carne de pollo.**

- **Toma de muestras**

La toma de muestras se realizó durante la mañana de 7:00 a 9:000, en mercados populares y supermercados de 6 macrodistritos urbanos de la ciudad de La Paz. Se tomaron muestras de carne cruda de pollo de cada mercado tomando en cuenta la forma de venta, refrigera y no refrigerado. Se embolsó la carne de pollo en bolsas estériles e

identificadas, se transportaron las muestras en conservadores a 4 °C, una vez en laboratorio se resguardo la muestra en refrigerador a 4°C, hasta el momento de procesamiento.

### **Preparación de la muestra, matriz carne pollo**

Para la preparación de la muestra se utilizó la norma ISO 687-2: Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Preparación de las muestras de análisis, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 2: Reglas específicas para la preparación de carne y productos cárnicos”. Se realizó una dilución 1/10: 25 g de carne de pollo (muestra homogénea) con 225 ml agua peptonada tamponada (APT), se mezcló en un homogeneizador Stomacher 400 durante 30s a 230 rpm. Se trabajó con la misma muestra para la detección de *Campylobacter* y *Salmonella*.

#### **9.6.2.1 Procedimiento Norma ISO 10272-1:2017**

Para la detección de *Campylobacter* spp. en matriz carne pollo cruda, se procedió a la aplicación de la Norma ISO 10272-1:2017, en 4 etapas que son:

- **Enriquecimiento selectivo**

Se realizó una dilución 1/10 de la muestra homogeneizada con caldo Preston, se incubó inmediatamente en microaerofilia a 41.5 °C por 24 h ± 2 h.

- **Siembra en placa**

Con un asa estéril de 10µL se sembró en agar mCCDA por agotamiento, se llevó a incubación en microaerofilia a 41.5 °C por 44 h±4 h.

Se examinó las placas identificando colonias típicas y/o sospechosas de *Campylobacter* spp.

- **Confirmación de colonias características**

Se seleccionó colonias de *Campylobacter* típicas o sospechosas para su aislamiento y confirmación. Las placas mCCDA de aislamiento original se almacenaron en condiciones de microaerofilia a 5 °C para su uso en la confirmación y/o identificación posterior. Se sembró cada una de las colonias seleccionadas en una placa de agar sangre no selectiva, para permitir el desarrollo de colonias bien aisladas, se incubaron las placas de agar sangre en una atmósfera de microaerofilia a 41,5 °C durante 24 h a 48 h. Además, se sembró en placas de agar sangre e incubó a 25°C durante 24 h a 48 h en medio aerobio. Después de la incubación, se evaluó la ausencia de crecimiento aeróbico a 25°C y la presencia de actividad oxidasa. Luego se realizó el examen de morfología y motilidad, con un microscopio, de una colonia recién cultivada de la placa de agar sangre, Se conservó los cultivos, en las que se encuentran bacilos curvos con una motilidad de sacacorchos espirada.

- **Interpretación de resultados**

La interpretación de resultados y la identificación los tipos de *Campylobacter* por especie, más frecuentes en carne de pollo, bajo los parámetros de la norma ISO 10272-1:2017.

- **Expresión de los resultados**

La expresión de resultados es ausencia o presencia en 25 g carne de pollo

#### **9.6.2.2 Procedimiento NB/ISO 6579:2008.**

Para la detección de *Salmonella* spp. en matriz carne pollo cruda, se procedió a la aplicación de la Norma NB/ISO 6579:2008 en 4 etapas que son:

- **Pre-enriquecimiento**

La muestra homogeneizada en dilución 1/10 se incubó  $18 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$  a  $37 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$

- **Enriquecimiento selectivo**

En esta etapa se trabajó con dos caldos selectivos para el enriquecimiento de la muestra. En un tubo con 10 mL de caldo RVS se adicionó 100  $\mu\text{L}$  de la muestra pre-enriquecida se incubó durante  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$  a  $41,5 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ . En un tubo con 10 mL de caldo MKTTn se adicionó 1 mL de la muestra pre-enriquecida, se incubó durante  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$  a  $37 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ .

- **Siembra en placa e identificación**

Una vez incubada las muestras en caldos selectivos, se procedió a la siembra por agotamiento en placas con agares selectivos, Agar XLD y BS, por cada tubo enriquecido con caldo RVS y MKTTn, en total 4 placas, luego se incubó durante  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$  a  $37 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ .

Se examinó las placas identificando colonias características o sospechosas una colonia por caja, las colonias típicas seleccionadas se marcaron en la placa.

- **Confirmación de colonias características**

Las colonias típicas seleccionadas y marcadas se aislaron en la superficie de placas de agar nutritivo para permitir el desarrollo de colonias bien aisladas. Se incubaron las placas sembradas durante  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$  a  $37 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ . Para la confirmación bioquímica se utilizó cepas puras tomadas de agar nutritivo, en los medios de cultivo que se realizó la siembra son: TSI, LIA, SIM, agar Urea, VP, RM y discos de beta galactosidasa. Para las pruebas serológicas se utilizó colonias puras tomadas del agar nutritivo los antígenos de *Salmonella* utilizados fueron O, Vi y H.

- **Interpretación de pruebas bioquímicas**

Se realizó la interpretación de las pruebas bioquímicas de acuerdo a la Norma NB/ISO 6579 :2008.

- **Confirmación de las pruebas serológicas y serotificación**

Confirmación de las pruebas serológicas y serotificación se realizó con colonias puras, primero se hizo la prueba de autoaglutinación de colonias en suero fisiológico, en portaobjetos, las muestras positivas a autoaglutinación se eliminaron.

Todas las colonias negativas a autoaglutinación, se procede a la prueba serológica con suero anti O, suero anti Vi y suero anti H. La interpretación de las pruebas de confirmación se realizó de acuerdo NB/ISO 6579 :2008

- **Expresión de resultados**

Presencia/ausencia de *Salmonella* en 25 g de carne de pollo



## **10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico EXCEL 2010 e Info Estat 2014, los estadísticos utilizados fueron: Tablas de contingencia, distribución de frecuencia, medidas de tendencia central y la prueba de “chi<sup>2</sup>”.

### **Tabla de contingencia**

Una tabla de contingencia se utilizó para resumir datos categóricos. En general, el interés se centra en estudiar si existe alguna asociación entre una variable denominada fila y otra variable denominada columna y se calculó la intensidad de dicha asociación

### **Distribución de frecuencia**

La distribución de frecuencias es un conjunto de puntuaciones ordenadas en sus respectivas categorías.

### **Medidas de tendencia central**

Las medidas de tendencia central son puntos de una distribución, los valores medios o centrales de éstas nos ayudarán a ubicarlos dentro de una escala de medición, la que usaremos en nuestro trabajo de investigación son: moda, mediana y la media.

### **Prueba de “chi<sup>2</sup> de Pearson**

La prueba  $\chi^2$  de Pearson se considera una prueba no paramétrica que mide la discrepancia entre una distribución observada y otra teórica (bondad de ajuste), indicando en qué medida las diferencias existentes entre ambas. También se utilizó para probar la independencia de dos variables entre sí, mediante la presentación de los datos en tablas de contingencia.

## 11 RESULTADOS

### 11.1 Verificación de indicadores de desempeño del método analítico ISO 10272-1: 2017 y NB/ISO 6579: 2008

#### 11.1.1 Verificación del método analítico ISO 10272-1: 2017

**Tabla 12**

*Resultados de verificación del método analítico ISO 10272-1: 2017*

<b>Indicadores de Verificación</b>	<b>Resultados</b>
Límite de detección (LD)	3 UFC/25 g de carne de pollo 100% de recuperación
Inclusividad (I)	100 % de recuperación de cepas nativas
Exclusividad (Ex)	100% de exclusión de la microbiota común acompañante
Sensibilidad (S)	100%
Especificidad (E)	100%
Características fenotípicas	Las características fenotípicas es similar a la descripción en la Norma ISO 10272-1: 2017

### 11.1.1.1 Límite de Detección (LD)

**Tabla 13**

*Límite de Detección del método ISO 10272 para C. jejuni en carne cruda de pollo*

Cepa ATCC	Nº de Muestras Fortificadas con 3 UFC/25	Desarrollo en 24 h		Desarrollo en 48 h	
		Presencia	Ausencia	Presencia	Ausencia
<i>Campylobacter jejuni</i>	30	0	30	30	0
Total	30	0	30	30	0

Presencia = Positivo

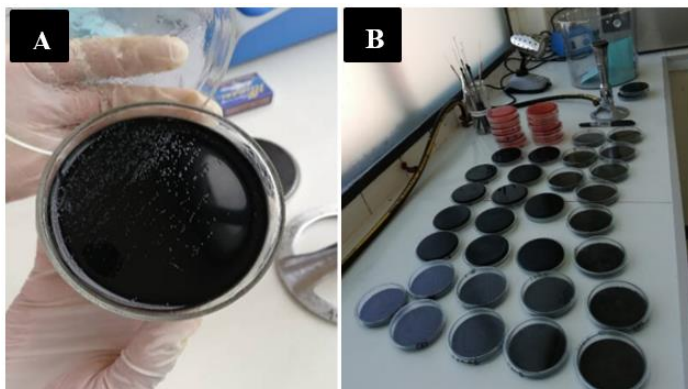
$$\% \text{ Recuperación} = \frac{n^{\circ} \text{ Pos} \times 100}{N \text{ de muestras}} \Rightarrow \frac{30 \times 100}{30}$$

**Recuperación = 100 %**

Se observa que en las 30 alícuotas de 25 gramos de pollo fortificadas con 3 UFC de *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 se recuperaron el 100% de las cepas. Estableciendo que el LD del método ISO 10272 es de 3 UFC/25 g

**Figura 3**

*Identificación de colonias típicas de C. jejuni ATCC 33291 en mCCDA en LD*



Nota: A. Colonias Típicas de *Campylobacter jejuni* ATCC33291; B. 30 muestras en medio mCCDA, resultados de LD.

### 11.1.1.2 Inclusividad

**Tabla 14**

*Resultados de Inclusividad de Campylobacter spp. (cepas nativas), ATCC 33291 y ATCC 33559*

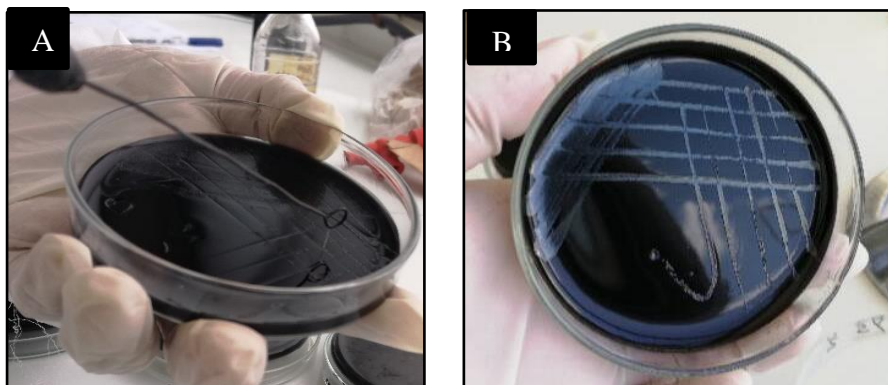
Cepa	N° de muestras	Inoculación en medio Preston	Desarrollo en 24 h mCCDA		Desarrollo en 48 h mCCDA	
			Presencia	Ausencia	Presencia	Ausencia
<i>Campylobacter</i> spp. Cepas nativas	27	93 a 250 UFC	10	17	27	0
<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33291	2	125 y 214 UFC	0	2	2	0
<i>Campylobacter coli</i> ATCC 33559	1	225 UFC	0	1	1	0
<b>Total</b>	30		20	10	30	0

% Recuperación = **100**

El desempeño del método en relación a la recuperación del analito *Campylobacter* es del 100%. Las características fenotípicas de las cepas nativas aisladas de *Campylobacter* spp. son idénticas a las cepas ATCC 332 91(Figura 4).

**Figura 4**

*Características de las colonias de Campylobacter spp. en mCCDA*



A. Colonia nativa viscosa de *Campylobacter* spp. (cepa nativa). B. Desarrollo abundante de *Campylobacter* spp (cepa nativa)

### 11.1.1.3 Exclusividad

**Tabla 15**

*Resultados de Exclusividad de Campylobacter spp.*

Cepas de interferentes	Número de muestras	Muestras fortificadas en UFC en medio Preston	Desarrollo de Colonias Típicas en mCCDA	
			24 h	48 h
<i>Proteus</i> spp.	3	6,8 x 10 <sup>4</sup>	Ausencia*	Ausenci
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	3	4,8 x 10 <sup>4</sup>	Ausencia	Ausenci
<i>Escherichia coli</i>	3	5,2 x 10 <sup>4</sup>	Ausencia	Ausenci
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10516	3	7,6 x 10 <sup>4</sup>	Ausencia	Ausenci
<i>Citrobacter</i> spp.	3	3,6 x 10 <sup>4</sup>	Ausencia	Ausenci
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3	7,3 x 10 <sup>4</sup>	Ausencia	Ausenci
<i>Klebsiella</i> spp.	3	9,0 x 10 <sup>4</sup>	Ausencia	Ausenci
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	3	4,2 x 10 <sup>4</sup>	Ausencia	Ausenci
<i>Salmonella</i> spp.	3	4,0 x 10 <sup>4</sup>	Ausencia	Ausenci
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311	3	8,4 x 10 <sup>4</sup>	Ausencia	Ausenci
<i>Total</i>	30			

\*Ausencia = Negativo

#### **% Inhibición = 100**

Se utilizaron 10 interferentes bacterianos que normalmente se encuentran en carne cruda de pollo, por cada uno se hizo tres repeticiones, en total 30 cepas. Se observa que el método ISO 10272 inhibe el desarrollo del 100% de los interferentes comunes.

