

**VERIFICACIÓN DEL MÉTODO VIDAS CAM PARA LA DETECCIÓN DE  
*Campylobacter* spp. EN ALIMENTOS SELECCIONADOS Y MUESTRAS DE  
AMBIENTES DE PRODUCCIÓN**

**MARIA PAULA MARTINEZ SIERRA**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA  
PAMPLONA  
2020**

**VERIFICACIÓN DEL MÉTODO VIDAS CAM PARA LA DETECCIÓN DE  
*Campylobacter* spp. EN ALIMENTOS SELECCIONADOS Y MUESTRAS DE  
AMBIENTES DE PRODUCCIÓN**

**MARIA PAULA MARTINEZ SIERRA**

**TRABAJO DE GRADO**

**DIRECTOR, RAMON OVIDIO GARCIA Ph.D.**

**TUTOR EMPRESARIAL  
KEINER YOWANIS CERVANTES  
JEFE DE VALIDACIONES**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA  
PAMPLONA**

**2020**

## NOTA DE ACEPTACIÓN

---

---

---

---

---

---

**Jurado**

---

**Jurado**

---

**Jurado**

## CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 General.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3. JUSTIFICACIÓN.....	4
4. MARCO REFERENCIAL .....	5
4.1 <i>Campylobacter</i> spp.....	5
4.2 Propiedades fisiológicas de <i>Campylobacter</i> spp. ....	5
4.2.1 Estado viable no cultivable de <i>Campylobacter</i> spp.....	5
4.2.2 Temperatura de crecimiento .....	6
4.2.3 Naturaleza microaerófila .....	7
4.3 Gastroenteritis por <i>Campylobacter</i> spp. ....	7
4.4 Epidemiología .....	8
4.5 Ecología y prevalencia en aves de corral .....	9
4.6 Factores que influyen en la colonización de aves de corral.....	9
4.6.1 Regulación de temperatura.....	10
4.6.2 Regulación contra el estrés oxidativo .....	10
4.6.3 Quimiotaxis y flagelos .....	10
4.7 Métodos de detección de <i>Campylobacter</i> spp. mediante siembra en medios selectivos.....	11
4.8 Inmunofluorescencia.....	11

4.8.1 Método de detección mediante inmunofluorescencia ligada a enzimas (VIDAS).....	12
4.8.2 Factores que pueden alterar la reacción antígeno anticuerpo .....	14
4.9 Verificaciones .....	14
4.10 ISO 16140-3 .....	14
4.11 Parámetros estadísticos establecidos para procesos de verificación de métodos cualitativos. ....	16
5. ANTECEDENTES.....	18
6. MARCO LEGAL .....	20
7. METODOLOGIA.....	23
7.1 Localización.....	23
7.2 Diseño experimental.....	23
7.2.1 Selección de matrices alimentarias.....	25
7.2.2 Reactivación de la cepa y determinación de la concentración.....	25
7.2.3 Disminución de la carga microbiana de la muestra.....	26
7.2.4 Procesamiento de las muestras.....	26
7.2.5 Alcance del protocolo de verificación.....	27
7.2.6 Inoculación de las matrices.....	28
7.2.7 Detección de <i>Campylobacter</i> spp. por VIDAS CAM .....	29
7.2.8 Parámetros estadísticos evaluados. ....	30
8. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	31
9. RESULTADOS .....	33
9.1 Determinación bajo recuento en placa de los niveles de contaminación para LOD .....	33

9.2 Resultados de la detección cualitativa de Campylobacter spp. en VIDAS CAM.....	33
9.3 Valor del Test (VT).....	37
9.4 Parámetros estadísticos evaluados .....	38
9.4.1 LOD50 .....	38
9.4.2 Resultados determinados por comparativa de ausencia presencia (VP/VN/FP/FN). .....	38
10. ANALISIS DE RESULTADOS.....	42
10.1 Resultados de la detección cualitativa de Campylobacter spp. por metodología VIDAS CAM .....	42
10.2 Valor de Test VT .....	44
10.3 Parámetros estadísticos evaluados .....	44
10.3.1 LOD50 .....	44
10.3.2 Otros parámetros estadísticos .....	45
11. CONCLUSIONES .....	48
12. RECOMENDACIONES O SUGERENCIAS .....	49
13. GLOSARIO .....	50
14. BIBLIOGRAFÍA .....	53
15. Anexos .....	59

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Parámetros estadísticos para verificación de métodos cualitativos. Tomados de la USP 37.....	16
<b>Tabla 2</b> Concentraciones del McFarland a partir del DensiCHEK plus para la estandarización del inóculo.....	26
<b>Tabla 3</b> Resultados arrojados por el equipo VIDAS según la metodología CAM para la detección de <i>Campylobacter</i> spp. en muestras de alimentos y ambientes de producción. Los resultados presentados son de muestras no inoculadas. M1 Carne de pollo cocida, M2 carne de pollo de beneficio, M3 enjuague de carcasa y M4 esponjado de canal.....	33
<b>Tabla 4</b> Resultados obtenidos de la detección de <i>Campylobacter</i> spp. por el equipo VIDAS mediante el test CAM en las diferentes matrices bajos distintos niveles de contaminación. M1 Carne de pollo cocida, M3 enjuague de carcasa y M4 esponjado .....	35
<b>Tabla 5</b> Resultados de la repetición del proceso de verificación para la detección de <i>Campylobacter</i> spp. mediante el equipo VIDAS en la matriz M2 correspondiente a carne de pollo de beneficio. ....	36
<b>Tabla 6</b> Estadística básica de datos aportados en el proceso de verificación. M1 Carne de pollo cocida, M2 carne de pollo de beneficio, M3 enjuague de carcasa y M4 esponjado. ....	37
<b>Tabla 7</b> Cálculo de LOD50 durante el proceso de verificación. ....	38

## LISTA DE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración 1</b> Montaje del cartucho y la fase sólida para metodologías con equipo VIDAS. Recuperado de BioMerieuxchile.....	12
<b>Ilustración 2</b> Esquema de la técnica ELFA. Recuperado de BioMerieux Chile ....	13
<b>Ilustración 3</b> Diseño experimental planteado para el proceso de verificación de la metodología VIDAS CAM para la detección de <i>Campylobacter</i> spp. en muestras alimentarias y ambientes de producción. ....	24
<b>Ilustración 4</b> Esquema metodológico de la estandarización del inóculo.....	25
<b>Ilustración 5</b> Porciones de prueba para cada matriz. ....	27
<b>Ilustración 6</b> Montaje de la muestra al equipo VIDAS. ....	28
<b>Ilustración 7</b> protocolo para el montaje de la muestra en el equipo VIDAS.....	29

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1</b> Resultados emitidos por el equipo VIDAS según la metodología CAM para la detección de <i>Campylobacter</i> spp. en muestras no inoculadas de carne procesada lista para el consumo (M1), carne de pollo de beneficio (M2), enjuague de carcasa (M3) y esponjado de canal (M4). .....	59
<b>Anexo 2</b> Resultados emitidos por el equipo VIDAS según la metodología CAM para la detección de <i>Campylobacter</i> spp. en muestras inoculadas según cada nivel de contaminación durante el proceso de verificación .....	60
<b>Anexo 3</b> Repetición del proceso de verificación para la detección de <i>Campylobacter</i> spp. mediante metodología VIDAS CAM en la muestra de carne de pollo de beneficio sin inoculación. ....	61
<b>Anexo 4</b> Repetición del proceso de verificación para la detección de <i>Campylobacter</i> spp. mediante metodología VIDAS CAM en la muestra de carne de pollo de beneficio según cada nivel de contaminación.....	62

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas agudas son patologías de alto impacto en países subdesarrollados, una de sus principales causas son las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAS); según información suministrada por la Organización Mundial de la Salud, *Campylobacter* spp.. es uno de los principales agentes etiológicos causantes de enfermedades diarreicas transmitidas por alimentos a nivel mundial; se estima que 1 de cada 10 personas al año padecen de ésta infección (OMS, 2020). Desde 1977 año en que *Campylobacter* spp.. fue descubierto como agente patológico (Penner, 1988) se ha visto un creciente interés hacia la necesidad de realizar pruebas alternativas y rápidas en los laboratorios para la detección de este microorganismo.

Hoy en día la mayoría de metodologías para la detección de *Campylobacter* spp.. se basa en métodos analíticos por selectividad; estos a menudo consisten en un análisis con largo tiempo de aplicación, fundamentando su protocolo en un enriquecimiento selectivo, siembra en placa, confirmación de colonias características e identificación (ISO 10727-1:2017), con un período de duración entre 5-6 días; el cual, puede disminuir la sensibilidad del método, debido a los exigentes requisitos de crecimiento de *Campylobacter* spp..