### 11.1.1.4 Sensibilidad y Especificidad

**Tabla 16**

*Determinación Sensibilidad y Especificidad del método*

<b>Resultados del Ensayo a Verificar</b>	<b>Resultado Asignado Positivo</b>	<b>Resultado Asignado Negativo</b>	<b>TOTAL</b>
Positivos	30	0	30
Negativos	0	12	12
Total	30	12	42

$$\text{Sensibilidad (\%)} = \frac{PV}{N+} \times 100 \Rightarrow \frac{30}{30} \times 100$$

$$\text{Sensibilidad} = 100\%$$

$$\text{Especificidad (\%)} = \frac{NV}{N-} \times 100 \Rightarrow \frac{12}{12} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = 100\%$$

### 11.1.1.5 Características fenotípicas de cepas de *Campylobacter* con la norma ISO

10272: 1- 2017

**Tabla 17**

*Características fenotípicas de C. jejuni (ATCC 33291) y C. coli (ATCC 33559)*

<b>Características</b>	<b><i>C. jejuni</i> ATCC 33291</b>	<b><i>C. coli</i> ATCC 33559</b>
Desarrollo en medio mCCDA en microerofilia a 41,5 °C por 44 ± 4h	Las colonias típicas son grisáceas con un brillo metálico, planas, húmedas, viscoso. Miden de 2 a 4 mm	Las colonias típicas son grisáceas con un brillo metálico, son planas, húmedas, viscoso. Miden 2 a 5 mm
Desarrollo en agar sangre en microerofilia a 41,5 °C	Positivo Colonias Transparentes y viscoso	Positivo Colonias Transparentes y viscoso
Motilidad	Como sacacorchos	Como sacacorchos
Morfología*	Pequeños bacilos curvos Gram negativo	Pequeños bacilo curvos Gram negativo
Desarrollo en agar sangre a 25 °C aerobio	Negativo	Negativo
Actividad de Oxidasa	Positivo	Positivo
Actividad de Catalasa	Positivo	Positivo
Hidrolisis de Indoxil Acetato	Positivo	Positivo
Hidrolisis de Hipurato	Positivo	Negativo
*Tinción Gram modificado (Fuccina fenicada) Microaerofilia: O <sub>2</sub> <1%, CO <sub>2</sub> d 7 a 15 %		

## Figura 5

*Características Fenotípicas de C. jejuni y C. coli*

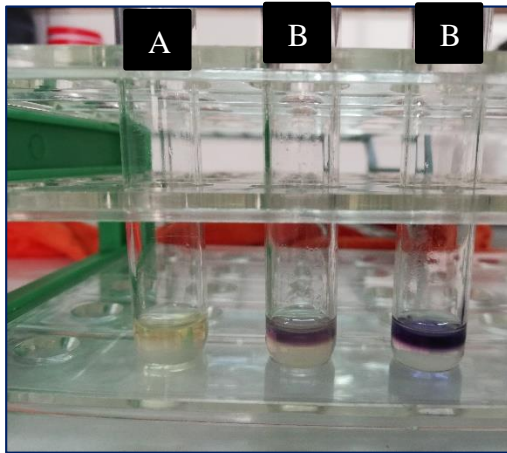


*Campylobacter jejuni* (cepa ATCC 33291) **A.** Colonias típicas en agar mCCDA, **B.** Colonia típica en agar sangre.

*Campylobacter coli* (cepa ATCC 33559) **C.** Colonias típicas en agar mCCDA

## Figura 6

*Prueba de Hidrolisis de Hipurato para C. coli y C. jejuni*



A. *Campylobacter coli* cepa ATCC 33559, Hidrolisis de hipurato negativo

B. *Campylobacter jejuni* cepa ATCC 33291, Hidrolisis de hipurato positivo



**11.1.2 Determinar indicadores de desempeño del método analítico NB/ISO 6579:2008**

**Tabla 18**

*Resultados de verificación del método analítico NB/ISO 6579:2008*

<b>Indicadores de verificación</b>	<b>Resultados</b>
Límite de detección (LD)	3 UFC/25g de carne de pollo
Inclusividad (I)	100 % de recuperación de las cepas
Exclusividad (Ex)	100 % de inhibición de cepas interferentes (colonias típicas)
Sensibilidad (S)	100%
Especificidad (E)	100%
Características fenotípicas	Las características fenotípicas es similar a la descripción en la Norma NB/ISO 6578: 2008

**11.1.2.1 Límite de Detección**

**Tabla 19**

*Resultados de LD de Salmonella Typhimurium ATCC 13311, en Carne Cruda de Pollo*

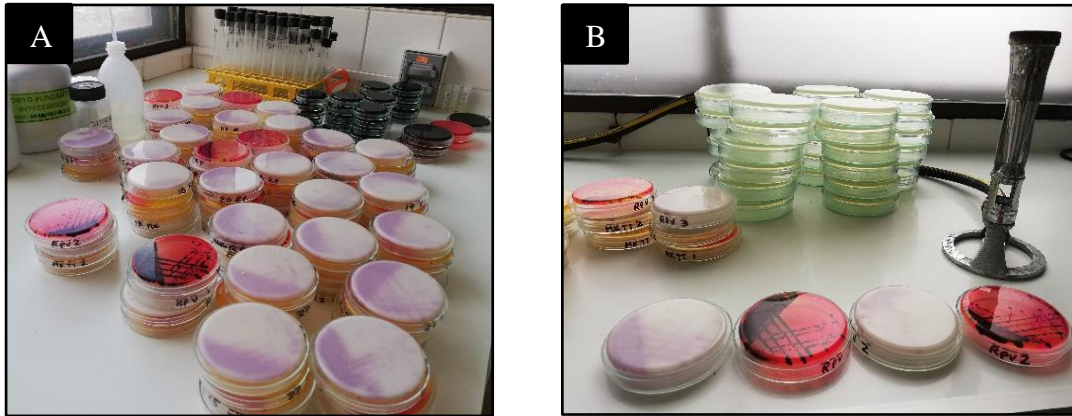
<b>Cepa</b>	<b>N° de muestras fortificadas con 3 UFC/25 g de muestra</b>	<b>Desarrollo de colonias típicas</b>	
		<b>XLD</b>	<b>BAS</b>
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311	30	30	30
<b>Total</b>	30	30	30

**% Recuperación = 100**

Estableciendo que el LD del método NB/ISO 6579:2008 es de 3 UFC/25 g.

## Figura 7

*LD en matriz carne de pollo fortificada con Salmonella Typhimurium cepa ATCC 13311*



- A. LD en 30 alícuotas, colonias típicas de *Salmonella* en medio XLD y BAS
- B. Colonias típicas de *Salmonella*, listas para el pase a Agar nutritivo

### 11.1.2.2 Inclusividad

**Tabla 20**

*Resultados de Inclusividad de Salmonella spp.*

Cepa	Nº de muestras	Inoculación en medio MKTTn y RVS	Desarrollo de colonias típicas	
			XLD	BS
<i>Salmonella</i> spp. Cepas nativas	28	122 a 198 UFC	28	28
<i>Salmonella</i> Typhimurium cepa ATCC 13311	2	204 UFC	2	2
Total	30		30	30

% Recuperación =100

El desempeño del método en relación a la recuperación del analito *Salmonella*, primordialmente de cepas nativas, se recuperó el 100% de las cepas, confirmadas con pruebas bioquímicas y serológicas.

### 11.1.2.3 Exclusividad

**Tabla 21**

*Resultados de nivel de detección de interferentes para Salmonella spp.*

Cepas interferentes	Número de muestras	Muestras fortificadas en UFC en medio MKTTn y RVS	Resultados			
			RVS		MKTTn	
			XLD	BS	XLD	BS
<i>Proteus</i> spp.	3	6,8 x 10 <sup>4</sup>	Presencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	3	4,8 x 10 <sup>4</sup>	Presencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Escherichia coli</i>	3	5,2 x 10 <sup>4</sup>	Presencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	3	7,6 x 10 <sup>4</sup>	Presencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Citrobacter</i> spp.	3	3,6 x 10 <sup>4</sup>	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3	7,3 x 10 <sup>4</sup>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Klebsiella</i> spp.	3	6,0 x 10 <sup>4</sup>	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	3	4,2 x 10 <sup>4</sup>	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
<i>Campylobacter</i> spp.	3	3,0 x 10 <sup>4</sup>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Shigella</i> spp.	3	3,4 x 10 <sup>4</sup>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Total	30					

Todas las cepas recuperadas de los interferentes comunes con la norma NB/ISO 6579:2008, no tienen las características de colonias típicas y pruebas bioquímicas de *Salmonella*. El método excluye el 100 % de las cepas

#### 11.1.2.4 Sensibilidad y especificidad del método

**Tabla 22**

*Determinación Sensibilidad y Especificidad del método NB/ISO 6579:2008*

<b>Resultados del Ensayo a Validar</b>	<b>Resultado Asignado Positivo</b>	<b>Resultado Asignado Negativo</b>	<b>TOTAL</b>
<b>Positivos</b>	30	0	30
<b>Negativos</b>	0	12	12
<b>Total</b>	30	30	42

$$\text{Sensibilidad (\%)} = \frac{PV}{N+} \times 100 \Rightarrow \frac{30}{30} \times 100$$

$$\text{Sensibilidad} = 100\%$$

$$\text{Especificidad (\%)} = \frac{NV}{N-} \times 100 \Rightarrow \frac{12}{12} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = 100\%$$

La sensibilidad y la especificidad se determinó por medio de la tabla de contingencia 2x2. La aplicación de la Norma NB/ISO 6579:2008 se declara la Especificidad y Sensibilidad en carne cruda pollo es del 100 %.

### 11.1.2.5 Características Fenotípicas de *Salmonella Typhimurium* ATCC

13311

**Tabla 23**

*Características Fenotípicas de Salmonella Typhimurium cepa ATCC 13311*

<b>Características</b>	<b>Resultados</b> <i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 13311
Características de las colonias en <b>XLD</b>	Colonias translúcidas con un tono rojizo con precipitado negro, miden de 2 a 4 mm
Características de las colonias en <b>BS</b>	Colonias de color morado, miden de 1 a 3 mm
Morfología	Bacilos Gram negativo
Ácido a partir de la glucosa en TSI	Positivo
Gas a partir de glucosa en TSI	Positivo
Acido a partir de lactosa	Negativo
Producción de Sulfuro de Hidrógeno en TSI	Positivo
Descarboxilación de la Lisina	Positivo
Producción de Sulfuro de Hidrógeno en LIA	Positivo
Producción de gas en LIA	Positivo
Producción de Indol	Negativo
Producción de Sulfuro de Hidrógeno en SIM	Positivo
Movilidad	Positivo
Hidrolisis de Urea	Negativo
Utilización del Citrato	Positivo
Reacción de Voges Proskauer	Negativo
Rojo de metilo	Positivo

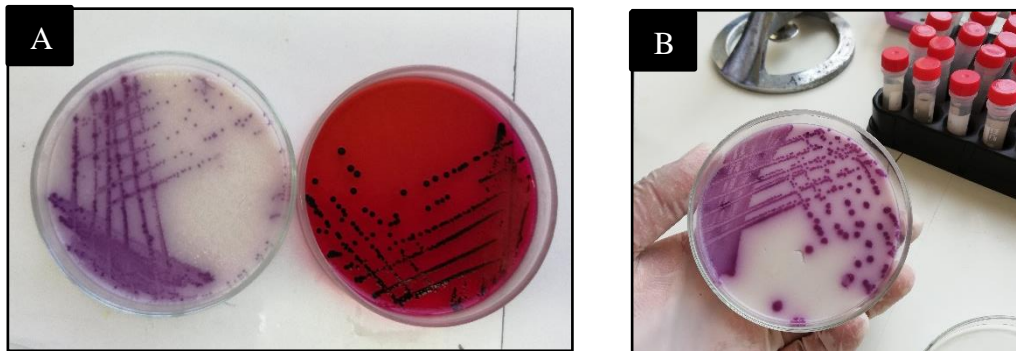
**Tabla 24**

*Resultado de Pruebas Serológicas para Salmonella Typhimurium ATCC 13311*

Suero	Reacciones bioquímicas	Aglutinación de las colonias típicas	Resultado Reacción serológica
Anti O	Típicas	No	Antígeno O positivo
Anti H	Típicas	No	Antígeno H positivo
Anti Vi	Típicas	No	Antígeno Vi Negativo

**Figura 8**

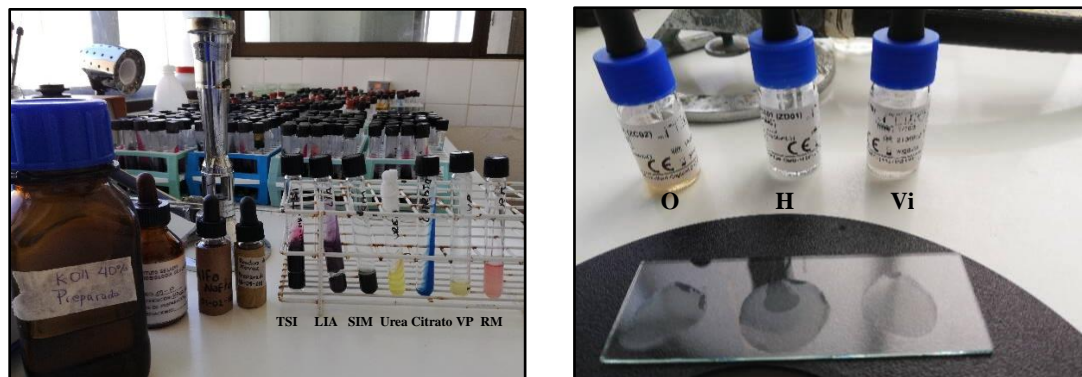
*Característica de las colonias de Salmonella Typhimurium ATCC 13311 y cepa nativa*



A. Colonias típicas de *Salmonella Typhimurium* en medio BS y XLD; B. Colonias típicas de *Salmonella* nativa en medio BS

**Figura 9**

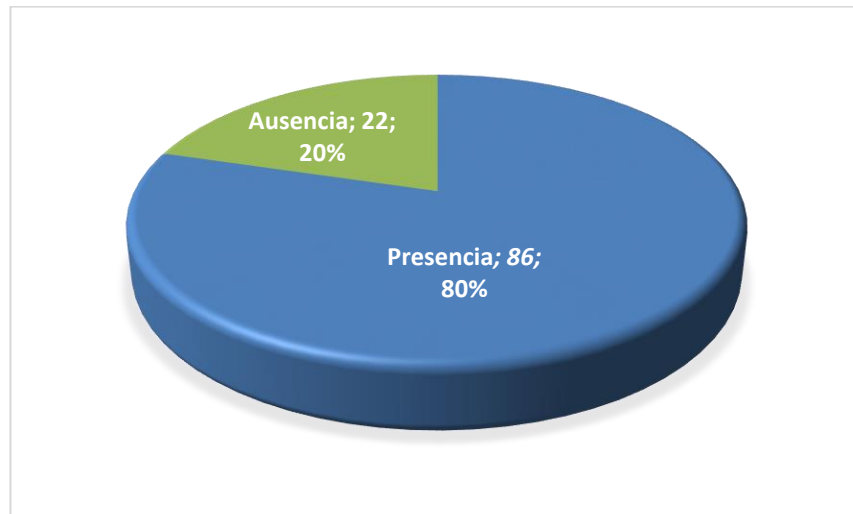
*Resultados de pruebas bioquímicas y serológica de Salmonella Typhimurium ATCC 13311*



## 11.2 Evaluación de la presencia de *C. jejuni*, *C. coli* y *Salmonella* spp. en carne cruda de pollo de expendio en la ciudad de La Paz

**Figura 10**

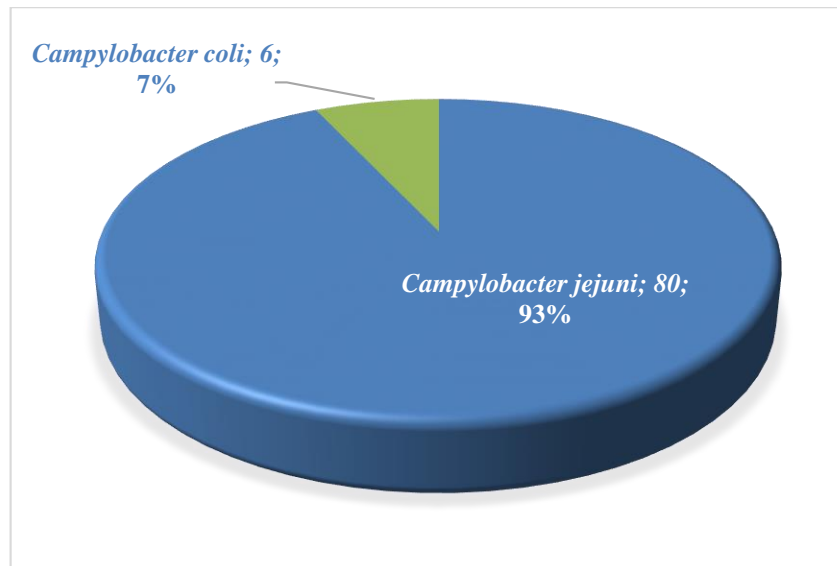
*Presencia de Campylobacter spp. en Carne Cruda de Pollo, de expendidos en la ciudad de La Paz.*



Se tomó 108 muestras de pollo crudo entero de diferentes puntos de venta de la ciudad de La Paz, se aplicó el método ISO 10272:2017 para la detección de *Campylobacter* spp. Se observó que de las 108 muestras de carne cruda de pollo 86 existe presencia de *Campylobacter*.