En los últimos años se han desarrollado varios métodos rápidos para detectar *Campylobacter* spp.. en alimentos y otras matrices. El protocolo VIDAS CAM es una técnica para la detección de *Campylobacter* spp.. basado en un inmunoensayo fluorescente ligado a enzimas (ELFA), llevando a cabo, un análisis cualitativo de forma automatizada, con un tiempo total de duración de 48h incluyendo el tiempo de enriquecimiento de la muestra. Este protocolo brinda a los laboratorios resultados con mayor rapidez y sensibilidad, estipulando la conformidad de un alimento, en menos de la mitad del tiempo gastado por metodologías tradicionales; garantizando así, la seguridad alimentaria de los productos antes de llegar a su consumidor final.

La implementación de estos métodos analíticos alternativos puede ser considerados dentro de los protocolos internos de un laboratorio prestador de servicios, sí se encuentran verificados por protocolos estandarizados y aceptados internacionalmente. La ISO 16140-3: 2016 establece los protocolos de verificación de referencia y validación de métodos alternativos implementados en un solo laboratorio; por ende, éste trabajo realiza una verificación del método VIDAS CAM para detección de *Campylobacter* spp.; comprobando la idoneidad de la metodología bajo las condiciones presentes dentro de un laboratorio prestador de servicios; realizando un estudio del límite de detección (LOD<sub>50</sub>) según lo estipula el protocolo de verificación ISO 16410 y otros análisis estadísticos complementarios como, la estimación de la tasa de falsos positivos, tasa de falsos negativos, porcentaje de sensibilidad del método, porcentaje de especificidad, exactitud relativa y concordancia estadística; con el fin, de determinar sí el método alternativo cumple con su funcionalidad dentro del laboratorio según las especificaciones validadas por el proveedor.

## **2. OBJETIVOS**

### ***2.1 General.***

Verificar la idoneidad de un laboratorio de servicios para realizar el método VIDAS CAM para la detección de *Campylobacter* spp.. en alimentos seleccionados y muestras de ambientes de producción.

### ***2.2 Objetivos específicos.***

- Estructurar el protocolo de verificación del método VIDAS CAM para la detección de *Campylobacter* spp.. en alimentos seleccionados y muestras de ambientes de producción.
- Realizar el proceso de verificación del método VIDAS CAM para la detección de *Campylobacter* spp.. en alimentos seleccionados y muestras de ambientes de producción.
- Analizar estadísticamente los datos aportados por el proceso de verificación del método, determinando la funcionalidad de la metodología dentro del laboratorio.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Existe una importante necesidad de brindar resultados fiables y oportunos a las industrias alimentarias acerca de la calidad de sus productos de cara a la presencia de patógenos. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) *Campylobacter* spp.. es uno de los cuatro principales patógenos causante de enfermedades diarreicas a nivel mundial (OMS, 2020). La inoportuna detección de *Campylobacter* spp.. durante diferentes etapas en la cadena alimentaria, es un factor relacionado con las ETAS, y gracias a la altas exigencias ambientales de éste microorganismo, la detección se vuelve más tediosa y demorada, considerando, que debido a sus estrictos requerimientos puede alcanzar estados de célula viable no cultivable, impidiendo así la recuperación de *Campylobacter* spp.. en alimentos mediante metodologías tradicionales; por esto, existe la necesidad de determinar la presencia de *Campylobacter* spp.. en muestras alimentarias de forma rápida y específica, para lo cual se requiere verificar si el proceso de detección rápida alternativa VIDAS CAM cumple su funcionalidad dentro del ambiente proporcionado en el laboratorio prestador de servicios, comprobando su capacidad de detección dentro del desempeño validado por el proveedor.

## **4. MARCO REFERENCIAL**

### **4.1 *Campylobacter* spp..**

El nombre del género *Campylobacter* deriva de una palabra griega, refiriéndose a su forma de varilla curva. Se le atribuye a Theodore Escherich el primer informe sobre *Campylobacter* spp. en 1886, quien observó y describió bacterias con forma de espiral no cultivable (Escherich, 1886). Este género pertenece al grupo de bacteria Gram negativas, con un tamaño de 0,5 a 0,8  $\mu\text{m}$  de largo y con 0,2 a 0,5  $\mu\text{m}$  de ancho. Posee una morfología celular curva, en forma de S o en forma de gaviota (V), con movimientos parecidos a un sacacorchos (Butzler, 2004). *Campylobacter* spp. es una especie bacteriana que conserva características de crecimiento exigentes bajo condiciones *in vitro*.

Su presencia predomina en fuentes como: leche cruda, agua y mayormente en pollos (Hofreuter, 2014). Su hábitat es en órganos reproductivos, cavidad oral y tracto intestinal de humanos u otros animales (Madigan, Martinko, Paul, & Clark, 2009).

### **4.2 Propiedades fisiológicas de *Campylobacter* spp.**

La presencia y el crecimiento de *Campylobacter* spp. depende de una serie de factores tanto intrínsecos como extrínsecos, siendo su aislamiento un trabajo tedioso y muchas veces infructuoso. Igualmente, debido a sus altas exigencias ambientales *Campylobacter* spp. es una especie que pierde su viabilidad muy fácilmente (Hofreuter, 2014).

#### **4.2.1 Estado viable no cultivable de *Campylobacter* spp.**

Se ha determinado la viabilidad celular bacteriana por la habilidad que posee un microorganismo de crecer y formar colonias en medios de cultivo de forma *in vitro*; sin embargo, existen un importante número de microorganismos que no han podido ser cultivados. Las bacterias viables no cultivables representan aquellas bacterias que aun

desarrollan una actividad metabólica pero no pueden generar colonias bajo un medio de cultivo, esto debido a un estado celular adaptativo bajo condiciones ambientales poco favorables para el microorganismo (Tamagnini & Paraje, 2015). *Campylobacter* spp. es un patógeno humano que posee la capacidad de entrar en estado viable no cultivable debido a las altas exigencias ambientales y nutricionales que requiere (microorganismos termófilos y de naturaleza microaerófila) dificultando la obtención de estos ambientes de manera in vitro es induciendo a un estado adaptativo celular disminuyendo así su actividad metabólica pero manteniendo su viabilidad bacteriana, sin la capacidad de formar colonias. Su forma cultivable puede ser recuperada cuando las condiciones de crecimiento sean más favorables. Por esta razón hoy en día las detecciones de *Campylobacter* spp. por métodos de detección tradicionales se vuelven más tediosas para este microorganismo (Ugarte, 2015).

#### **4.2.2 Temperatura de crecimiento**

*Campylobacter* spp. es una especie bacteriana termófila, con un rango de crecimiento entre 37°C y 42°C, no presentando un incremento celular a temperaturas por debajo de los 30°C, pero, manteniendo su viabilidad en ciertos entornos de humedad y refrigeración. Bajo condiciones de temperatura óptima, su multiplicación es lenta y tienden a sobrevivir mejor en condiciones de refrigeración que a temperaturas ambientales (20-25°C) (Park, 2002). Se ha demostrado que *Campylobacter* spp. bajo temperaturas de 4°C, mantiene su actividad metabólica durante largos periodos de tiempo, utilizando vías de respiración anaerobia, sobreviviendo incluso mejor que a temperaturas de 25°C; debido a la disminución de oxígeno libre a bajas temperaturas (Hazeleger, Wouters, Rombouts, & Abee, 1998).

Estas condiciones de crecimiento bajo variables de temperatura pueden estar determinadas por los componentes de la membrana y su fluidez lipídica, provocando variaciones en las estructuras enzimáticas, en el transporte de iones, sustratos o productos y/o interacciones dependientes de la temperatura en compuestos

reguladores a nivel enzimático, ribosómico o de ácidos nucleicos (Hazeleger, Wouters, Rombouts, & Abee, 1998).

#### **4.2.3 Naturaleza microaerófila**

Las condiciones de oxígeno juegan un papel importante en el crecimiento y supervivencia de *Campylobacter* spp., la mayoría de las especies de este género son microaerófilas; aunque, algunas especies pueden crecer en condiciones aeróbicas o anaeróbicas (Ketley, 1997).

La naturaleza microaerófila de *Campylobacter* spp. la vuelve un patógeno aún más difícil de cultivar bajo condiciones *in vitro*, requiriendo atmosferas bajas en oxígeno, pero, con concentraciones altas de dióxido de carbono. Su óptimo crecimiento se lleva a cabo en ambientes con concentraciones de oxígeno de 5% y de dióxido de carbono del 10% y 85% de nitrógeno. Se ha reportado que *Campylobacter* spp. implementa vías de respiración anaeróbicas para facilitar el crecimiento en condiciones anoxigénicas. *Campylobacter* spp. es un género sensible y exigente a las condiciones ambientales; por lo cual, puede alcanzar el estado de célula viable no cultivable (VNC), por lo que muchas veces se evita la detección por técnicas cultivables por selectividad (Hofreuter, 2014).

#### **4.3 Gastroenteritis por *Campylobacter* spp.**

*Campylobacter* spp. es un género causante del 80% de las enteritis a humanos, ésta infección da como resultados una enfermedad gastrointestinal aguda, caracterizada por diarrea blanda líquida o muy sanguinolenta, fiebre, malestar, náuseas y calambres abdominales. Las manifestaciones clínicas en algunos pacientes pueden variar y la diarrea puede ser mínima; predominando, la fiebre por debajo de 40°C y los dolores abdominales. Su duración es de 7-10 días, pero ocurren recaídas en el 25% de los casos (Madigan M. M., 2009).

La concentración bacteriana necesaria para desencadenar una infección es de 800 células; una dosis infecciosa más baja que la de *Salmonella* typhimurium o

*Escherichia coli*, indicando la fuerte adaptación que tiene *Campylobacter* spp. para sobrevivir en ambientes ácidos como la del estómago humano (Hofreuter, 2014).

Existen complicaciones pos-infecciosas inducida por *Campylobacter* spp., la más importante es el síndrome de Guillain-Barré, una enfermedad desmielinizante aguda del sistema nervioso periférico. El riesgo de desencadenar este síndrome es de; 1 caso por cada 1000 infecciones, pero puede aumentar su índice debido a la infección de ciertos serotipos de *Campylobacter* (Acheson & Allos, 2001) .

#### **4.4 Epidemiología**

El género *Campylobacter* es reconocido a nivel mundial como el agente bacteriano responsable de la campilobacteriosis. Las especies más usuales causante de la campilobacteriosis en humanos, son *Campylobacter jejuni*, seguida de *Campylobacter coli* (Razzuoli, y otros, 2018). La Organización Mundial de la Salud en el año 2019 informó, más de 550 millones de casos de campilobacteriosis; de los cuales, 220 millones de estos casos son niños menores de 5 años (OMS, 2020).

Según el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de EE. UU, las fuentes más comunes atribuidas a brotes por *Campylobacter* spp. en los años 2010-2017 han incidido a aves de corral, leche cruda y agua sin tratar. El 17,5% de las infecciones por *Campylobacter* spp. están ligadas a el consumo de carne de aves de corral y sus derivados (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2019).

En Colombia no existen mucha información acerca de las incidencias de *Campylobacter* spp. en humanos; sin embargo, el Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud durante el periodo 2007 y 2011 hace una estimación acerca de la prevalencia de *Campylobacter* spp. en muestras de pacientes con enfermedades diarreicas agudas, en donde se reporta una prevalencia más alta en el año 2007 con un 6,8% y una prevalencia más baja en el año 2008 con un 3,3%.

Igualmente, se reporta una alta prevalencia en niños menores durante los años 1999-1997 en Medellín con un 5,8% (INS, 2013)

#### ***4.5 Ecología y prevalencia en aves de corral***

Las especies del género *Campylobacter* ocupan hábitats muy diversas; considerándose un microorganismo ubicuo presente en el medio ambiente, aves silvestres, roedores y animales domésticos. Esta infección bacteriana es transmitida por vía oral-fecal, siendo su reservorio principal el tracto intestinal de mamíferos y aves, en donde, los animales productores de alimentos como, aves, cerdos, vacas y ovejas, son la fuente principal de infección en humanos. También, las fuentes hídricas y suelos, con frecuencias son reservorio de *Campylobacter* spp. debido a los excrementos que son infiltrados a estos ecosistemas por animales portadores de este género (Gözl, Kittler, Malakauskas, & Alter, 2018).

Las aves de corral son el hospedador principal para *Campylobacter* spp., esto se asume, a la correlación entre los factores intrínsecos como la temperatura corporal, oscilando entre 39°C y 41°C, contribuyendo así, a la proliferación de este microorganismo. Igualmente, la alta tasa de fibronectina en vías digestivas, contribuyen a la unión de *Campylobacter* spp. al tracto gastrointestinal a través de la proteína de unión CadF (Shange, Gouws, & Hoffman, 2019).

#### ***4.6 Factores que influyen en la colonización de aves de corral***

La constante colonización del tracto gastrointestinal de *Campylobacter* spp. en las aves de corral, especialmente en pollos de engorde, aún no está completamente dilucidado; pero, se ha conocido la existencia de múltiples factores involucrados en el proceso de colonización de *Campylobacter* spp. en la zona intestinal del pollo (Hermans, y otros, 2011).

#### **4.6.1 Regulación de temperatura**

La elevada temperatura corporal de los pollos, inducen a la transcripción de diferentes proteínas en respuesta al tracto intestinal de estos animales. Existe un sistema de transducción de señales que responde a los cambios de temperatura, denominado RacR, Estudios ha revelado que la expresión de proteínas asociadas a éste regulón, se ven afectadas por los cambios de temperatura; en donde, se presentan expresiones diferenciales en al menos 15 proteínas, las cuales son identificadas como proteínas periplásmicas o antígenos principales implicadas en el metabolismo o el sistema regulador de *Campylobacter* spp., desempeñado también un papel en la termotolerancia del microorganismo (Hermans, y otros, 2011).

#### **4.6.2 Regulación contra el estrés oxidativo**

*Campylobacter* spp. posee una fisiología microaerófila, por la cual debe desencadenar un sistema de defensa contra el estrés oxidativo. El Citocromo c y las peroxidasas (Ccp), son habitualmente responsables de la transformación del peróxido de hidrogeno en agua, y aunque, *Campylobacter* spp. posee dos loci Ccp, sorprendentemente, estos no favorecen a la resistencia al peróxido de hidrogeno; sin embargo, uno de sus sistemas de defensa contra el estrés oxidativo está mediado principalmente por la catalasa citoplasmática KatA (Hermans, y otros, 2011).

#### **4.6.3 Quimiotaxis y flagelos**

La morfología flagelar que posee *Campylobacter* spp. promueve el proceso de quimiotaxis; incitando el desplazamiento del microorganismo hacia condiciones ambientales y nutricionales que favorecen su mantenimiento celular. Esta migración se lleva a cabo mediante un mecanismo de detección de gradiente. Se ha demostrado que *Campylobacter* spp. se siente atraído por componentes como; glicoproteínas mucina, la bilis, L fucosa, algunos aminoácidos y sales de ácidos

orgánicos, los cuales, son detectados por proteínas de quimiotaxis transmembranal, aceptando el metilo y modulando positivamente el promotor *flaA* relacionado con la flagelina. Otro gen relacionado con la flagelina es el gen *flaB*, el cual puede verse afectado por pH, temperaturas de crecimiento y concentraciones de nutrientes inorgánicos. Es importante resaltar que la estructura flagelar que posee *Campylobacter* spp. funciona como un aparato de secreción de antígenos tipo III, importante en la invasión celular, el cual, aumenta con la exposición al moco del pollo en sus vías gastrointestinales (Hermans, y otros, 2011).

#### **4.7 Métodos de detección de *Campylobacter* spp. mediante siembra en medios selectivos**

La detección y aislamiento de *Campylobacter* spp. en carne y carcasa de pollo por metodología tradicional, generalmente, se basa en el protocolo estandarizado por la ISO 10272-1:2006, en donde se realiza un enriqueciendo con caldo Preston y se incuban por 48 h en condiciones de microaerofilia. Después se realiza un enriquecimiento selectivo, transfiriendo 30 µl en placas m-CCD, para posterior a 48 h de incubación realizar la confirmación a las colonias presuntivas (morfología, motilidad, oxidasa, crecimiento microaeróbico a 25°C, crecimiento aeróbico a 41,5°C) e identificación (catalasa, sensibilidad al ácido nalixídico y cefalotina, hidrolisis del hipurato). El tiempo de duración para este proceso varía entre 5-6 días (ISO 10272,2006).

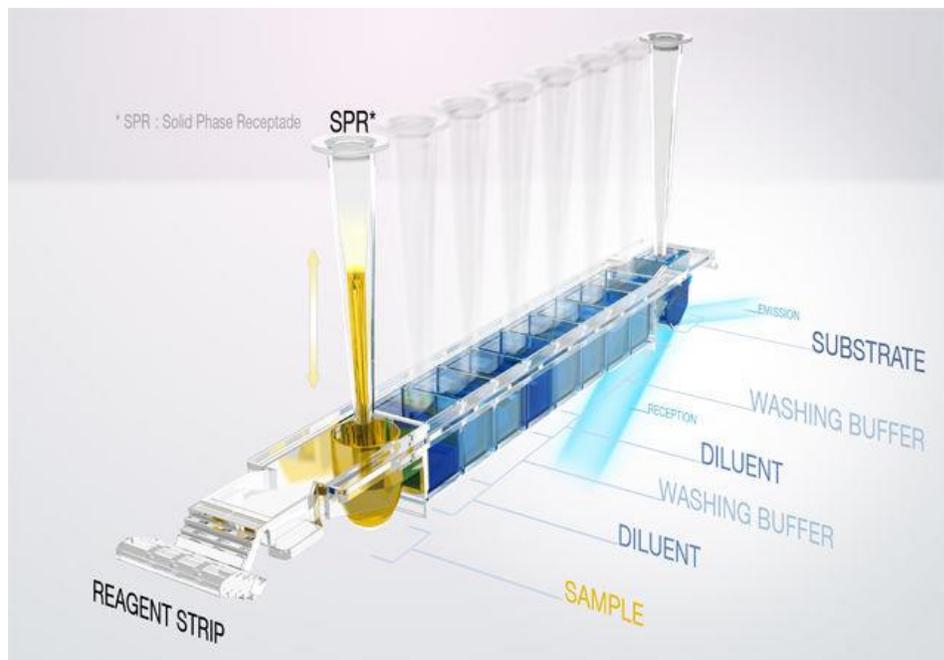
#### **4.8 Inmunofluorescencia**

La inmunofluorescencia es un ensayo inmunohistoquímico mediante el cual se visualizan antígenos celulares utilizando fluoróforos. Los fluoróforos, son compuestos con la capacidad de emitir luz cuando se exponen a una determinada longitud de onda de luz (Goding, 1996).