**Figura 11**

*Presencia de C. jejuni y C. coli en carne cruda de pollo que se expende en la ciudad de La Paz*

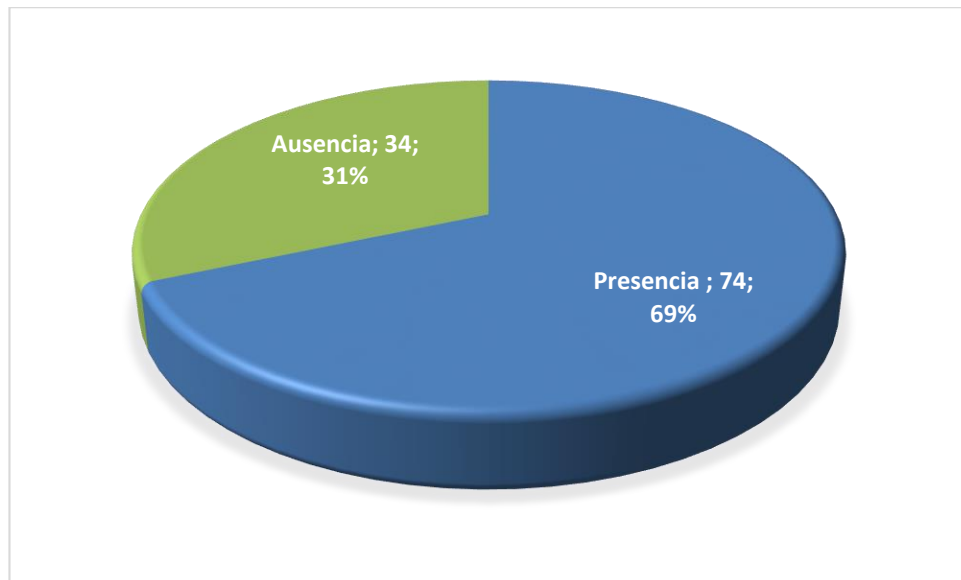


En 86 muestras de carne cruda de pollo se evidenció la presencia de *Campylobacter* de los cuales, como se observa en la Figura 11. En 93% son *C. jejuni* que corresponde a 80 muestras de pollo crudo, 7% presenta *C. coli* que corresponde a 6 muestras de pollo crudo.



### Figura 12

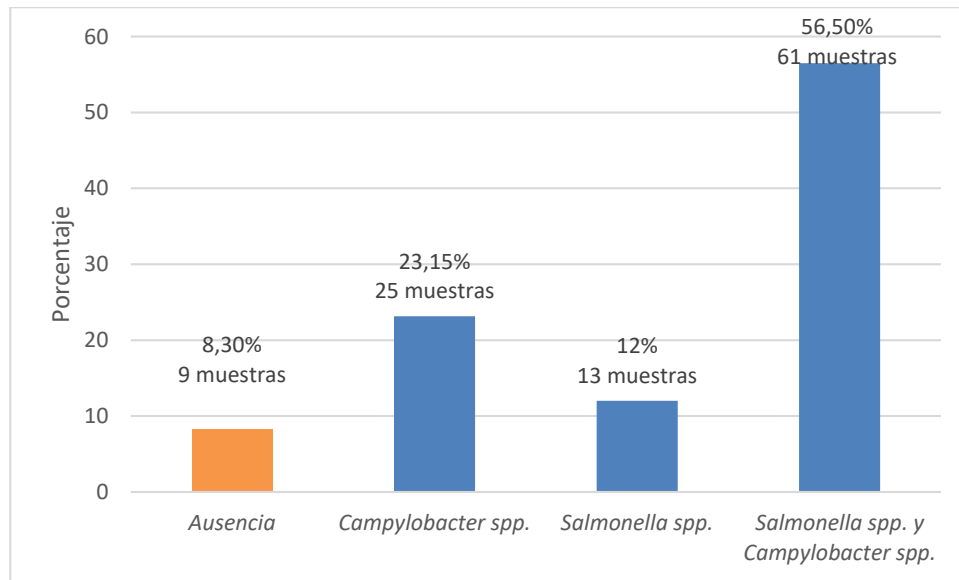
*Resultados de presencia de Salmonella spp., en carne cruda de pollo que se expende en la ciudad de La Paz*



Se muestrearon 108 muestras de pollo de diferentes puntos de venta del área urbana de la ciudad de La Paz, en la Figura 12 se observa que el 69% de muestras de pollo presentan el microorganismo de *Salmonella* spp. que corresponde a 74 muestras y en el 31 % ausencia del microorganismo, que corresponde a 34 muestras de pollo crudo.

### Figura 13

Porcentaje de presencia de *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. por unidad de carne de pollo crudo que se expende en la ciudad de La Paz



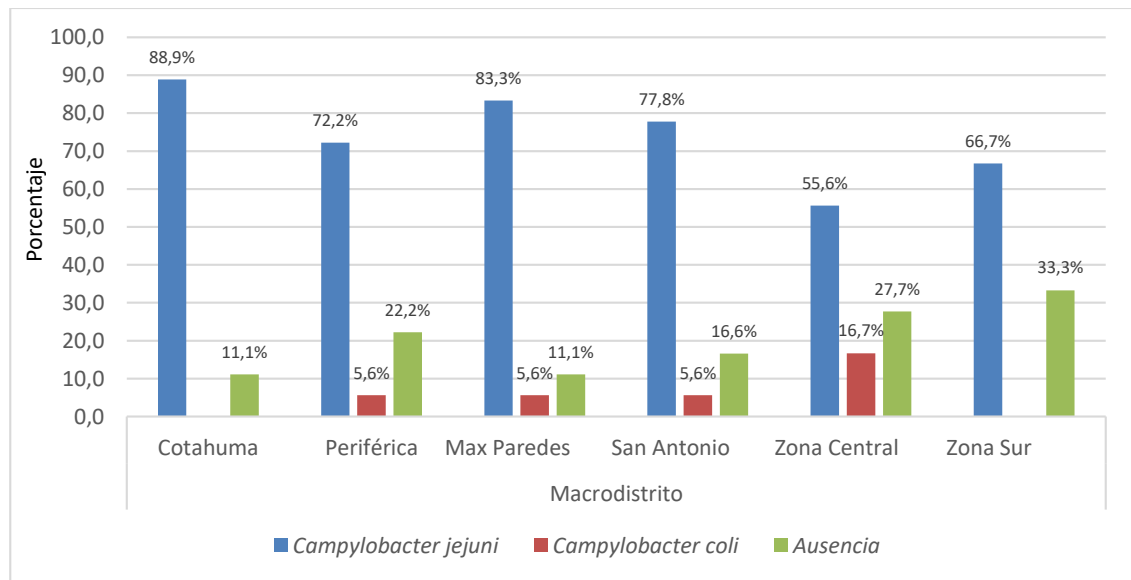
A las 108 muestras de pollo crudo se determinó las dos bacterias de interés en la investigación, 61 muestras dieron positivo a *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. (56,5%), sólo en 9 muestras no se evidenció la presencia de las dos bacterias (8,3 %)

### 11.3 *C. jejuni*, *C. coli* y *Salmonella* spp. en carne cruda de pollo por factores de estudio

#### 11.3.1 Macrodistritos

**Figura 14**

*Presencia C. jejuni y C. coli en carne cruda de pollo por macrodistritos de la ciudad de La Paz*



Por cada macrodistrito se muestreo 18 carnes crudos de pollos enteros, se evidencia un porcentaje alto de *C. jejuni* en todos los macrodistritos.

Presencia de *C. coli* solo en 4 macrodistritos, encontrándose con mayor porcentaje (16,7 %) en la Zona central.

**Tabla 25**

*Tabla de contingencia entre Campylobacter spp. en carne cruda de pollo en macrodistritos de la ciudad de La Paz*

Macrodistrito	Frecuencia	<i>Campylobacter</i> spp. en carne cruda de pollo		Total
		Ausencia	Presencia	
		Cotahuma	Observada	
	Esperada	4	14	18
Max Paredes	Observada	2	16	18
	Esperada	4	14	18
Periférica	Observada	4	14	18
	Esperada	4	14	18
San Antonio	Observada	3	15	18
	Esperada	4	14	18
Zona Central	Observada	5	13	18
	Esperada	4	14	18
Zona Sur	Observada	6	12	18
	Esperada	4	14	18
Total Frecuencia Observada		22	86	108
Total Frecuencia Esperada		22	86	108

Los valores de la frecuencia observada en comparación con los valores de las frecuencias esperadas son parecidos. Para verificar la independencia entre las variables se realizó la prueba de Chi cuadrado, para lo cual se realizó la prueba de hipótesis:

Ho: La presencia de *Campylobacter* spp. en carne cruda de pollo es independiente del muestreo tomado por macrodistrito de la ciudad de La Paz

Ha: La presencia de *Campylobacter* spp. en carne cruda de pollo es dependiente del muestreo tomado por macrodistrito de la ciudad de La Paz

**Tabla 26.**

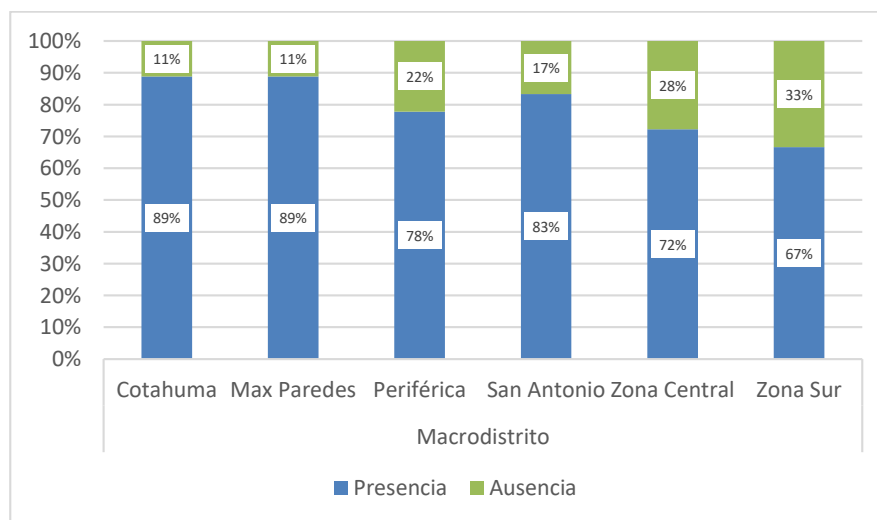
*Prueba de Chi Cuadrado entre Campylobacter spp. en carne cruda de pollo y macrodistritos de la ciudad de La Paz*

Estadístico	Valor	Grados de Libertad	P
Chi Cuadrado Pearson	4,57	5	0,4710
Chi Cuadrado MV-G2	4,60	5	0,0,4671
<u>Coef.Conting.Pearson</u>	0,20		

Los resultados de la prueba de Chi Cuadrado son;  $\chi^2 (5) = 4.57$ ;  $p > 0,05$ . El valor de significancia (valor crítico observado) es  $0,4710 > 0,05$ , por lo tanto, aceptamos la hipótesis de nulidad (Ho).

**Figura 15**

*Porcentaje de presencia de Campylobacter spp. en carne cruda de pollo por macrodistrito de la ciudad de La Paz*



En 6 macrodistritos del área urbana de la ciudad de La Paz, se detectó *Campylobacter* con porcentajes altos en todos los macrodistrito.

**Tabla 27***Tabla de contingencia de Salmonella spp. en carne cruda de pollo por macrodistrito*

Macrodistrito	Frecuencia	<i>Salmonella</i> spp.		Total
		Ausencia	Presencia	
Cotahuma	Observada	8	10	18
	Esperada	6	12	
Max Paredes	Observada	6	12	18
	Esperada	6	12	
Periférica	Observada	7	11	18
	Esperada	6	12	
San Antonio	Observada	4	14	18
	Esperada	6	12	
Zona Central	Observada	4	14	18
	Esperada	6	12	
Zona Sur	Observada	5	13	18
	Esperada	6	12	
Total Frecuencia Observada		34	74	108
Total Frecuencia Esperada		34	74	108

Los valores de la frecuencia observada en comparación con los valores de las frecuencias esperadas son parecidos. Para verificar la independencia entre las variables se realizó la prueba de Chi cuadrado, para lo cual se hizo la prueba de hipótesis:

Ho: La presencia de *Salmonella* spp. en carne cruda de pollo es independiente del muestreo tomado por macrodistrito de la ciudad de La Paz

Ha: La presencia de *Salmonella* spp. en carne de pollo es dependiente del muestreo tomado por macrodistrito de la ciudad de La Paz

**Tabla 28**

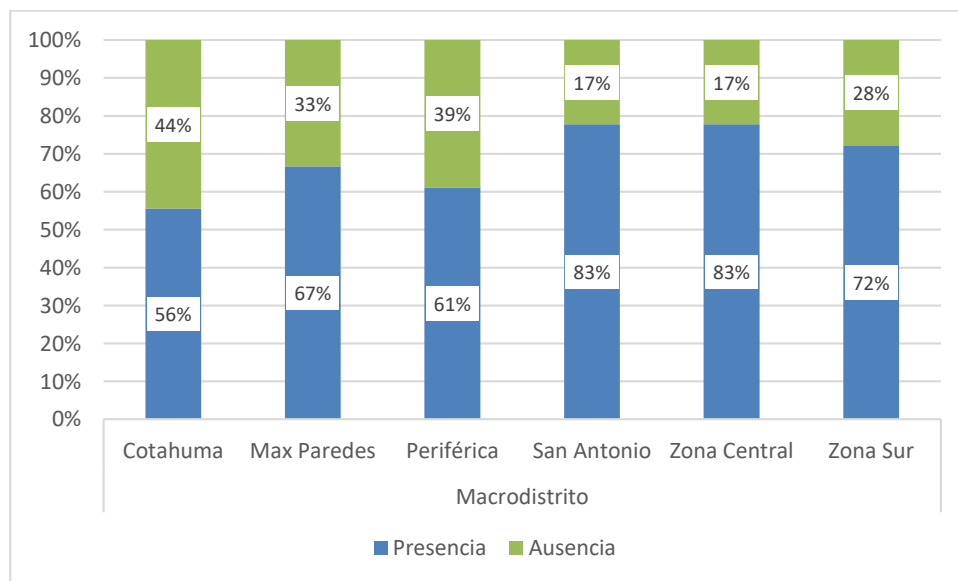
*Prueba de Chi cuadrado, Salmonella spp. en carne cruda de pollo por macrodistrito*

Estadístico	Valor	Grados de Libertad	<i>p</i>
Chi Cuadrado Pearson	3,43	5	0,6334
Chi Cuadrado MV-G2	3,43	5	0,6333
<u>Coef.Conting.Pearson</u>	0,18		

Los resultados de la prueba de Chi Cuadrado son;  $\chi^2 (5) = 3.43$ ;  $p > 0,05$ . El valor de significancia (valor crítico observado) es  $0,6334 > 0,05$ , por lo tanto, aceptamos la hipótesis de nulidad ( $H_0$ ).