#### 4.8.1 Método de detección mediante inmunofluorescencia ligada a enzimas (VIDAS)

La detección de *Campylobacter* spp. por VIDAS CAM es una prueba cualitativa, la cual, puede determinar la presencia de antígenos de *Campylobacter* spp. en muestras de alimentos basados en un inmunoensayo fluorescente ligado a enzimas llamado ELFA (Enzyme-Linked Immuno sorbent Assay), previo a una etapa de enriquecimiento. Este kit contiene un recipiente de fase sólida (SRP) y un cartucho con una serie de pocillos que contienen la cantidad exacta de reactivo necesario para la prueba (Ilustración 1) (BioMerieux).

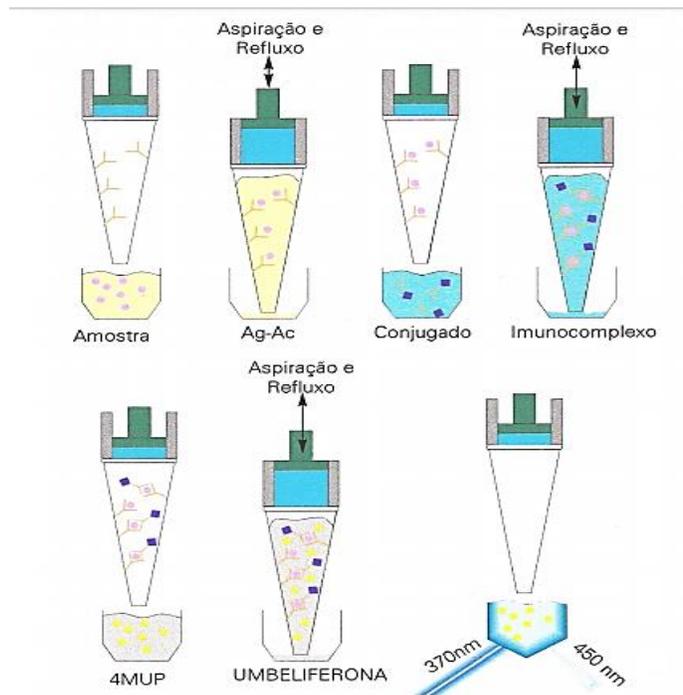
**Ilustración 1** Montaje del cartucho y la fase sólida para metodologías con equipo VIDAS. Recuperado de BioMerieuxchile



La SRP funciona como fase sólida y dispositivo de pipeteado, su interior está cubierto de anticuerpos anti-*Campylobacter*, los cuales se encuentran pegados en la pared del SRP, permitiendo que los antígenos presentes en la muestra se unan a los anticuerpos. El equipo realiza automáticamente todos los pasos de la prueba. Su medio de reacción es aspirado y expulsado del SRP® varias veces. Durante el

proceso de detección, se depositan 500µL del caldo de enriquecimiento, los cuales son dosificados en el cartucho de reactivos, donde los antígenos presentes se unirán a los anticuerpos anti- *Campylobacter* spp. que recubren el interior del SPR®, mientras, los componentes de la muestra no ligados se eliminan mediante lavado. Durante el paso final de detección, el sustrato (4-metilumbeliferil fosfato) es aspirado y expulsado del SPR®. La enzima del conjugado cataliza la hidrólisis de este sustrato en un producto fluorescente (4-metilumbeliferona), cuya fluorescencia se mide a 450 nm por el escáner óptico del equipo VIDAS y expresado en RFV (valores relativos de fluorescencia). Al finalizar el ensayo, el equipo analiza automáticamente los resultados y proporciona un valor del test por cada muestra. Este valor se compara con una serie de estándares guardados (umbrales) y cada resultado es interpretado (positivo >0,05 y negativo <0,05) (BioMerieux).

**Ilustración 2** Esquema de la técnica ELFA. Recuperado de BioMerieux Chile



Este método tiene un tiempo de enriquecimiento de 44-52h en caldo CampyFood bajo condiciones de microaerofilia inducido por GENBOX a 42°C y un tiempo de

detección de 70 min. El equipo VIDAS permite analizar 70 muestras de manera simultánea y automatizada (BioMerieux).

#### **4.8.2 Factores que pueden alterar la reacción antígeno anticuerpo**

Existen factores de interferencias no específicas y factores externos que pueden modificar la unión antígeno-anticuerpo como; el pH, la temperatura y la fuerza iónica. Pero también existen otros factores que pueden alterar la reacción antígeno anticuerpo como; moléculas que reaccionan de forma cruzada con estructuras de baja masa molecular (disolventes orgánicos), macroenzimas y moléculas que, aunque no reaccionan, estorban en la unión como son los lípidos. Estos lípidos también pueden generar problemas relacionados con la señal de detección, creando una dispersión luminosa producida por sus macropartículas en suspensión (Domenech & Gascon, 2017).

#### **4.9 Verificaciones**

Un proceso de verificación se rige en comprobar la capacidad que tiene un laboratorio en llevar a cabo una metodología con el mismo desempeño analítico estableció por los fabricantes de equipos y reactivos (Benemérita, 2007). Según el Vocabulario Internacional de metrología VIM, se define la verificación como *“Aportación de evidencia objetiva de que un elemento satisface los requisitos especificados”* (CEM, 2012).

#### **4.10 ISO 16140-3**

Según la Organización Internacional de Normalización ISO en su normativa 16140-3: 2016; se establece los protocolos de verificación de referencia y validación de métodos alternativos implementados en un solo laboratorio. El cual brinda las bases para ejecutar un proceso idóneo de verificación en métodos de detección cualitativos (ISO, 2019).

Esta normativa plantea un diseño experimental sencillo, dentro del cual se determina el límite de detección de la metodología LOD50. Allí se estipula la preparación mínima de 8 porciones de prueba por cada matriz. Se debe inocular 6 porciones de prueba a diferentes niveles de contaminación; un nivel alto por duplicado, un nivel intermedio por duplicado y un nivel bajo por duplicado. Adicionalmente, una porción de prueba que sirvan como control negativo, donde la porción analizada no tenga inóculo y este por duplicado. El nivel de contaminación debe ser determinado bajo recuento en placa, calculando la concentración del inóculo.

Para la selección de artículos (matriz de alimentos), este debe estar incluido en el método de validación del equipo y reactivos, y preferiblemente probado en el laboratorio. Durante el proceso de contaminación artificial se deben utilizar cepas provenientes de colecciones de cultivos, colecciones de laboratorio y/o materiales de referencia con una concentración conocida (ISO, 2019).

Para la inoculación en los artículos de prueba, se debe conocer el límite de detección de cada equipo y/o metodología, con base a la información de la validación. En caso de no ser conocido el límite, se estimará el valor igual o inferior a 1UFC/ porción de prueba. (ISO, 2019).

Para estimar el resultado del LOD50, se deben cumplir ciertos requisitos: el control negativo debe dar negativo siempre, de lo contrario se deberá repetir toda la determinación de LOD50. El nivel alto debe dar positivo siempre, de lo contrario se deberá repetir toda la determinación de LOD50. No se considera un resultado válido si algún resultado del límite bajo da en su totalidad positivo, mientras que en el límite medio dan todas negativas. Cada réplica del nivel intermedio equivale a 2 límites de detección. Cada réplica del nivel bajo equivale a 1 límite de detección.

**4.11 Parámetros estadísticos establecidos para procesos de verificación de métodos cualitativos.**

**Tabla 1** Parámetros estadísticos para verificación de métodos cualitativos. Tomados de la USP 37

<b>Parámetro estadístico.</b>	<b>Concepto</b>
<b>Especificidad</b>	Capacidad del ensayo para detectar solo la diana o control negativo y a su vez su cuantificación sin interferencias (INS, 2015).
<b>Especificidad analítica</b>	Fracción total de positivos resultantes de los recuentos presuntivos (INS, 2015).
<b>Sensibilidad</b>	Fracción del total negativos resultantes de los recuentos presuntivos (INS, 2015).
<b>Desviación positiva o falso positivo</b>	Se presenta cuando los resultados dan positivos sin confirmación y el método de referencia da resultados negativos, convirtiéndose en un resultado falso positivo cuando se demuestra que el resultado verdadero es negativo (INS, 2015).
<b>Desviación negativa o falso negativo</b>	Se presenta cuando los resultados dan negativos sin confirmación y el método de referencia da resultados positivos, y se demuestra que el resultado verdadero es positivo (INS, 2015).
<b>Exactitud</b>	Corresponde al grado de concordancia entre resultados de una medición real y un valor de referencia (INS, 2015).
<b>Indicé KAPPA</b>	El análisis de esta concordancia se fundamenta en establecer la probabilidad que cada resultado derivado sea equivalente a los resultados generados por los diferentes profesionales o

	diferentes días de ensayo (Pan American Health Organization., 2002).
--	--

## 5. ANTECEDENTES

Estudios realizados en el 2015 por Altun y colaboradores, acerca de la eficiencia de la técnica mini VIDAS y técnica de cultivo para la detección de *Campylobacter jejuni* en carne picada, registraron resultados muy prometedores y acorde a las especificaciones del proveedor BioMerieux, registrando una sensibilidad del 100%, siendo superior a la sensibilidad obtenida por técnicas de cultivo, la cual se consiguieron resultados del 90,91% (Altun, Gurbuz, & Erdenlig, 2015). Igualmente, estudios investigativos realizados por Razzuoli y colaboradores en el 2018, acerca de la evaluación y validación de un método alternativo para detectar *Campylobacter* spp. en productos lácteos, mostraron resultados de especificidad y sensibilidad del 100% en muestras lácteas contaminadas con *Campylobacter jejuni*, las cuales fueron detectadas mediante la metodología VIDAS CAM (Razzuoli, y otros, 2018)

La evaluación de dos métodos de inmunoensayo enzimáticos automatizados en muestras de pavo para la detección de *Campylobacter jejuni*, realizada por Borck y colaboradores en el 2002, mostraron resultados positivos en la detección obtenida por metodología VIDAS CAM en muestras de piel de cuello de pavo; registrando una sensibilidad del 96%, siendo significativamente mayor al otro método automatizado analizado (Borck, 2002).

Existe una fuerte relación en la transmisión de este patógeno durante la producción primaria de la cadena alimenticia, en la cual la transmisión horizontal de *Campylobacter jejuni* juega un papel importante durante el proceso de sacrificio y faenado de aves de corral. Según la revisión realizada por Nompumelelo (2019) diversos estudios han demostrado que posterior a el proceso de eviscerado en canales de aves de corral, la concentración bacteriana por *Campylobacter jejuni* aumenta, reportándose una detección positiva en un 90-85% de las canales muestreadas; siendo éste proceso un punto crítico durante la cadena alimenticia, el cual, también induce a la contaminación cruzada a través del personal y utensilios en pasos posteriores (Shange, Gouws, & Hoffman, 2019).

Hermans en el 2011 junto con su equipo de investigadores recopilaron y analizaron los factores de colonización de *Campylobacter jejuni* en el intestino del pollo, mencionando los factores que promueven invasión y proliferación de este microorganismo dentro de las condiciones inducidas al interior de las vías gastrointestinales de esta ave de corral, describiendo su comportamiento fisiológico y genético (Hermans, y otros, 2011).

## 6. MARCO LEGAL

- DECRETO 2270 de 2012 Por el Ministerio de Salud y Protección Social, el cual se crea el Sistema Oficial de Inspección, Vigilancia y Control de la Carne, productos cárnicos comestibles y derivados cárnicos destinados para el consumo humano y los requisitos sanitarios y de inocuidad que se deben cumplir en su producción primaria, beneficio, desposte, desprese, procesamiento, almacenamiento, transporte, comercialización, expendio, importación o exportación (Ministerio de Salud y Protección Social, 2012).
- RESOLUCIÓN 4287 de 2007. Por el Ministerio de la Protección Social, el cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios y de inocuidad de la carne y productos cárnicos comestibles de las aves de corral destinadas para el consumo humano y las disposiciones para su beneficio, desprese, almacenamiento, transporte, comercialización, expendio, importación o exportación. Igualmente, estipula los criterios a tener en cuenta durante el desarrollo de las diferentes inspecciones y las condiciones en las cuales se deben encontrar las instalaciones involucradas en el proceso de producción de carne y productos cárnicos comestibles de las aves de corral (Ministerio de la Protección Social, 2007).
- RESOLUCIÓN 242 de 2013 Por el Ministerio de Salud y Protección Social, el cual se establecen los requisitos sanitarios para el funcionamiento de las plantas de beneficio de aves de corral, desprese y almacenamiento, comercialización, expendio, transporte, importación o exportación de carne y productos cárnicos comestibles. Describiendo las condiciones físicas y sanitarias que se deben brindar en las instalaciones durante todo el proceso de la cadena alimentaria antes de llegar al consumidor final. Igualmente, se mencionan los procedimientos de saneamientos y monitoreo diario que se deben realizar al interior del establecimiento (Ministerio de Salud y Protección Social, 2013).

- RESOLUCIÓN 1619 de 2015 Por el Ministerio de Salud y Protección Social, el cual se establece el Sistema de Gestión de la Red Nacional de Laboratorios en los ejes estratégicos de Vigilancia en Salud Pública y de Gestión de Calidad (Ministerio de Salud y Protección Social, 2015).
- RESOLUCIÓN 2690 de 2015 Por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, y el Ministerio de Salud y Protección Social, el cual se establecen las directrices para la formulación del programa de verificación microbiológica del Sistema Oficial de Inspección, Vigilancia y Control de la carne y productos cárnicos comestibles, en donde se incluye a *Campylobacter* spp. como un patógeno que se debe tener en cuenta dentro del programa de verificación microbiológica debido al riesgo hacia el consumidor (Ministerio de Salud y Protección Social, 2015).
- USP Farmacopea Estadounidense versión 37, Capítulo 1223-1225. Validación de métodos microbiológicos alternativos. Validación de procedimientos farmacopeicos. (United States Pharmacopeia, 2014)
- ISO 17025:2017 Organización Internacional de Normalización por el cual establece los requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. 7.2 Selección, verificación y validación de métodos (Organización Internacional de Normalización, 2017).
- ISO 16140-3: 2016 Microbiología de la cadena alimentaria - Validación de métodos - Parte 3: Protocolo para la verificación de métodos de referencia y métodos alternativos validados en un solo laboratorio. Establece los protocolos de verificación de referencia y validación de métodos alternativos implementados en un solo laboratorio. Se constituyen las bases y pautas para

realizar un proceso idóneo de verificación en métodos de detección cualitativos (Organización Internacional de Normalización, 2016).

- ISO 10272-1:2006 Microbiología de alimentos y piensos: método horizontal para la detección y enumeración de *Campylobacter* spp.. - Parte 1: Método de detección. Es aplicable a productos destinados al consumo humano o para la alimentación de animales, y a muestras ambientales en el área de producción y manipulación de alimentos, sujeto a las limitaciones señaladas en la Introducción (Organización Internacional de Normalización, 2006).