**Figura 16**

*Porcentaje de presencia de Salmonella spp. en carne cruda de pollo por macrodistrito*

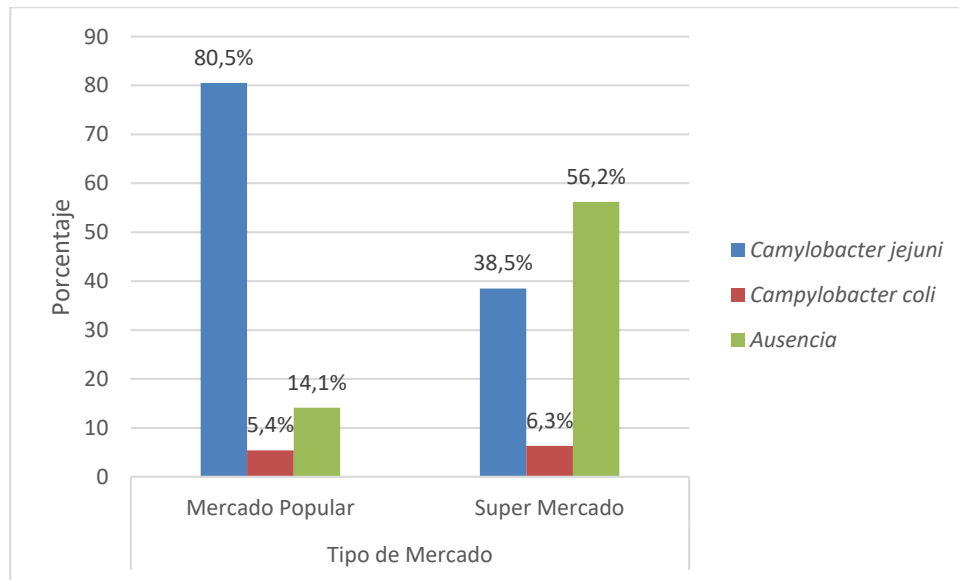


En los 6 macrodistritos de la ciudad de La Paz, se detectó en carne cruda de pollo *Salmonella* spp, con porcentajes altos en todos los macrodistrito.

### 11.3.2 Tipo de Mercado

**Figura 17**

*Presencia de C. jejuni y C.coli en carne cruda de pollo por tipo de mercado*



El porcentaje por tipo de mercado, se observa que los mercados populares tienen mayor porcentaje presencia de *C. jejuni*. Los porcentajes de *C. coli* son casi similares por tipo de mercado.



**Tabla 29.**

*Tabla de contingencia entre Campylobacter spp. en carne cruda de pollo por tipo de mercado de la ciudad de La Paz*

Tipo de Mercado	Frecuencia	<i>Campylobacter</i> spp.		Total
		Ausencia	Presencia	
Mercado popular	Observada	12	77	89
	Esperada	18	71	89
Supermercado	Observada	10	9	19
	Esperada	4	15	19
Total de Frecuencia Observada		22	86	108
Total de Frecuencia Esperada		22	86	108

Las frecuencias observadas de presencia y ausencia de *Campylobacter* spp. en comparación con los valores de las frecuencias esperadas son diferentes por tipo de mercado. Para la prueba de independencia entre las variables se realizó la prueba de Chi cuadrado, para lo cual se hizo la prueba de hipótesis:

Ho: La presencia de *Campylobacter* spp. en carne cruda de pollo es independiente del tipo de mercado de la ciudad de La Paz

Ha: La presencia de *Campylobacter* spp. en carne Cruda de pollo es dependiente del tipo de mercado de la ciudad de La Paz.

**Tabla 30**

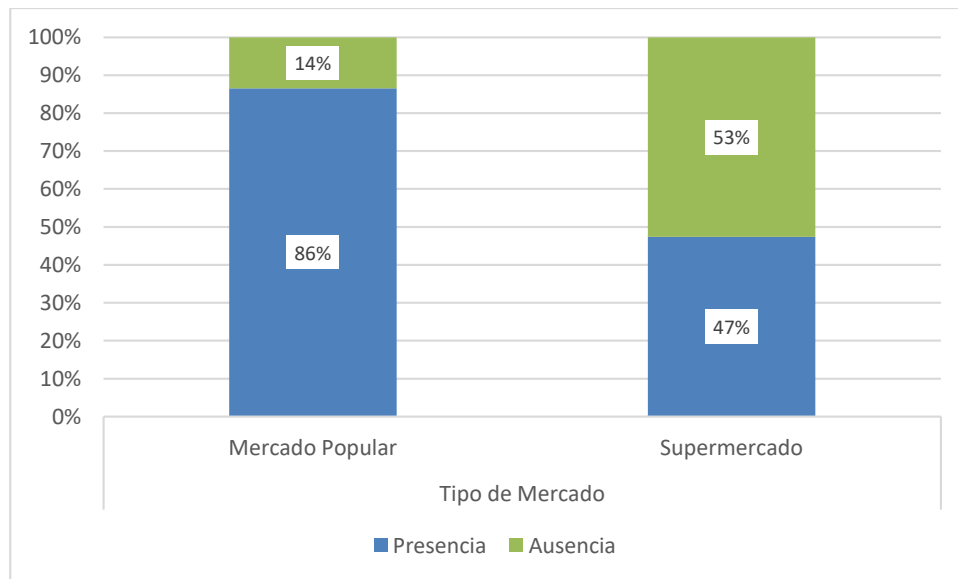
*Prueba de Chi cuadrado entre Campylobacter spp. en carne cruda de pollo, por tipo de mercado de la ciudad de La Paz*

Estadístico	Valor	Grados de Libertad	<i>p</i>
Chi Cuadrado Pearson	14,79	1	0,0001
Chi Cuadrado MV-G2	12,51	1	0,0004
Coef.Conting.Pearson	0,35		

Los resultados de la prueba de Chi Cuadrado son;  $\chi^2 (1) = 14,79$ ,  $p < 0,05$ . El valor de significancia (valor crítico observado) es  $0,0001 < 0,05$ . Se acepta la hipótesis altera (Ha).

**Figura 18**

*Porcentaje de presencia de Campylobacter spp. en carne cruda de pollo por tipo de mercado*



El muestreo de carne de pollo por tipo de mercado, en la Tabla 30, muestra que existe una diferencia significativa ( $0,0001 < 0,05$ ) de presencia de *Campylobacter* spp. en carne de pollo entre Mercado popular (86%) y Supermercado (47%).

**Tabla 31**

*Tabla de Contingencia de Salmonella spp. en carne cruda de pollo por tipo de mercado*

Tipo de Mercado	Frecuencia	<i>Salmonella spp</i>		Total
		Ausencia	Presencia	
Mercado popular	Observada	26	63	89
	Esperada	28	61	89
Supermercado	Observada	8	11	19
	Esperada	6	13	19
Total Frecuencia Observada		34	74	108
Total Frecuencia Esperada		34	74	108

Los valores de la frecuencia observada en comparación con los valores de las frecuencias esperadas son parecidos. Para verificar la independencia entre las variables se realizó la prueba de Chi cuadrado, para lo cual se hizo la prueba de hipótesis:

Ho: La presencia de *Salmonella spp.* en carne cruda de pollo es independiente del Tipo de mercado de la ciudad de La Paz

Ha: La presencia de *Salmonella spp.* en carne cruda de pollo es dependiente del Tipo de mercado de la ciudad de La Paz.

**Tabla 32**

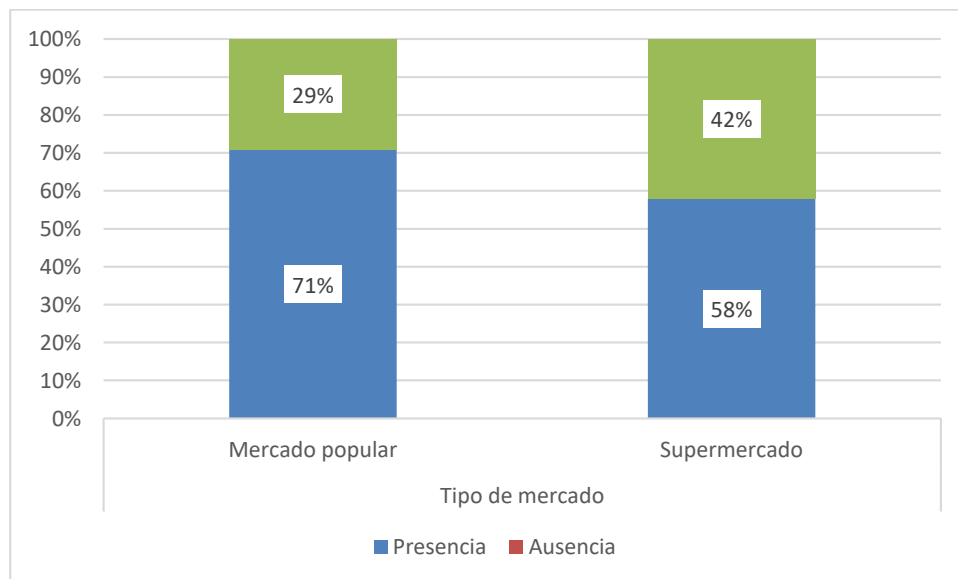
*Prueba de Chi cuadrado de Salmonella spp. en carne cruda de pollo y tipo de mercado de la ciudad de La Paz*

Estadístico	Valor	Grados de Libertad	P
Chi Cuadrado Pearson	1,21	1	0,2721
Chi Cuadrado MV-G2	1,16	1	0,2813
Coef.Conting.Pearson	0,11		

Los resultados de la prueba de Chi Cuadrado son;  $\chi^2 (1) = 1.21$ ;  $p > 0,05$ . El valor de significancia (valor crítico observado) es  $0,2721 > 0,05$ , aceptamos la hipótesis nula (Ho)

**Figura 19**

*Porcentaje de Presencia de Salmonella spp. en Carne Cruda de Pollo por Tipo de Mercado*



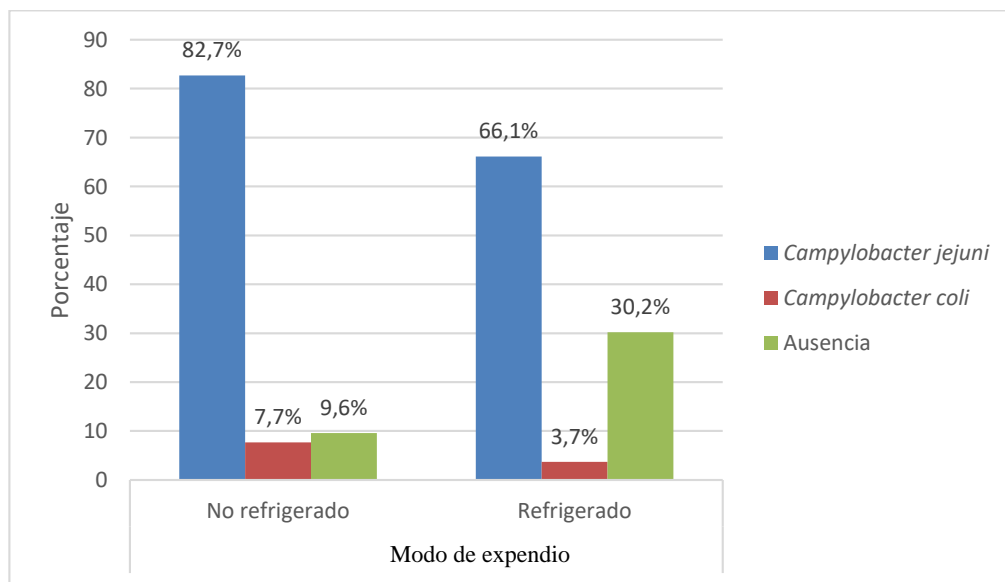
El muestreo de carne de pollo por tipo de mercado, muestra que existe presencia de *Salmonella* spp. en carne cruda de pollo en ambos tipos de mercado. En la comparación de

porcentajes por tipo de mercado se evidencia que en Mercado Popular tiene mayor porcentaje (71%) mientras tanto el porcentaje es menor (58%) en Supermercados.

### 11.3.3 Modo de expendio

**Figura 20**

*Presencia de *C. jejuni* y *C. coli* en carne cruda de pollo por modo de expendio*



Por tipo de expendio de la carne cruda de pollo se observa que ambas bacterias en estudio se encuentran con porcentajes elevados en carne cruda de pollo no refrigerado al momento del muestreo.

**Tabla 33**

*Tabla de contingencia de Campylobacter spp. en carne cruda de pollo por modo de expendio*

Tipo de Expendio	Frecuencia	Campylobacter spp.		Total
		Ausencia	Presencia	
No refrigerado	Observada	5	47	52
	Esperada	11	41	52
Refrigerado	Observada	17	39	56
	Esperada	11	45	56
Total Frecuencia Observada		22	86	108
Total Frecuencia Esperada		22	86	108

Los valores de la frecuencia observados en comparación con los valores de las frecuencias esperadas son diferentes. Para la prueba de independencia entre las variables se realizó la prueba de Chi cuadrado, para lo cual se hizo la prueba de hipótesis:

Ho: La presencia de *Campylobacter* spp. en carne cruda de pollo es independiente del muestreo por modo de expendio en la ciudad de La Paz.

Ha: La presencia de *Campylobacter* spp. en carne cruda de pollo es dependiente del muestreo por modo de expendio en la ciudad de La Paz.

**Tabla 34**

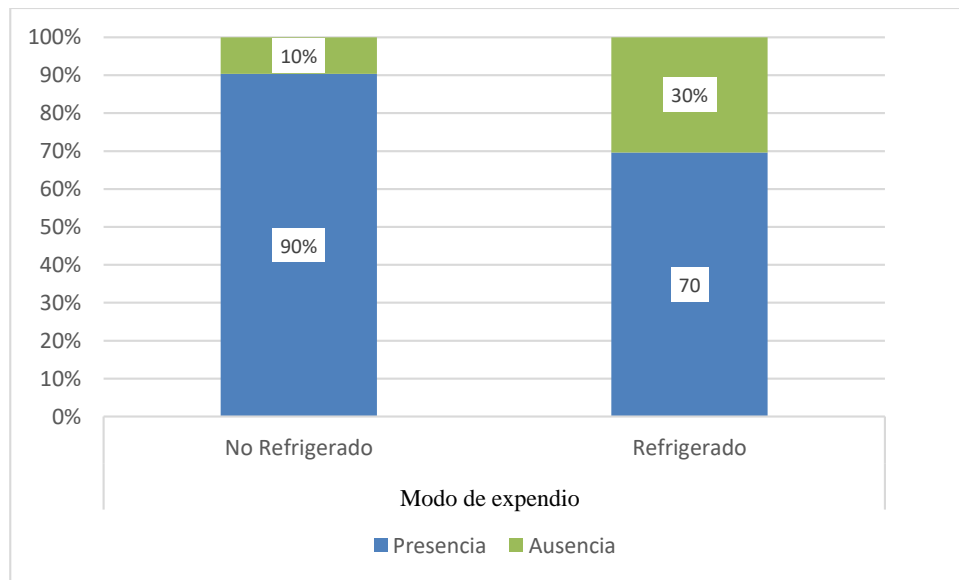
*Prueba de Chi cuadrado Campylobacter spp. en carne cruda de pollo por modo de expendio*

Estadístico	Valor	Grados de Libertad	P
Chi Cuadrado Pearson	7,15	1	0,0075
Chi Cuadrado MV-G2	1751	1	0,0061
<u>Coef.Conting.Pearson</u>	0,25		

Los resultados de la prueba de Chi Cuadrado, como se observa en la Tabla 30, son;  $\chi^2(1) = 7,15$   $p < 0,05$ . El valor de significancia (valor crítico observado) es  $0,0075 < 0,05$ , por lo tanto, aceptamos la hipótesis de alterna ( $H_a$ ).

### Figura 21

*Porcentaje de Presencia de Campylobacter spp. en carne de pollo por modo de expendio*



El muestreo de carne de pollo por modo de expendio, existe una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) de presencia de *Campylobacter* en carne de pollo, observando que existe un mayor porcentaje de presencia de *Campylobacter* spp. en carne de pollo no refrigerado.

**Tabla 35**

*Tabla de contingencia de Salmonella spp. en carne cruda de pollo por modo de expendio*

Tipo de Expendio	Frecuencia	<i>Salmonella spp</i>		Total
		Ausencia	Presencia	
No refrigerado	Observada	13	39	52
	Esperada	16	36	52
Refrigerado	Observada	21	35	56
	Esperada	18	38	56
Total Frecuencia Observada		34	74	108
Total Frecuencia Esperada		34	74	108

Los valores de la frecuencia observada en comparación con los valores de las frecuencias esperadas son parecidos. Para verificar la independencia entre las variables se realizó la prueba de Chi cuadrado, para lo cual se hizo la prueba de hipótesis:

Ho: La presencia de *Salmonella spp.* en carne de pollo es independiente del modo de expendio de la ciudad de La Paz

Ha: La presencia de *Salmonella spp.* en carne de pollo es dependiente del modo de expendio de la ciudad de La Paz.



**Tabla 36**

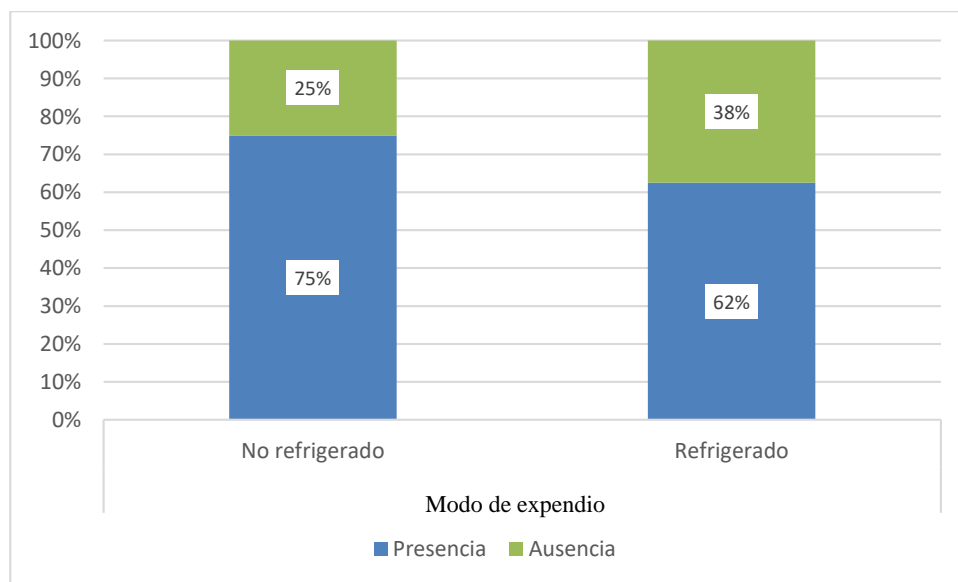
*Prueba de Chi cuadrado de Salmonella spp. en carne cruda de pollo por modo de expendio*

Estadístico	Valor	Grados de Libertad	P
Chi Cuadrado Pearson	1,95	1	0,1623
Chi Cuadrado MV-G2	1,97	1	0,1606
<u>Coef.Conting.Pearson</u>	0,13		

Los resultados de la prueba de Chi Cuadrado son;  $\chi^2 (1) = 1,95$ ;  $p > 0,05$ . El valor de significancia (valor crítico observado) es  $0,1623 > 0,05$ , por lo tanto, aceptamos la hipótesis de nulidad (Ho).

**Figura 22**

*Porcentaje de presencia de Salmonella spp. en carne de pollo por modo de expendio*



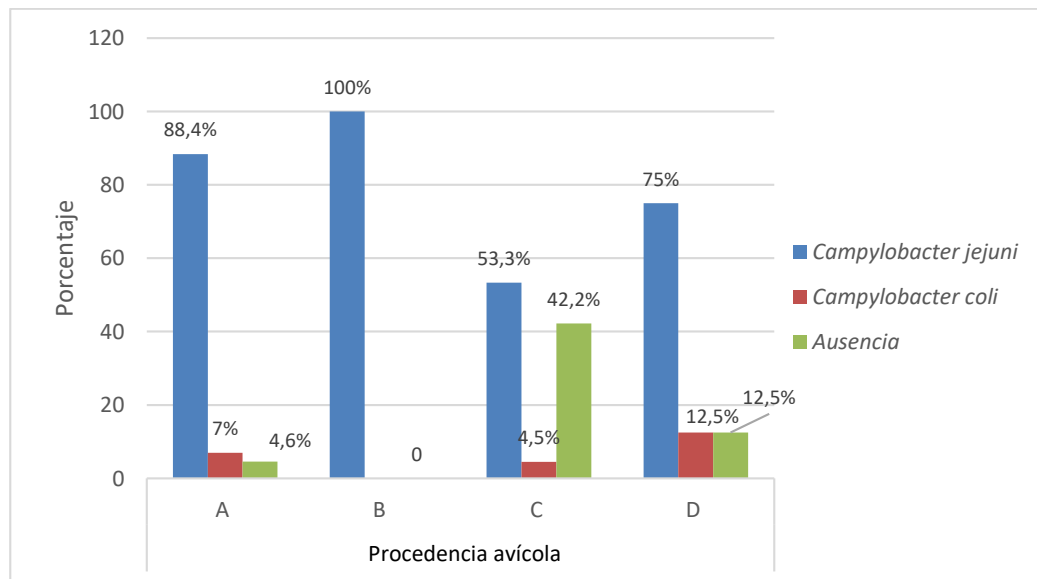
Existe una diferencia de presencia de *Salmonella* spp. en carne de pollo por modo de expendio, pero la diferencia estadísticamente no es significativa. Se observa que existe un

mayor porcentaje de presencia de *Salmonella* spp. en carne de pollo no refrigerado, al momento del expendio. Se muestrearon 56 muestras de carne de pollo refrigeradas de las cuales 35 muestras (62%) presentan *Salmonella* spp. y 21 muestras (38%) no presentan el microorganismo. Se muestrearon 52 muestras de carne de pollo no refrigeradas de las cuales 39 muestras (75%) y 13 muestras (25%) dieron ausencia del microorganismo en estudio

### 11.3.4 Procedencia avícola

**Figura 23**

*Presencia de C. jejuni y C. coli en carne cruda de pollo por procedencia avícola*



En todas las marcas de pollo se evidencio la presencia de *C. jejuni* con porcentajes altos. *C. coli* se encontró en tres proveedores de carne cruda de pollo, observando un mayor porcentaje en D (12%). En la procedencia avícola B se observa 100% de *C. jenuni*.

**Tabla 37**

*Tabla de contingencia entre Campylobacter spp. en carne cruda de pollo y procedencia avícola*

Marca de pollo	Frecuencia	Campylobacter spp.		Total
		Ausencia	Presencia	
A (Imba)	Observada	2	41	43
	Esperada	9	34	43
B (Pio Rico)	Observada	0	12	12
	Esperada	2	10	12
C (Sofía)	Observada	19	26	45
	Esperada	9	36	45
D (Yungueña)	Observada	1	7	8
	Esperada	2	6	8
Total Frecuencia Observada		22	86	108
Total Frecuencia Esperada		22	86	108

Los valores de la frecuencia observados en comparación con los valores de las frecuencias esperadas son diferentes. Para la prueba de independencia entre las variables se realizó la prueba de Chi cuadrado, para lo cual se hizo la prueba de hipótesis:

Ho: La presencia de *Campylobacter* spp. en carne cruda de pollo es independiente de la procedencia avícola.

Ha: La presencia de *Campylobacter* spp. en carne cruda de pollo es dependiente de la procedencia avícola.

**Tabla 38**

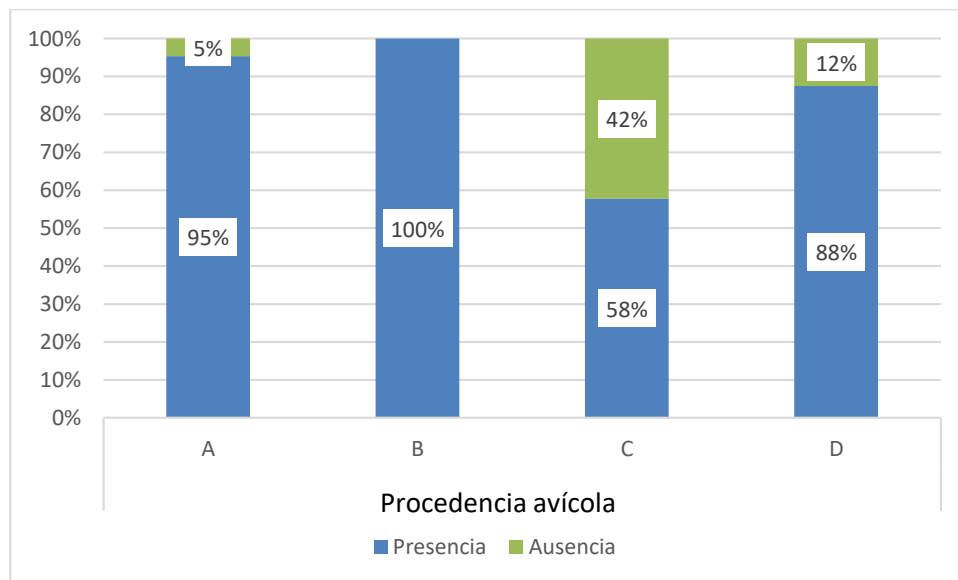
*Prueba de Chi Cuadrado de Campylobacter spp. en carne cruda de pollo por procedencia avícola.*

<b>Estadístico</b>	<b>Valor</b>	<b>Grados de Libertad</b>	<b>P</b>
Chi Cuadrado Pearson	23,17	3	<0,0001
Chi Cuadrado MV-G2	25,69	3	<0,0001
<u>Coef.Conting.Pearson</u>	0,42		

Los resultados de la prueba de Chi Cuadrado son;  $\chi^2 (3) = 23,17$ ;  $p < 0,05$ . El valor de significancia (valor crítico observado) es  $0,0001 < 0,05$ , por lo tanto, aceptamos la hipótesis de alterna (Ha).

**Figura 24**

*Porcentaje de la presencia de Campylobacter spp. en carne cruda de pollo por procedencia avícola*



Se muestreo 4 marcas de carne de pollo que se expenden con mayor frecuencia en la ciudad de La Paz, todo los proveedores dieron presencia de *Campylobacter* spp. con porcentajes altos. En la Figura 24, muestra que existe una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) de presencia de *Campylobacter* spp. en carne de pollo por procedencia avícola, observando que existe un mayor porcentaje de presencia en “B” (100%), seguida por “A” (95%), “D” con 88% y “C” es la que menor porcentaje de presencia del microorganismo presenta 58%, comparando entre las 4 procedencias avícolas.

**Tabla 39**

*Tabla de contingencia entre procedencia avícola y presencia de Salmonella spp. en carne de pollo*

Marca de pollo	Frecuencia	Salmonella spp.		Total
		Ausencia	Presencia	
A (Imba)	Observada	14	29	43
	Esperada	14	29	43
B (Pio Rico)	Observada	2	10	12
	Esperada	4	8	12
C (Sofía)	Observada	16	29	45
	Esperada	14	31	45
D (Yungueño)	Observada	2	6	8
	Esperada	2	6	6
Total Frecuencia Observada		34	74	108
Total Frecuencia Esperada		34	74	108

**Tabla 40**

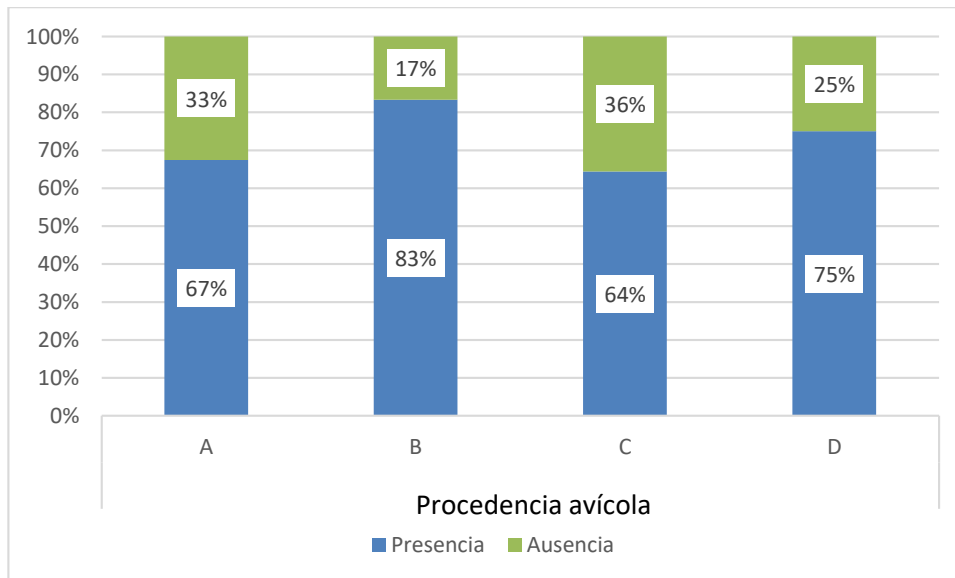
*Prueba de Chi cuadrado Salmonella spp. en carne cruda de pollo por marca de pollo*

Estadístico	Valor	Grados de Libertad	p
Chi Cuadrado Pearson	1,75	3	0,6267
Chi Cuadrado MV-G2	1,9	3	0,5944
<u>Coef.Conting.Pearson</u>	0,13		

Los resultados de la prueba de Chi Cuadrado son;  $\chi^2 (3) = 1,75$ ;  $p > 0,05$ . El valor de significancia (valor crítico observado) es  $0,6267 > 0,05$ , por lo tanto, aceptamos la hipótesis de nulidad ( $H_0$ ), a un nivel del 95% de confiabilidad.