## **7. METODOLOGIA**

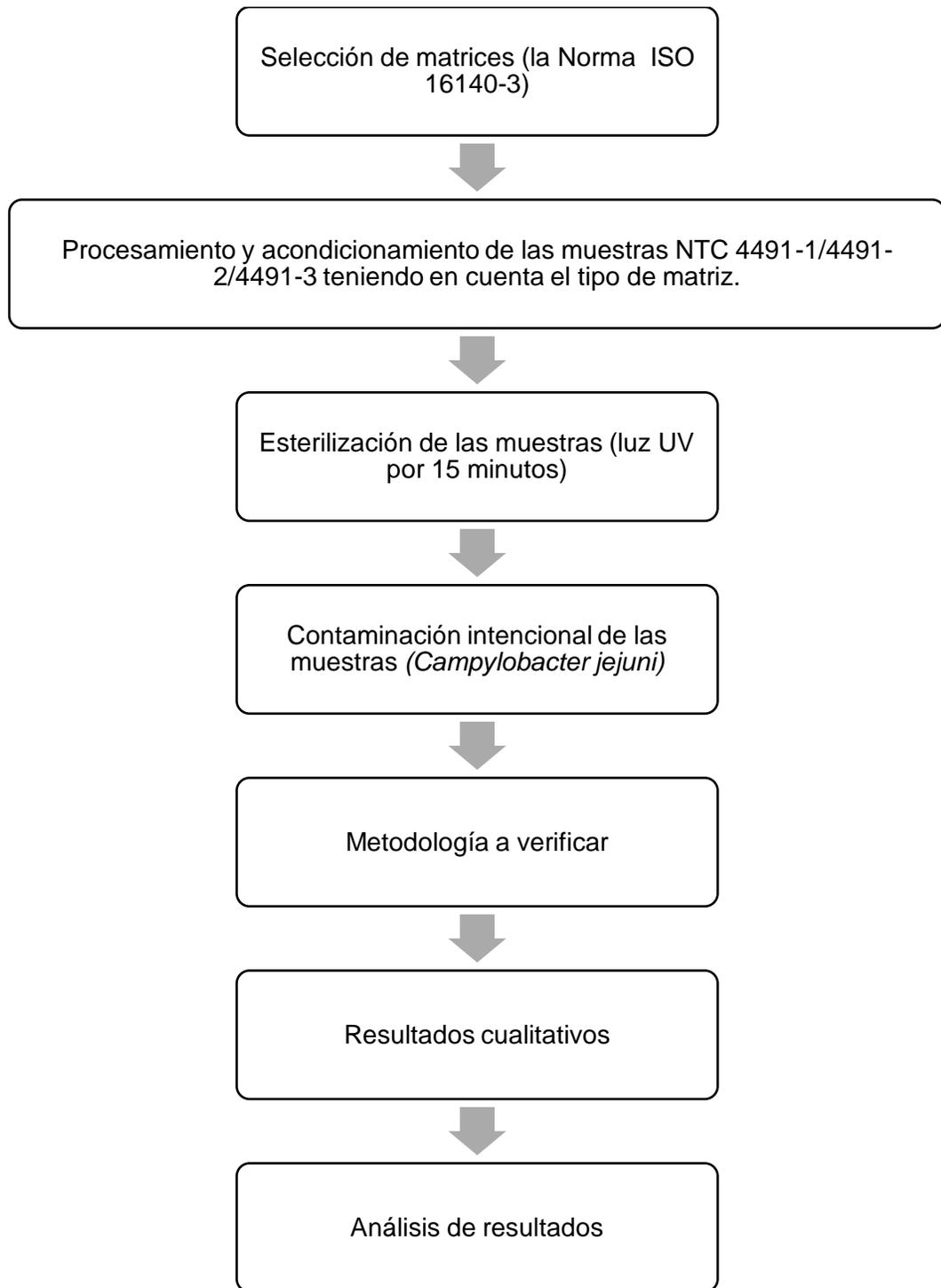
### ***7.1 Localización.***

Laboratorio prestador de servicios para el control calidad de medicamentos, cosméticos, productos naturales, alimentos y afines, ubicado en Medellín, Antioquia, con más de 10 años de estar certificados en ISO 9001 y acreditados en ISO/IEC 17025.

### ***7.2 Diseño experimental.***

Con el objetivo de verificar el desempeño del método de detección VIDAS CAM en el laboratorio; se usaron insumos incluidos en la metodología planteada por el proveedor, e igualmente, fueron utilizadas matrices ya validadas por el proveedor, las cuales son analizadas de forma rutinaria; esto en el ~~a~~ fin de comprobar el rendimiento establecido durante el proceso de validación.

**Ilustración 3** Flujograma del procedimiento de verificación de la metodología VIDAS CAM para la detección de *Campylobacter* spp. en muestras alimentarias y ambientes de producción.



### 7.2.1 Selección de matrices alimentarias.

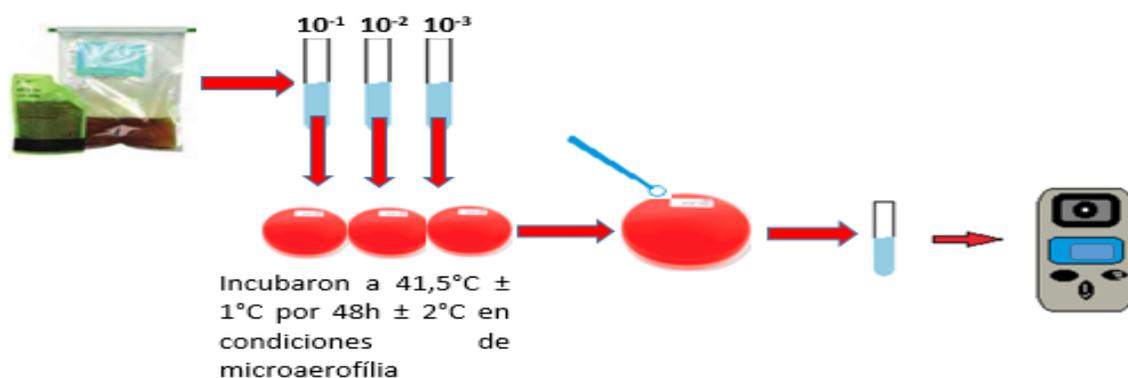
Se seleccionaron 4 matrices, según las validaciones realizadas por el fabricante e igualmente, según las muestras analizadas de forma rutinaria en el laboratorio. Las categorías de las matrices fueron: carne de pollo de beneficio, carne de pollo lista para el consumo, enjuague de carcasas de pollo y esponjas de canal (Frotis de superficie).

### 7.2.2 Reactivación de la cepa y determinación de la concentración

Se llevó a cabo la reactivación de la cepa de *Campylobacter jejuni* ATCC 53560 desde perlas inoculadas conocidas también como Criobank, utilizando medio de cultivo agar sangre y caldo CampyFood, incubándolos a  $41,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante  $48\text{h} \pm 2$  en condiciones de microaerofilia.

Con el crecimiento presentado en la reactivación de la cepa, se realizó una confirmación del género *Campylobacter* mediante un cartucho de VIDAS CAM.

**Ilustración 4** Esquema metodológico de la estandarización del inóculo



Con la recuperación bacteriana que se había obtenido en el caldo CampyFood, se realizaron tres diluciones seriadas y se sembraron en medios de cultivos agar sangre. Estas fueron incubadas a  $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $48\text{h} \pm 2$  en condiciones de microaerofilia.

Pasado el tiempo de incubación, se tomaron colonias típicas de *C. jejuni* y se realizó un patrón McFarland 1 mediante el equipo DensiCHEK®, generando un valor de la escala de McFarland mediante la medición de la turbidez de la solución salina a una longitud de onda de 580 nm. De acuerdo con el dato obtenido pudimos obtener concentraciones como nos indica la tabla 2.

**Tabla 2** Concentraciones del McFarland a partir del DensiCHEK plus para la estandarización del inóculo

Patrón Escala McFarland	Concentración bacteriana (UFC/ml)	Densidad óptica teórica a 580 nm
0.5	$1,5 \times 10^8$	0.125
1	$3 \times 10^8$	0.25
2	$6 \times 10^8$	0.50
3	$9 \times 10^8$	0.75
4	$12 \times 10^8$	1.00
5	$15 \times 10^8$	1.25

### 7.2.3 Disminución de la carga microbiana de la muestra.

Se tomó una porción de carne de beneficio (pechuga) la cual fue sometida bajo luz UV por 15min, con el fin de disminuir la carga microbiana presente a través de la radiación ultravioleta. Las otras matrices se habían confirmado no tener presencia de *Campylobacter* spp. según la trazabilidad de la muestra en sus respectivos lotes.

### 7.2.4 Procesamiento de las muestras.

Se pesaron las muestras, homogenizando en diluciones 1:10. Se pesó 8 veces cada matriz (2 muestras para el control negativo, 2 muestras para LOD1, 2 para el LOD5 y finalmente, 2 muestras para el LOD10) (Ilustración 4).

Para el enjuague de carcasas se vertió 400 ml de agua peptona al 2% en la cavidad de la carcasa de pollo de beneficio, agitando la bolsa por 1min, del cual se tomaron 25 ml del enjuague y se diluyeron en 225 ml de caldo CampyFood.

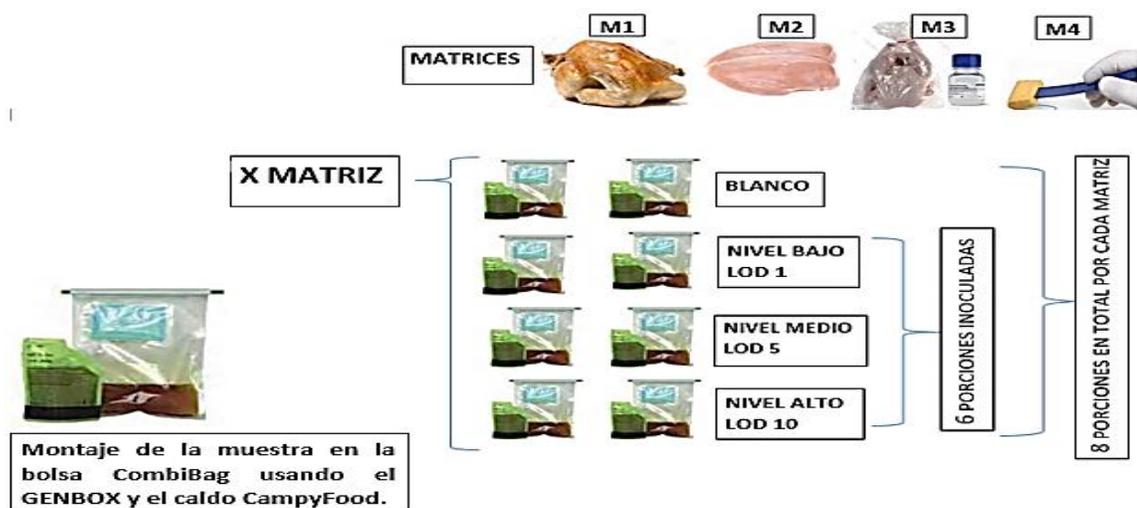
Para la carne de pollo de beneficio y la carne de pollo procesada lista para consumir, se pesaron 25 g de la muestra diluyéndose en 225 ml de caldo CampyFood.

Las esponjas de canal se homogenizaron en 90 ml de caldo CampyFood después de haber realizado el esponjado sobre la canal.

### 7.2.5 Alcance del protocolo de verificación

Para cada matriz del artículo seleccionado, se prepararon 8 porciones de prueba del alimento, las cuales, 6 fueron inoculadas bajo diferentes niveles de contaminación; un nivel alto, un nivel medio y un nivel bajo, todas por duplicado. Estos niveles se basaron en el límite de detección del equipo y la metodología. Adicionalmente, un nivel de porción de prueba sin inóculo (control negativo), el cual, igualmente se realizó por duplicado. Cada nivel de contaminación fue determinado bajo recuento en placa por triplicado. El límite de detección establecido para VIDAS CAM es de 1 UFC/porción de muestra.

**Ilustración 5** Porciones de prueba para cada matriz.



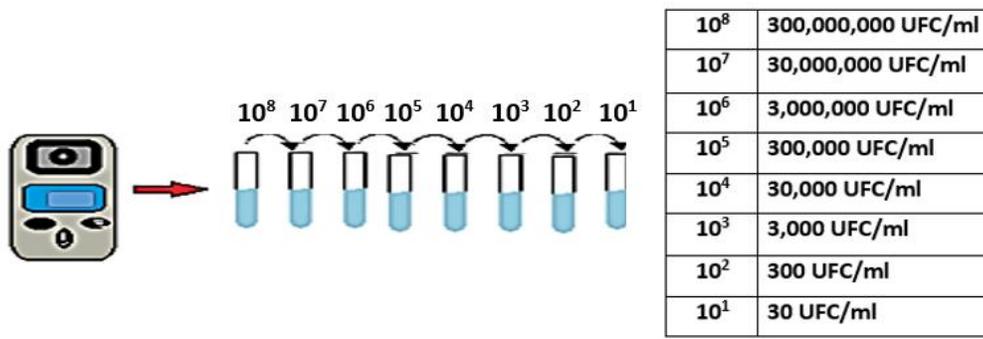
## 7.2.6 Inoculación de las matrices

Luego de estandarizar el inóculo utilizando el DensiCHEK, se realizó la determinación de los niveles de inoculación con la siguiente ecuación:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad V_1 = C_2 \times V_2 / C_1$$

Para llevar a cabo la inoculación de los diferentes niveles de contaminación de *Campylobacter jejuni* en las diferentes matrices, se realizaron diluciones seriadas.

**Ilustración 6** Montaje de la muestra al equipo VIDAS.



Para obtener una concentración en el LOD1 en una muestra que contiene 225 ml de diluyente + 25 g de muestra, partiendo de una concentración de 300 UFC/mL en el tubo  $10^2$ , se agregó 840  $\mu$ L del tubo  $10^2$ .

$$(\text{LOD1}) V_1 = C_2 \times V_2 / C_1$$

$$1 \text{ UFC} \times 250 \text{ mL} / 300 \text{ UFC} = 0,83 \text{ mL de la dilución correspondiente a } 10^2$$

Para obtener una concentración en el LOD5 en una muestra que contiene 225 ml de diluyente + 25 g de muestra partiendo de una concentración de 3000 UFC/ml, se agregó 420  $\mu$ L ml del tubo  $10^3$ .

$$(\text{LOD5}) V_1 = C_2 \times V_2 / C_1$$

$$5 \text{ UFC} \times 250 \text{ mL} / 3000 \text{ UFC} = 0,42 \text{ mL de la dilución correspondiente a } 10^3$$

Para obtener una concentración en el LOD10 en una muestra que contiene 225 ml de diluyente + 25 g de muestra partiendo de una concentración de 35 UFC/mL, se agregó 840 µL ml del tubo 10<sup>3</sup>.

$$(LOD10) V_1 = C_2 \times V_2 / C_1$$

10 UFC\*250 mL/3000 UFC=0,83 mL de la dilución correspondiente a 10<sup>3</sup>

Se inoculó el analito en cada una de las matrices seleccionadas bajo los diferentes niveles de concentración; LOD1 1UFC, LOD5 5 UFC, LOD10 10 UFC y se incubaron por 48h ± 2 a 41,5 °C ± 1°C, en condiciones de microaerofilia. Cabe resaltar que el control negativo no tuvo ningún tipo de inoculación; estos se incubaron y procesaron en condiciones controladas y apartadas de las demás muestras para evitar su contaminación accidental.

### 7.2.7 Detección de *Campylobacter* spp. por VIDAS CAM

Posteriormente al tiempo de incubación, se realizó la metodología de montaje de muestras al equipo VIDAS para la detección de *Campylobacter* spp. según el protocolo VIDAS CAM. Se realizó el montaje y lectura de cada una de las 8 porciones de prueba, según cada matriz.

**Ilustración 7** protocolo para el montaje de la muestra en el equipo VIDAS



Para cada porción se pipetearon 3 ml de la muestra en un tubo tapa-rosca, esto se llevó a calentamiento a 95°C por 5 min. Transcurrido este tiempo, se dejó reposar la muestra 5 min a temperatura ambiente, para posteriormente, añadir 500µl de la muestra al cartucho VIDAS CAM e ingresar al equipo VIDAS. Este procedimiento se realizó a cada una de las 8 porciones correspondientes a cada matriz.

Primeramente, se realizó la detección del control negativo con el fin de establecer la conformidad de los requisitos básicos en el proceso de verificación, según lo estipula la ISO 16140-3. Los resultados se obtuvieron después de 75 minutos.

#### **7.2.8 Parámetros estadísticos evaluados.**

Se calculó el LOD50 como parámetro estadístico estipulado por el protocolo ISO 16140-3 para la verificación de métodos cualitativos. También, con base a los resultados obtenidos para la determinación del LOD50 se realizaron otros análisis estadísticos complementarios para aumentar la robustez en la verificación; dentro de los cuales se determinó la sensibilidad, especificidad, exactitud relativa, tasa de falsos positivos y negativos, concordancia Kappa y desviación estándar.

La estimación del LOD50 se realizó bajo los criterios estipulados por la ISO 16140-3; en donde se dicta cierta valoración a un resultado negativo en cada una de las réplicas de la muestra. Para un resultado negativo en el nivel de detección bajo, se otorga un equivalente a 1LLI (Identification Low Level), bajo un nivel de detección medio 2 LLI y bajo un nivel alto 4 LLI. Sí los resultados de las detecciones son positivos al proceso de verificación se establece >1 LLI. La sumatoria de estos no deben sumar >4 LLI, de lo contrario se debe repetir el proceso de verificación.

## 8. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad	Julio					Agosto					Septiembre					Octubre					Noviembre					Diciembre									
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Capacitación de labores en la empresa	■	■	■																																
Entrenamiento por parte del analista en muestras ambientales				■	■																														
Acompañamiento en el procesamiento de las muestras					■																														
Entrenamiento por parte del analista en muestras de cosméticos y medicamentos								■	■																										
Acompañamiento en el procesamiento de las muestras										■																									
Entrenamiento por parte del analista en muestras de alimentos															■																				
Acompañamiento en el procesamiento de las muestras																				■															
Procesamiento de las muestras de manera independiente																																			



## 9. RESULTADOS

### 9.1 Determinación bajo recuento en placa de los niveles de contaminación para LOD

Los recuentos en placa obtenidos de los niveles de contaminación fueron acordes a los esperados. El nivel de contaminación bajo correspondiente a 1UFC de *Campylobacter jejuni* obtuvo un recuento de 1UFC/porción de prueba. El nivel de contaminación medio correspondiente a 5 UFC de *C. jejuni*, presentó un recuento de 6 UFC/porción de prueba. Por último, el nivel de contaminación alto, correspondiente a 10 UFC de *C. jejuni* reportó un crecimiento de 10 UFC/porción de prueba.

### 9.2 Resultados de la detección cualitativa de *Campylobacter* spp. en VIDAS CAM

Los resultados obtenidos de los controles negativos a partir de la detección cualitativa de *Campylobacter* spp. mediante la metodología VIDAS CAM se muestran a continuación en la tabla 3 (anexos 1).

**Tabla 3** Resultados arrojados por el equipo VIDAS según la metodología CAM para la detección de *Campylobacter* spp. en muestras de alimentos y ambientes de producción. Los resultados presentados son de muestras no inoculadas. M1 Carne de pollo cocida, M2 carne de pollo de beneficio, M3 enjuague de carcasa y M4 esponjado de canal.