**Figura 25**

*Porcentaje de presencia de Salmonella spp. en carne cruda de pollo por procedencia avícola*



Se muestreo 4 proveedores de carne de pollo que se expenden con mayor frecuencia en la ciudad de La Paz, En la Figura 25, se observa que existe un mayor porcentaje de presencia de *Salmonella* spp. en “B” (83%), seguida por “D” (75%), la procedencia avícola “A” con 67% y la muestra “C” es la que menor porcentaje de presencia del microorganismo presenta 64%, comparando entre las 4 procedencias avícolas.

## 12 DISCUSIONES

La salmonelosis y la campilobacteriosis son enfermedades zoonóticas transmitidas al hombre por alimentos, siendo la fuente de infección los alimentos contaminados, principalmente la carne de pollo. En la ciudad de La Paz el consumo per cápita es de 60 kg de carne de pollo por año, siendo superior al consumo per cápita promedio en Latinoamérica, el cual es 34 kg de pollo por año (El Mundo, 2018), factor que incrementa el riesgo de adquirir las infecciones por *Salmonella* y *Campylobacter*, en nuestra población.

Antes de realizar el diagnóstico de *Campylobacter* y *Salmonella* en carne cruda de pollo, en los diferentes puntos de venta de pollo en la ciudad de La Paz, se realizó la verificación de métodos analíticos normalizados para ambos microorganismos, durante el periodo de enero a mayo del 2018, dando cumplimiento al requisito 7.2.1.3. de la Norma ISO 17025:2017. Con el fin de evidenciar que el laboratorio cumple con las especificaciones técnicas originales del método, se aplicó verificación (validación secundaria) del método cualitativo de ensayo microbiológico ISO 10272-1:2017 Método horizontal para la detección de *Campylobacter* spp y NB/ISO 6579:2008 Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp, en matriz de carne cruda de pollo.

Para iniciar la verificación de los métodos Normalizados se tuvo problemas en encontrar matriz libre de los microorganismos de *Salmonella* y *Campylobacter* en nuestros mercados. Es así que para *Campylobacter*, se procesaron en total 19 muestras de pollo entero crudo, pero 18 muestras al momento de realizar las 6 repeticiones analíticas, por lo menos 1 muestra, resultó positivo para *Campylobacter* spp., sólo 1 muestra en sus



6 repeticiones analíticas, resultó estar libre de *Campylobacter* spp. Para *Salmonella* spp. se procesaron en total 20 muestras de pollo entero crudo, pero 18 muestras al momento de realizar las 6 repeticiones, por lo menos 1 muestra, resultó positiva, sólo 2 muestras, en sus 6 repeticiones, resultó estar libre de *Salmonella* spp. Las características de las muestras libres de ambos microorganismos son: carne de pollo entero crudo embolsado, refrigerado, con etiqueta de la industria con sello de certificación ISO 22000.

Los resultados de Especificidad, Sensibilidad, Inclusividad y Exclusividad para el método analítico ISO 10272-1:2017 y NB/ISO 6579 es del 100% y se determinó como Límite de Detección 3 UFC/25 g en carne cruda de pollo para los métodos analíticos.

Los resultados de Especificidad y Sensibilidad hallados en la investigación son mayores a los declarados por la Norma ISO 10272-1:2017 Especificidad 99% y Sensibilidad de 64 a 92 %, (matriz piel de pollo crudo). La Norma ISO 6579:2008 declara Especificidad 100% y Sensibilidad del 98 al 100%, los valores hallados en la investigación son parecidos. Determinando que el método verificado detecta las cepas verdaderamente positivas y excluye las verdaderamente negativas.

Para métodos cualitativos, según European Union Reference Laboratory for monitoring bacteriological and viral contamination of bivalve molluscs (2017) y la ISO 16140-3, el límite de detección (LD) teórico a ser verificado es 3 UFC /25 g (distribución de Poisson) para una probabilidad de 95% de detectar el analito en la alícuota analizada, utilizado para métodos que no tienen declarado el LD. En nuestro trabajo de investigación para la determinación del LD en matriz de carne cruda pollo, se utilizó la cepa de *Campylobacter jejuni* (ATCC 33291) y *Salmonella* Typhimurium (ATCC 13311),

inoculando con 3 UFC de cada uno de los microorganismos mencionados, en las 30 alícuotas de 25 gramos de pollo crudo. Los resultados muestran un 100% de recuperación de los analitos, demostrando de esta manera la capacidad que tienen el laboratorio en la implementación del método.

En un trabajo realizado en los Países Bajo de Europa por Biesta y colaboradores (2018), “Validación por ensayos interlaboratorios de EN ISO 10272 - Microbiología de la cadena alimentaria - Método horizontal para la detección y enumeración de *Campylobacter* spp. - Parte 1. Donde trabajaron con 17 laboratorios, aplicando la norma que consta de tres procedimientos diferentes (A, B y C) de acuerdo a la concentración de la microbiota acompañante, en éste estudio se investigó tres matrices. Para piel de pollo determinaron 14 UFC/porción de prueba en piel de pollo: Los resultados de esta validación se incorporaron en la Norma ISO 10272-1. (Peters, Jongenburger., de, & Jacobs Reitsma, 2018)

Para el indicador Inclusividad, sin utilizar matriz, los resultados hallados en la presente investigación (como se observa en la Tabla 14), se logró recuperar el 100 % de las cepas de *Campylobacter*, se trabajó con 27 cepas nativas y 3 cepas ATCC. En esta etapa se evidencia el desarrollo de las cepas nativas aisladas en el laboratorio de Microbiología de alimentos del Instituto SELADIS. Además, que algunas cepas nativas de *Campylobacter* spp, 10 muestras de las 27, se recuperaron en 24 h en el medio mCCDA, recuperando el 100% a los 48 h. Mientras tanto las cepas ATCC de *C. jejuni* y *C. coli* se recuperaron a las 48 h. Para *Salmonella* se trabajó con 28 cepas nativas y 2 repeticiones de cepa ATCC 13311, (como se observa en la Tabla 20), se recuperó el 100 % de las cepas, confirmadas

con pruebas bioquímicas. De acuerdo a los métodos evaluados es posible recuperar todos los analitos de interés prioritarios en nuestro medio, los cuales son normalmente recuperados por el método de referencia.

El desempeño selectivo del método ISO 10272-1:2017, Exclusividad, en relación a los interferentes comunes que acompañan a la matriz de carne de cruda de pollo, el método inhibe el 100% de los interferentes comunes.

Exclusividad del método NB/ISO 6579:2018 de acuerdo a los características culturales y pruebas bioquímicas inhibe el 100% de los interferentes, cabe aclarar que por este método (como se observa Tabla 21), se recuperaron la mayoría de las cepas interferentes, 7 de 10 con el caldo de enriquecimiento RVS en agar XLD. Mientras tanto que con caldo de enriquecimiento MKTTn en agar XLD y BS sólo se recuperan 3 de 10 cepas interferentes, todos con características culturales y pruebas bioquímicas diferentes a la cepa *Salmonella*.

En la evaluación de las características macroscópicas de las colonias de *Campylobacter* cepas nativas y ATCC son iguales, la única diferencia es el desarrollo abundante de cepas nativas y el desarrollo frecuente de las cepas ATCC del microorganismo en estudio. No teniendo ninguna relación, la cantidad de colonias desarrollados con la cantidad de inóculo fortificado en el medio de enriquecimiento Preston. En relación a *Salmonella* cepas nativas y ATCC son iguales en sus características culturales y pruebas bioquímicas.

Para la determinación de *Campylobacter* y *Salmonella* en puntos de venta de la ciudad de La Paz, se analizaron 108 muestras de pollo entero crudo. Se analizaron los dos analitos

al mismo tiempo y en la misma muestra, aplicando los métodos verificados ISO 10272-1:2017 y la NB/ISO 6579:2008. Se aisló *Campylobacter* spp. en un 80 %, (86 pollos crudos de los 108 muestreados). En la identificación del microorganismo por pruebas bioquímicas se evidenció que 93% de los pollos crudos presentaban *C. jejuni* y 7% *C. coli*. Se aisló *Salmonella* spp. en un 69%, (74 pollos crudos de los 108 muestreados).

En la Figura 13, se observa la contaminación mixta por ambos microorganismos en un 57%, en una misma muestra de carne de pollo crudo, lo cual aumenta el riesgo de tener enfermedades de tipo alimentario. El consumo de pollo en nuestro país, específicamente en la ciudad de La Paz es alto, lo cual es un factor importante a tomar en cuenta en la epidemiología.

Los resultados en nuestra investigación dan porcentajes altos, de la detección de *Campylobacter* y *Salmonella*, éstos resultados concuerdan con otros países, es así que el año 2016 publican resultados de “Presencia de *Campylobacter* y *Salmonella* en pollo a la venta en Gómez Palacio Durango, México”, trabajaron con 76 muestras de carne de pollo, aislaron *Campylobacter* spp en el 89% de las muestras analizadas y *Salmonella* en el 63%. (Rodríguez, Gómez, & Vázquez, 2016).

En Chile el año 2017 se publica un trabajo de investigación “Caracterización de cepas de *Campylobacter jejuni* obtenidas desde carne de pollo y heces de aves de corral de la zona central de Chile”, sus resultados muestran que el 63,3 % de presencia de *C. jejuni* en carne pollo y 20% en heces. (S. Gutiérrez, 2017). El año 2014 en Ecuador se publicó “Aislamiento de *Campylobacter* spp. que se obtuvo en contenido cecal de 6 industrias avícolas” dando como resultado 71,8% positivos (Vivanco, 2014). El año 2020 se

analizaron 120 muestras de piel de pollo provenientes de tres mercados de los distritos de San Martín de Porres (n = 30), Santa Anita (n = 20) e Independencia (n = 70), ubicados en la Provincia de Lima, Perú, realizaron el análisis microbiológico de las muestras según norma ISO 10272-1:2017. dando como resultado el aislamiento de *Campylobacter* spp. en un 97,5% que corresponde a 117 muestras (Anampa D, 2020).

En la región del sur de Brasil el año 2008 publican un artículo “Occurrence and Characterization of *Campylobacter* in the Brazilian Production and Processing of Broilers”, donde muestran resultados de aislamiento de *Campylobacter* en el 81,8%.de pollos de engorde (Kuana SL, 2008).

Desde el año 2008 ya se reporta que la salmonelosis (*Salmonella enterica* serotipo Enteritidis y Typhimurium) y la campilobacteriosis (*Campylobacter jejuni*) son las zoonosis de mayor prevalencia en países desarrollados, debido a la contaminación de alimentos de origen animal, principalmente productos avícolas. (Gutiérrez Castillo, 2008).

El informe de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades muestra resultados del seguimiento de las zoonosis en 36 países europeos durante el año 2018, mencionan que campilobacteriosis en primer lugar y samonelosis en segundo lugar son las zoonosis más comúnmente reportadas en humanos y *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) fue la tercera zoonosis notificada con mayor frecuencia en la Unión Europea. (EFSA and ECDC, 2019).

Esta información obtenida en varios países de Sud América y Europa, sustenta los resultados obtenidos en nuestra investigación, observando una presencia de

*Campylobacter* spp del 80% y *Salmonella* 69% en carne cruda de pollo muestreados en diferentes puntos de expendio de la ciudad de La Paz.

La vigilancia de *Salmonella* y *Campylobacter* en todas las etapas de la cadena alimentaria, desde la producción primaria hasta el consumidor, debe constituir un elemento importante en la investigación de la epidemiología. En Bolivia se realiza control y erradicación de Salmonelosis aviar en la etapa productiva, entidad encargada del control es el Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria e Inocuidad Alimentaria (SENASAG), según el Reglamento general de sanidad animal en su artículo 5.6.5. menciona: se debe realizar pruebas de control (bacteriológico y serológico) en planteles de pollos de engorde de forma obligatoria para el control y erradicación de la salmonella aviar, que está incluido la de interés zoonótico, la Paratífosis (*Salmonella* Enteritidis y Typhymurium), también realizan el control en mataderos. (Reglamento General de Sanidad Animal, 2021 Marzo). Lamentablemente para *Campylobacter*, no se tienen una normativa de control en nuestro país, a pesar del incremento de infecciones alimenticias por este microorganismo a nivel mundial.

La Organización Mundial de Salud menciona que *Campylobacter* y *Salmonella* no tifoídica están incluidas dentro de las cuatro principales causas de enfermedades diarreicas, siendo los más afectados los niños menos de 5 años que representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria. (OMS, 2015).

Colombia publicó en el mes de marzo del 2021, “Evaluación cualitativa de riesgos en una cadena productiva de pollo”, donde determinan que el lugar donde se contamina con mayor frecuencia la carne de pollo con *Campylobacter*, por ser comensal del tubo

digestivo de las aves, es en el momento del sacrificio en la etapa de evisceración (A.P. Huertas, 2021). *Salmonella* de origen no tifoidea también es un comensal del tracto digestivo de las aves.

Actualmente la Organización Mundial de la Salud menciona que la *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis y *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium, son los dos serotipos más importantes de *Salmonella* transmitida de animales a seres humanos en la mayor parte del mundo. (OMS, 2018). *Campylobacter* están en animales de sangre caliente que generalmente no causa enfermedad en los animales y son prevalentes en animales destinados al consumo humano, como aves de corral. (OMS, 2020).

Por los resultados hallados en nuestra investigación es importante dar a conocer a los consumidores, las medidas de higiene indispensable al momento de cocinar la carne de pollo, con el fin de evitar la contaminación cruzada con alimentos que se consumen crudos y la importancia de una buena cocción de la carne de pollo.

Para el análisis estadístico se tomó como *Campylobacter* spp, debido a que *C. coli* solo se encontró en 6 muestras de carne cruda de pollo. Además, en el análisis microbiológico no se encontró en una misma muestra ambos microorganismos.

En la investigación se evidencio la presencia de *C. jejuni* en todos los macrodistritos, como se observa en la Figura 14, con mayor porcentaje en el macrodistrito Cotahuma con el 88,9%. *C. coli* no se encontró en los macrodistritos Cotahuma y Zona Sur, los porcentajes de éste microorganismos son bajos.

Al evaluar la frecuencia de la presencia de *Campylobacter* spp y *Salmonella* spp por Macrodistrito, los resultados de la prueba de Chi Cuadrado son  $\chi^2 (5) = 4.57$ ;  $p > 0,05$

(Tabla 26) y  $\chi^2 (5) = 3.43$ ;  $p > 0,05$  (Tabla 28) respectivamente, el valor de significancia es mayor, por lo mencionado, las diferencias de frecuencia de los microorganismos por Macrodistrito es estadísticamente no significativo, por lo tanto, aceptamos la hipótesis de nulidad ( $H_0$ ), demostrando que la variable macrodistrito es independiente de la variable frecuencia de *Campylobacter* spp y *Salmonella* spp. en carne cruda de pollo, a un nivel del 95% de confiabilidad.

Los 6 macrodistritos de la ciudad de La Paz que se consideró para el trabajo de investigación se detectó *Campylobacter* spp. con porcentajes altos en todos los macrodistrito. Los macrodistritos que mayor porcentaje de *Campylobacter* spp. en carne cruda de pollo son Cotahuma y Max Paredes que corresponde a 16 muestras de carne cruda pollo (89%) de 18, por macrodistrito mencionado. Los dos Macrodistritos tienen una alta densidad de población, y tienen los mercados populares más grandes de la ciudad de La Paz.

Comparando entre los macrodistritos la diferencia de Frecuencia de la presencia de *Salmonella* spp., estadísticamente no es significativo ( $p > 0,05$ ), pero hay una diferencia numérica, donde se observa que existe un mayor porcentaje de presencia de *Salmonella* spp en dos macrodistritos San Antonio y Zona Central (83%).

Por tipo de mercado, (se observa en la Figura 17) la presencia de *C. jejuni* se encuentra en mayor porcentaje en mercados populares y *C. coli* se encuentran presentes en ambos mercados con porcentajes casi similares.

Al análisis estadístico de la frecuencia de presencia de *Campylobacter*, se observa en la Tabla 29 y 30 que los resultados son diferentes por tipo de mercado. Los resultados de



la prueba de Chi Cuadrado son;  $\chi^2 (1) = 14,79$ ,  $p < 0,05$ . por lo tanto, aceptamos la hipótesis de alterna ( $H_a$ ), demostrando que la variable tipo de mercado es dependiente de la variable presencia de *Campylobacter*, a un nivel del 95% de confiabilidad.

En la comparación de porcentajes, se observa presencia de *Campylobacter* en un 86% en los mercados populares y 47% en supermercados (Figura 18), a la observación in situ, se evidencia la diferencia en la forma de organización en relación a la higiene de espacios y en la manipulación, los supermercados solo tienen a la venta pollo embolsado entero y tienen espacios exclusivos de pollo y marca, en los mercados populares se tienen mezclados las marcas de pollo, no están embolsados y la mayoría manipula con las manos sin guantes, además utilizan en mismo cuchillo para dividir las piezas de pollo, todas las menudencias están mezcladas en un mismo lugar sin importar la marca de pollo.

En *Salmonella* por tipo de mercado los resultados estadísticos de la prueba de Chi cuadrado son:  $\chi^2 (1) = 1.21$ ;  $p > 0,05$  por lo tanto, aceptamos la hipótesis de nulidad ( $H_0$ ), demostrando que la variable tipo de mercado es independiente de la variable presencia de *Salmonella* spp. en carne de pollo, a un nivel del 95% de confiabilidad. En relación a los porcentajes de la presencia de *Salmonella* por tipo de mercado presentan porcentajes altos en ambos tipos de mercado, donde los mercados populares presentan mayor porcentaje de *Salmonella* spp (77%), se atribuye esta diferencia a las mismas causas descritas para *Campylobacter* en el párrafo anterior.

Por tipo de venta en el momento del muestreo, se observa que *C. jejuni* y *C. coli* se encuentra en mayor porcentaje en pollos que se expenden sin refrigerar al momento de la venta.

La frecuencia de la presencia de *Campylobacter* por tipo de expendio es diferente, la prueba de Chi cuadrado es  $\chi^2 (1) = 7,15$   $p < 0,05$ . Por lo tanto, aceptamos la hipótesis de alterna ( $H_a$ ), demostrando que la variable tipo de expendio al momento de muestreo de carne de pollo es dependiente de la variable presencia de *Campylobacter*, a un nivel del 95% de confiabilidad. En la figura 21 se observa 90% de presencia del microorganismo en cuando la carne no se encuentra refrigerado y 70% de presencia cuando la carne de pollo esta refrigerado. Para la conservación de la carne de pollo se debe mantener la cadena de frio menor a 7°C, según la OMS y la FAO solo se debe tener a medio ambiente 30 minutos como máximo, incluso recomiendan que lo último que se debería comprar en el mercado son las carnes, todo con el fin de evitar la multiplicación de los microorganismos, en los mercados populares donde hay una mayor concurrencia de consumidores se observa que la carne de pollos se venden en mesones y se hallan expuestos por varias hora a temperatura ambiente, los cambios de temperatura reduce la vida útil del producto (FAO, 2008). Conservación por refrigeración es un método para la conservación de alimentos que consiste en enfriarlos a 4-6 °C con fin de reducir la actividad bacteriana.

Se observa la frecuencia de la presencia de *Salmonella* spp. son altos por tipo de expendio, los resultados de Chi cuadrado son  $\chi^2 (1) = 1,95$ ;  $p > 0,05$  por lo tanto, aceptamos la hipótesis de nulidad ( $H_0$ ), demostrando que la variable tipo de expendio es independiente de la variable presencia de *Salmonella* spp. en carne de pollo, a un nivel del 95% de confiabilidad. Los porcentajes de presencia por tipo de expendio pollo no

refrigerado es 75%. Las salmonellas se puede inhibir su desarrollo a temperatura menor a 7°C

En relación a la procedencia avícola se observa que *C. jejuni* está presente en las 4 marcas que ingresaron a la investigación, *C. coli* no se encontró en la marca B, que es de pequeños productores del sector de los yungas.

Los resultados estadísticos de la frecuencia de la presencia de *Campylobacter* es diferente por procedencia avícola, el resultado de Chi cuadrado es;  $\chi^2 (3) = 23,17$ ;  $p < 0,05$  (Tabla 38), por lo tanto, aceptamos la hipótesis de alterna ( $H_a$ ), demostrando que la variable marca de carne pollo es dependiente de la variable presencia de *Campylobacter* spp., a un nivel del 95% de confiabilidad.

En la evaluación de los porcentajes de la presencia de *Campylobacter* se observa que la marca C es la que menor porcentaje del microorganismo presenta. En relación a *Salmonella* spp., todas las marcas presentan el microorganismo, y también la Marca C tiene menor porcentaje, se debe a que esta industria avícola cuenta con las nomas. 90001 y 22000, los pollos son expandidos embolsados y sólo para supermercados.

### 13 CONCLUSIONES

Se aisló *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Salmonella* spp. en carne cruda de pollo, con métodos normalizados y verificados en laboratorio, evidenciando la presencia de *C. jejuni* y *Salmonella* spp. con porcentajes altos en puntos de expendio de la ciudad de la Paz. *C. coli* sólo se aisló en 6 muestras.

Se verificó en laboratorio de Microbiología de alimentos del instituto de SELADIS, los métodos analíticos: ISO 10272-1: 2017-Método horizontal para la detección de *Campylobacter* spp y NB/ISO 6579: 2008 - Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp., en carne cruda de pollo mediante el análisis de límite de detección, Inclusividad, Exclusividad Sensibilidad y Especificidad, demostrando que los métodos empleados son confiables y aplicables en las condiciones actuales del laboratorio.

El alto porcentaje de aislamiento de *Campylobacter* spp. (80%) y *Salmonella* spp. (69 %) en pollos, son datos que presentan un riesgo alto a la salud humana. La mayoría de los pollos muestreados incumplen con la normativa NB 310013 en relación a *Salmonella* spp., En la producción avícola es de cumplimiento obligatorio el control y erradicación de *Salmonella* spp., la entidad encargada de dar cumplimiento es el SENASAG, por lo cual se concluye que los puntos de contaminación se podrían atribuir al matadero, transporte y puntos de venta de carne cruda de pollo.

Para *Campylobacter* no se cuenta con normativa en nuestro país, el aislamiento alto del microorganismo, mayor que *Salmonella* spp., se le atribuye a la falta de control desde la producción primaria hasta el punto de venta.

En la evaluación de la frecuencia *Campylobacter* spp. en carne de pollo por tipo de mercado, tipo de expendio y marca de carne cruda de pollo, se realizó la prueba de Chi cuadrado observando que existe una diferencia estadística significativa ( $p < 0,05$ ), por lo tanto, se acepta la hipótesis alterna donde los factores están relacionados con la frecuencia de la presencia del microorganismo. En relación al análisis estadístico para *Salmonella* spp. no existe una diferencia estadística significativa ( $p > 0,05$ ) y se acepta la hipótesis nula donde los factores de estudio no están relacionados con la frecuencia de la presencia del microorganismo, debido a que los porcentajes de presencia son altos en todos los factores de estudio.

## 14 RECOMENDACIONES

Se requiere realizar estudios complementarios sobre la presencia de *C. coli* y *C. jejuni* desde la producción primaria hasta el punto de venta, con el fin de evaluar el riesgo que estas bacterias pueden representar en la salud pública y del mismo modo por *Salmonella* spp.

Investigar sobre resistencia antimicrobiana de ambos microorganismos en las cepas aisladas en estudios en granja y en carne de pollo, para obtener información y establecer el uso adecuado de antibióticos tanto en animales como en seres humanos.

Identificar la variabilidad genética de las cepas de *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., que se encuentran en nuestro medio, para tener un manejo epidemiológico acorde a nuestra realidad.

## 15 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Álvarez, M., Buesa, J., Castillo, J., & Vila, J. (2008). *Seimec*. (E. C. Cantón, Ed.)

Recuperado el 15 de noviembre de 2019, de Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales:

<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia30.pdf>

Anampa D, B. C. (2020). Detección del gen ermB asociado a la resistencia a macrólidos en cepas de *Campylobacter* aisladas de pollos comercializados en Lima, Perú.

*Rev Panam Salud Publica*, 44(6). Obtenido de Rev Panam Salud Publica:

<https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52326/v44e602020.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Asociación Española de Normalización AENOR. (5 de Mayo de 2017). *RESUMEN*

*VALIDACIÓN UNE-EN ISO 16140*. Obtenido de

[https://www.aenor.com/laboratoriodocumentos/QFAST%20SALMONELLA%20EASY/RESUMEN%20INFORME%20M%C3%89TODO%20ALTERNATIVO%20EASY%20QFAST%20\(08-05-17\)-%20rev%203.pdf](https://www.aenor.com/laboratoriodocumentos/QFAST%20SALMONELLA%20EASY/RESUMEN%20INFORME%20M%C3%89TODO%20ALTERNATIVO%20EASY%20QFAST%20(08-05-17)-%20rev%203.pdf)

Avicultores, A. N. (2022). Estadísticas del sector. Santa Cruz, Bolivia. Obtenido de

<http://www.adasz.com.bo/publicaciones/estadisticas-del-sector>

Berradre, B., Yáñez, J., García, L., Melero, B., Rovira, J., Carramiñana, I., . . .

Fernandez, S. (30 de marzo de 2017). Epidemiología de la *Campylobacteriosis* en Castilla y León durante el periodo de 2008-2015. *Revista Española Salud*

*Pública*, 91, 1-12. Recuperado el 18 de julio de 2019, de

[http://www.msrebs.gob.es/biblioPublic/publicaciones/recursos\\_propios/revista\\_cdrom/VOL91/ORIGINALES/RS91C\\_201703030.pdf](http://www.msrebs.gob.es/biblioPublic/publicaciones/recursos_propios/resp/revista_cdrom/VOL91/ORIGINALES/RS91C_201703030.pdf)

Betancor, L., & Yim, L. (septiembre de 2012). Salmonella y salmonelosis.

*Departamento de Bacteriología y Virología, Departamento de Desarrollo*

*Biocnol3gico*. Recuperado el 5 de noviembre de 2019, de

<http://higiene1.higiene.edu.uy/DByV/Salmonella>

Brooks, G. F. (2016). *Microbiologia Medica de Jawetz, Melnick y Adelberg* (27 ed.).

M3xico: M Graw Hill Education LANGE.

Camar3, M. L., Mart3nez, R., Olmos, P., Catal3, V., Ocete, M. D., & Gimeno, C. (10 de

11 de 2015). Validaci3n y verificaci3n anal3tica de los m3todos microbiol3gicos.

*Enfermedades Infecciosas y Microbiolog3a Cl3nica*, 33(7), e31-e36.

Chinillach, M. C. (2017). Prevalencia de Salmonella spp. y Campylobacter spp. a lo largo

de la cadena de sacrificio de porcino en mataderos de la Comunidad Valenciana.

*Tesis doctoral*. Universidad Cardenal Herrera - CEU, Valencia, Espa1a.

Recuperado el 12 de Diciembre de 2019, de

[https://repositorioinstitucional.ceu.es/bitstream/10637/8579/1/Prevalencia%20de%20Salmonella%20spp.%20y%20Campylobacter%20spp.%20a%20lo%20largo%20d%20ela%20cadena%20de%20sacrificio%20de%20porcino%20en%20mataderos%20de%20la%20Comunidad%20Valenciana\\_Tesis\\_M](https://repositorioinstitucional.ceu.es/bitstream/10637/8579/1/Prevalencia%20de%20Salmonella%20spp.%20y%20Campylobacter%20spp.%20a%20lo%20largo%20d%20ela%20cadena%20de%20sacrificio%20de%20porcino%20en%20mataderos%20de%20la%20Comunidad%20Valenciana_Tesis_M)

Di Pillo, F., & Sotomayor, G. (, de , de 2017). *Campylobacter spp. en carne de aves de*

*corral, Chile*. Recuperado el 24 de marzo de 2019, de Agencia Chilena para la

Inocuidad y Calidad Alimentaria, ACHIPIA: <https://www.achipia.gob.cl/wp->



content/uploads/2018/05/Perfil-de-Riesgo-Campylobacter-spp-en-carnes-de-aves-de-corral-v1-2017.pdf

*El Mundo*. (5 de mayo de 2018). Recuperado el 10 de enero de 2019, de El consumo per cápite de pollo es 43 kilogramos:

<http://elmundo.com.bo/web2/index.php/noticias/index?id=el-consumo-per-capita-de-pollo-es-43-kilogramos>

Entidad Nacional de Acreditación ENAC NT 32. (2010). *Análisis microbiológico: Documento de Aclaración*. España.

Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. (2016). *Guía Eurochen*. Recuperado el 8 de noviembre de 2019, de La adecuación al uso de los métodos analíticos - Una guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados:

[https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV\\_guide\\_2nd\\_ed\\_ES.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf)

European Food Safety Authority (EFSA). (13 de Octubre de 2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, 13(1), 1-165. Recuperado el 20 de marzo de 2019, de

<https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/EU-summary-report-trends-sources-zoonoses-2013.pdf>

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). (2019). The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA JOURNAL*, 17(12). doi:10.2903/j.efsa.2019.5926

- European Union Reference Laboratory for monitoring bacteriological and viral contamination of bivalve molluscs(CEFAS). (25 de septiembre de 2017). *Use of proprietary Salmonella detection kits for detection and identification of Salmonella spp. in bivalve molluscs, live echinoderms, gastropods and tunicates*. Recuperado el 16 de mayo de 2020, de <https://www.cefass.co.uk/media/rejpdrr0/c-users-ab19-documents-coe-seafood-safety-guidance-on-the-use-of-proprietary-salmonella-detection-kits-for-detection-and-identification-of-salmonella-spp.pdf>
- FAO. (2008). Salud de las aves de corral y control de enfermedades en los países en desarrollo; Mercadeo. En V. d. v, *Revisión del desarrollo avícola* (págs. 17 - 19). FAO.
- Gonzales, J., Pereira, N., Soto, Z., Hernández , E., & Villarreal, J. (2014). Aislamiento microbiológico de Salmonella spp. y herramientas moleculares para su detección. *Salud Uninorte*, 30(1), 73-94.
- Grimont, P., & Weill, F.-X. (2007). Antigenic formulae of the Salmonella serovars. *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur, Paris, France*; 9. Paris. Recuperado el 5 de enero de 2020, de <http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s>
- Gutiérrez Castillo, A. &. (2008). Salmonelosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo. *Veterinaria Mexio*, 39(1), 81-91. Recuperado el 20 de febrero de 2019, de Veterinaria Mexico: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42339107>

- Gutierrez, M. d. (13 de Septiembre de 2019). Bolivia destaca por su alto consumo de pollo: ¡Avicultores trabajan para esto! *aviNews*, . Recuperado el 18 de enero de 2020, de <https://avicultura.info/bolivia-destaca-por-su-alto-consumo-pollo/>
- Hernández, C., Aguilera, M., & Castro, G. (otubre de 2013). Campylobacter jejuni: ¿una bacteria olvidada? Situación en México. *Medigraphic Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 33(2), 77-84. Recuperado el 5 de junio de 2019, de <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2013/ei132f.pdf>
- I. World Health Organization. (3 de diciembre de 2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden. (WHO, Ed.) *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*, 1-225. Recuperado el 15 de enero de 2020, de [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165\\_eng.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1)
- International Organization for Standardization ISO 16140. (2003). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods*.
- SENASAG; Servicio Departamental de Sanidad Animal e Inocuidad Alimentaria. (2021 Marzo). *Reglamento General de Sanidad Animal*. Ministerio de Desarrollo Rural y Tierras, Estado Plurinacional de Bolivia.
- Servicio Departamental de Sanidad Animal e inocuidad Alimentaria. (2021 Marzo). *Reglamento General de Sanidad Animal*. Ministerio de Desarrollo Rural y Tierras, Estado Plurinacional de Bolivia.

(s.f.).[UNIVERSIDAD PILOTO DE COLOMBIA - SECCIONAL ALTO

MAGDALENA\_\_ :Ñ[.

A.P. Huertas, G. T. (24 de Abril de 2021). Evaluación cualitativa de riesgos en una cadena productiva de pollo. *Alimentos Hoy Revista de la Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 29(53). Recuperado el 12 de Mayo de 2021, de [https://acta.org.co/acta\\_sites/alimentos hoy/index.php/hoy/article/viewFile/591/453](https://acta.org.co/acta_sites/alimentos hoy/index.php/hoy/article/viewFile/591/453)

Instituto Boliviano de Metrología (IBMETRO) Dirección Técnica de Acreditación

DTA-CRI-016 V2. (21 de Diciembre de 2012). *Verificación y Validación de métodos.*

Instituto Boliviano de Metrología (IBMETRO) Dirección Técnica de Acreditación

DTA-CRI-017 V2. (18 de Diciembre de 2012). *Acreditación de laboratorios que realizan ensayos microbiológicos.*

International Standard ISO 10272-1. (2017). *Microbiology of the food chain -Horizontal method detection and enumeration of Campylobacter spp. Part 1: Detection method* (Second edition ed.). Geneva.

International Standard ISO:6579-1. (Febrero de 2017). *Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella - Parte1: Detection of Samonella spp* (First ed.). Switzerland.

Klotz, B., Vega, G., Mantilla, J., Ramirez, R., & Romero, L. (2 de julio de 2013). *Perfil de riesgos Campylobacter spp en pollos de engorde Documentos.* Recuperado el 14 de febrero de 2019, de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los

Alimentos:

<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Perfil-campylobacter-en-pollos.pdf>

Kuana SL, S. A. (2008). Occurrence and characterization of *Campylobacter* in the Brazilian production and processing of broilers. *Avian diseases*, 54(4), 680-684.

Obtenido de <https://doi.org/10.1637/8296-032608-Reg.1>

Lapierre, L. (20 de julio de 2013). *Factores de Virulencia asociados a especies zoonotica de Campylobacter spp.* doi:10.5354/0719-5273.2013.27866

List of prokaryotic names with standing in nomenclature. (2018). *LPSN bacterio.net*.

doi:doi: 10.1099 / ijsem.0.002786

Marin, C. B. (1 de Jan de 2011). *Sources of Salmonella contamination during broiler production in Easten Spain.* doi:10.1016/j.prevetmed.2010.09.006

Murray, P. R. (2014). *Microbiologia Medica* (7.<sup>a</sup> edición ed.). Madrid: Elsevier.

Norma boliviana NB/ISO 6579. (2008). *Microbiologia de alimentos para consumo humano y alimentación animal - método horizontal para la detección de Salmonella spp.* La Paz.

Norma Internacional ISO 9000. (2005). *Sistemas de gestión de calidad-Fundamentos y vocabulario.* España: ISO copyright office.

Norma ISO 22000 Sistemas de Gestión de Inocuidad Alimentaria . (2015). *ISOTools Excellence.* Obtenido de Calidad y excelencia:

<https://www.isotools.org/2015/06/15/resumen-de-la-norma-iso-22000-principales-caracteristicas/>

- OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. (2018). Prevención, Detección y Control de las Infecciones de Aves de Corral por Salmonella. En *OIE - Código Sanitario para los Animales Terrestres* (octava ed., págs. 1-6). OIE. Recuperado el 12 de Diciembre de 2019, de [https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahc/current/chapitre\\_prevent\\_salmonella.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/current/chapitre_prevent_salmonella.pdf)
- OMS. (3 de Diciembre de 2015). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria: <https://www.who.int/es/news/item/03-12-2015-who-s-first-ever-global-estimates-of-foodborne-diseases-find-children-under-5-account-for-almost-one-third-of-deaths>
- OMS. (20 de Febrero de 2018). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de Salmonella (no tifoidea): [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
- OMS. (1 de Mayo de 2020). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de Campylobacter: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>
- Opinion Diario de circulación Nacional. (8 de agosto de 2019). Opinión Diario. *Avicultores dicen que consumo de carne de pollo llega a 43 kilos por persona al año*. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia .

Organismo Argentino de Acreditacion (OAA). (26 de junio de 2013). Buenos Aires, Argentina. Recuperado el 1 de abril de 2018, de <http://www.oaa.org.ar/docs/GUI-LE-05%20v1.pdf>

Organizacion de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (, de , de 2009). Evaluación de riesgos de *Campylobacter* spp. *Serie de evaluación de riesgos microbiologicos 11.* ., Roma, Italia. Recuperado el 25 de octubre de 2019, de [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44319/9789241547352\\_spa.pdf;jsessionid=5F8E6FD0B1D3B063F169D3EC9ECFBE?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44319/9789241547352_spa.pdf;jsessionid=5F8E6FD0B1D3B063F169D3EC9ECFBE?sequence=1)

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (2005). “Desarrollo de un sistema integral de aseguramiento de calidad para laboratorios de. *proyecto TCR/RLA/3013 (A)* (págs. 1-98). Lima: FAO - Fiat Panis. Recuperado el 21 de febrero de 2018, de [http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP\\_FaoRlc/old/prior/comagric/codex/rla3013/pdf/inf10.pdf](http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/comagric/codex/rla3013/pdf/inf10.pdf)

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (7 de Octubre de 2005). Aseguramiento de Calidad y Validación de la Metodología para Labaoratorios de Microbiología de Alimentos. Lima, Lima, Perú. Recuperado el 14 de Marzo de 2018, de [http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP\\_FaoRlc/old/prior/comagric/codex/rla3013/pdf/inf10.pdf](http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/comagric/codex/rla3013/pdf/inf10.pdf)

- Organizacion Mundial de la Salud [OMS]. (23 de enero de 2018). *Campylobacter, datos y cifras*. Recuperado el 8 de noviembre de 2019, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>
- Organizacion mundial de la Salud animal OIE. (2012). *Manual Acuatico de la OIE*. Recuperado el 8 de mayo de 2018, de Principios y métodos de validación de pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas: [https://www.oie.int/esp/normes/fmanual/1.1.02\\_VALIDATION.pdf](https://www.oie.int/esp/normes/fmanual/1.1.02_VALIDATION.pdf)
- Peters, B., Jongenburger., de, B. E., & Jacobs Reitsma, W. (19 de Julio de 2018). Validation by interlaboratory trials of EN ISO 10272 - Microbiology of the food chain - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 1: Detection method. *ScienzeDirector*, 288, 39-46. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.007>
- Procop, G. e. (2017). *Koneman Diagnostico microbiologico: Texto y Atlas*. Buenos Aires: Wolters Kluwer.
- Robles, D. A. (2017). Determinación de la Presencia de *Salmonella* spp en carne de pollo comercializado en ferias libres del cantón Loja. *Tesis de grado*. Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, Loja, Ecuador. Recuperado el 12 de Septiembre de 2019, de <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/18517>
- Rodriguez V, G. L. (22 de julio de 2015). *Campylobacter* spp. en productos aviares y su impacto en salud pública. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 10(2(2015)), 203-213. Recuperado el 27 de julio de 2019, de Revista CES



Medicina Veterinaria y Zootecnia:

<http://revistas.ces.edu.co/index.php/mvz/article/view/3653>

- Rodríguez, R., Gómez, F., & Vázquez, H. (2016). Presencia de *Campylobacter* y *Salmonella* en pollo a la venta. *REDVET*, 17(6). Recuperado el 18 de julio de 2019, de <https://www.redalyc.org/pdf/636/63646808001.pdf>
- Ruiz, M. J., Ramallo, G., Colello, R., Villalobo, C., Etheverría, A., & Padola, N. (2 de Diciembre de 2018). Diferentes métodos para aislamiento y detección de *Salmonella* spp en canales porcinas. *Rev. Colomb. Biotecnol*, 20(2), 117- 123. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.71680
- Sánchez, M. M., & Cardona, N. M. (2003). Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Asociación Colombiana de Infectología*, 7(1), 22-29.
- Sanderson, K. E., & Nair, S. (2013). *Salmonella* in domestic animals. *Taxonomy and species concepts in the Genus Salmonella*, 2, 1-7. (P. A. Methner, Ed.) Boston, USA. Recuperado el 10 de Enero de 2020, de <https://pdfs.semanticscholar.org/8250/76323eefa33a2b405a5c949ceca2b9afa80e.pdf>
- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P., & Teixeira, P. (2011). *Campylobacter* spp as a foodborne pathogen. a review. *Front Microbiol*, 2(200), 1-12.
- Sindy Gutiérrez, D. O. (2017). Caracterización de cepas de *Campylobacter jejuni* obtenidas desde carne de pollo y heces de aves de corral de la zona central de

Chile. *Rev Med Chile*, 145, 1551-1558. Recuperado el 2021, de

<https://scielo.conicyt.cl/pdf/rmc/v145n12/0034-9887-rmc-145-12-1551.pdf>

Solis, L. (2011). PREVALENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

DE *Campylobacter jejuni* y *C. coli* Aislados de Alimentos Mediante el

Desarrollo de un Método todo Rápido. *Tesis doctoral*. UNIVERSIDAD

AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN, Mexico. Obtenido de

<http://eprints.uanl.mx/2843/1/1080211184.pdf>

Stanchi, N. O. (2007). *Microbiología Veterinaria*. Buenos Aires: Inter Medica.

Vivanco, 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 Pichincha [Tesis licenciatura, Universidad Central*

*del Ecuador]*. Repositorio Institucional. Obtenido de

<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6610/1/T-UCE-0014-008.pdf>

Zumbado, L., Arévalo, A., Donado, M., & Romero, J. (30 de junio de 2014).

Diagnóstico Molecular de *Campylobacter* en la Cadena Avícola Destinada para

Consumo Humano en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 25(2), 357-363.

Recuperado el 4 de enero de 2020, de

<https://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v25n2/a13v25n2.pdf>

# **ANEXOS**

**ANEXO 1**

**HOJA DE REGISTRO DE MUESTREO**

<b>MACRODISTRITO:</b> .....		<b>CODIGO:</b> .....	
<b>Nombre del muestreador:</b> .....		<b>Firma del muestreador:</b> .....	
Fecha de muestreo: .....		Hora de muestreo: .....	
Nombre del Mercado popular .....		Nombre del Supermercado .....	
Refrigerado <input type="checkbox"/>	No refrigerado <input type="checkbox"/>	Refrigerado <input type="checkbox"/>	No refrigerado <input type="checkbox"/>
Marca de pollo .....		Marca de pollo .....	
Observaciones:.....			



### ANEXO 3

## FORMULARIO DE DATOS ANALITICOS SALMONELLA

SELADIS MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS		FORMULARIO REGISTRO DE DATOS ANALITICO DETECCION DE SALMONELLA				COD: FOR-MA-DA-0.17												
MACRODISTRITO:			Fecha de siembra: Fecha de lectura:			Analista:												
MUESTRA:		MUESTRA:		MUESTRA:		MUESTRA:		MUESTRA:										
LUGAR DE MUESTREO:		LUGAR DE MUESTREO:		LUGAR DE MUESTREO:		LUGAR DE MUESTREO:		LUGAR DE MUESTREO:										
HORA DE MUESTREO: CODIGO DE MUESTRA:		HORA DE MUESTREO: CODIGO DE MUESTRA:		HORA DE MUESTREO: CODIGO DE MUESTRA:		HORA DE MUESTREO: CODIGO DE MUESTRA:		HORA DE MUESTREO: CODIGO DE MUESTRA:										
CODIGO DE MUESTRA	ENR. SELECTIVO	MEDIO DIFERENCIAL	DESARROLLO DE COLONIAS CARACTERISTICAS	PRUEBAS BIOQUIMICAS												ANTISUERO	RESULTADO	
				TSI			LIA			SIM			RM/VP		UREA			CITRATO
	MKTT	XLD		K/A	GAS	H <sub>2</sub> S	K/A	GAS	H <sub>2</sub> S	S	I	M	RM	VP	UREA	CITRATO		
		BS																
	RPV	XLD																
		BAS																
	MKTT	XLD																
		BS																
	RPV	XLD																
		BAS																
	MKTT	XLD																
		BS																
	RPV	XLD																
		BAS																
	MKTT	XLD																
		BS																
	RPV	XLD																
		BAS																