Muestra	Test	Valor del Test	Interpretación	Status
M1 Control negativo	CAM	0.02	Negativo	Correcto
M1 Control negativo	CAM	0.02	Negativo	Correcto

M2	Control negativo	CAM	0,17	Positivo	Correcto
M2	Control negativo	CAM	0,10	Positivo	Correcto
M3	Control negativo	CAM	0,02	Negativo	Correcto
M3	Control negativo	CAM	0,03	Negativo	Correcto
M4	Control negativo	CAM	0,01	Negativo	Correcto
M4	Control negativo	CAM	0,01	Negativo	Correcto

Los resultados obtenidos de la detección cualitativa de *Campylobacter* spp. mediante la metodología VIDAS CAM de las matrices no inoculadas (control negativo), arroja resultados positivos en la M2 (carne de pollo de beneficio), mientras que los resultados de las demás matrices fueron negativos, por lo cual, según lo indica el protocolo de verificación ISO 16140-3 fue necesario repetir el proceso de verificación para la M2, despreciando los resultados arrojados. Cabe resaltar que el enjuague de carcasas (M3) y el esponjado de canal (M4) se llevó a cabo con la muestra M2; reportando M3 y M4 resultados de detección para *Campylobacter* spp. negativo, estando la M2 con presencia de *Campylobacter* spp. Posteriormente, se realizaron los montajes de las muestras M1, M3 y M4 con cada uno de sus niveles de contaminación (ver tabla 4) (anexos 2).

**Tabla 4** Resultados obtenidos de la detección de *Campylobacter* spp. por el equipo VIDAS mediante el test CAM en las diferentes matrices bajos distintos niveles de contaminación. M1 Carne de pollo cocida, M3 enjuague de carcasa y M4 esponjado

Muestra	Test	Valor del Test	Interpretación	Status
M1 LOD10	CAM	3,39	Positivo	Correcto
M1 LOD10	CAM	3,64	Positivo	Correcto
M3 LOD10	CAM	1,33	Positivo	Correcto
M3 LOD10	CAM	1,86	Positivo	Correcto
M4 LOD10	CAM	3,33	Positivo	Correcto
M4 LOD10	CAM	3,17	Positivo	Correcto
M1 LOD5	CAM	3,46	Positivo	Correcto
M1 LOD5	CAM	3,53	Positivo	Correcto
M3 LOD5	CAM	3,47	Positivo	Correcto
M3 LOD5	CAM	3,72	Positivo	Correcto
M4 LOD5	CAM	2,91	Positivo	Correcto
M4 LOD5	CAM	2,36	Positivo	Correcto
M1 LOD1	CAM	2,43	Positivo	Correcto
M1 LOD1	CAM	3,06	Positivo	Correcto
M3 LOD1	CAM	1,03	Positivo	Correcto
M3 LOD1	CAM	3,84	Positivo	Correcto
M4 LOD1	CAM	3,85	Positivo	Correcto
M4 LOD1	CAM	3,06	Positivo	Correcto

Los resultados obtenidos durante el proceso de detección de *Campylobacter* spp. en las muestras M1, M3 y M4, bajo los diferentes niveles de contaminación, son acordes a los esperados, arrojando resultados positivos para la detección del microorganismo en todos los niveles, incluyendo el nivel de contaminación más

bajo, LOD1, en donde la concentración microbiana se encuentra sobre el límite de detección capaz de detectar la metodología VIDAS CAM.

Debido a los resultados positivos del control negativo en la muestra de carne de pollo de beneficio M2, fue necesario repetir el proceso de verificación para esta matriz, aumentando el tiempo exposición a luz UV a 25 min, con el fin de disminuir la carga microbiana presente en la muestra. Los resultados obtenidos de la repetición para el proceso de verificación en matriz de carne de pollo de beneficio se muestran a continuación en la tabla 5 (anexo 3).

**Tabla 5** Resultados de la repetición del proceso de verificación para la detección de *Campylobacter spp.* mediante el equipo VIDAS en la matriz M2 correspondiente a carne de pollo de beneficio.

Muestra	Test	Valor del Test	Interpretación	Status
M2 Control negativo	CAM	0.02	Negativo	Correcto
M2 Control negativo	CAM	0.02	Negativo	Correcto
M2 LOD1	CAM	1,03	Positivo	Correcto
M2 LOD1	CAM	1,10	Positivo	Correcto
M2 LOD5	CAM	1,10	Positivo	Correcto
M2 LOD5	CAM	1,11	Positivo	Correcto
M2 LOD10	CAM	1,07	Positivo	Correcto
M2 LOD10	CAM	1,08	Positivo	Correcto

Los resultados obtenidos de la M2 fueron válidos para el proceso de verificación, según lo establece la ISO 16140-3 arrojando resultados acordes a la metodología realizada.

### 9.3 Valor del Test (VT)

El análisis realizado por el equipo VIDAS UP mediante la técnica CAM, da como resultado un VT. Para que una muestra se considere positiva, el valor del test debe dar como resultado una medición  $>0,05$ . Se consideró importante realizar un análisis estadístico básico para estimar el comportamiento de la muestra en la determinación del microorganismo mediante la metodología (Ver tabla 6).

**Tabla 6** Estadística básica de datos aportados en el proceso de verificación. M1 Carne de pollo cocida, M2 carne de pollo de beneficio, M3 enjuague de carcasa y M4 esponjado.

	M1	M2	M3	M4
Control negativo	0,02	0,02	0,02	0,01
	0,02	0,02	0,03	0,01
LOD1	2,43	1,03	1,03	3,85
	3,06	1,1	3,84	3,06
LOD5	3,46	1,1	3,47	3,47
	3,53	1,11	3,72	3,72
LOD10	3,39	1,07	1,33	3,33
	3,64	1,08	1,86	3,17
PROMEDIO	3,25166667	1,081666667	2,54166667	3,43333333
DESVIACIÓN ESTANDAR	0,44781321	0,029268869	1,27701866	0,30871778

En la tabla 6 se destacan los resultados en el esponjado (M4), en donde se promediaron resultados de 3,4 VT, siendo éste significativamente mayor que el aportado en la muestra de pollo crudo (M2), con un VT promediado en 1,08. Es importante destacar de igual manera, que las desviaciones estándar con mejores rendimientos se obtienen en la matriz de pollo crudo (M2).

## 9.4 Parámetros estadísticos evaluados

### 9.4.1 LOD50

El cálculo de LOD50 da un indicio directo de la capacidad del método para poder determinar de manera correcta los microorganismos que se pretenden identificar, en este caso, como se observa en la tabla 7, los resultados de este parámetro fueron ideales, siendo  $<1$  UFC/ 25 g o 100-25 cm<sup>2</sup>. Cumpliendo la especificación establecida por el protocolo ISO 16140-3, en la que dicta que el resultado total de las matrices analizadas no debe exceder un 4xLLI (Identification Low Level).

**Tabla 7** Cálculo de LOD50 durante el proceso de verificación.

LOD50					
Muestras	Nivel alto	Nivel medio	Nivel bajo	Control negativo	eLOD50
1	2/2	2/2	2/2	0/2	$< 1 \times \text{LLI}$
2	2/2	2/2	2/2	0/2	$< 1 \times \text{LLI}$
3	2/2	2/2	2/2	0/2	$< 1 \times \text{LLI}$
4	2/2	2/2	2/2	0/2	$< 1 \times \text{LLI}$

Debido a que ninguna de las réplicas de cada uno de los niveles de contaminación arrojó un resultado negativo; no se le asignó ningún valor a la estimación del LOD50 por lo cual el LLI no fue mayor a 1.

### 9.4.2 Resultados determinados por comparativa de ausencia presencia (VP/VN/FP/FN).

Para el cálculo de las mediciones basadas en los eventos de presencia ausencia se tuvo en cuenta los cálculos establecidos en la farmacopea estadounidense versión 37. Estos cálculos, aunque no hacen parte del protocolo de verificación estipulado por la ISO 16140-3, se sacaron en base a los resultados obtenidos de la estimación

del LOD50, con el fin de aprovechar los datos arrojados durante el proceso de verificación y dar una estadística en base a la calidad del método.

	Ecuación		
Sensibilidad	$\frac{VP}{VP+FP}$	Expresada como %	Sensibilidad %: $\frac{VP}{VP+FN} * 100$
Especificidad	$\frac{VN}{VN+FP}$	Expresada como %	Especificidad %: $\frac{VN}{VN+FP} * 100$
Exactitud relativa	$\frac{VP+VN}{VP+FP+VN+FN} * 100$		
Tasa de Falsos Positivos	$\frac{FP}{FP+VN}$	Expresado en % Falsos Positivos%	$\frac{FP}{FP+VN} * 100$
Tasa de Falsos Negativos:	$\frac{FN}{FN+VP}$	Expresado en % Falsos Negativos%	$\frac{FN}{FN+VP} * 100$
Concordancia estadística para métodos cualitativos	Kappa= $2 (VP * VN - FN * FP) / [(VP +FP) (FP + VN) + (VP + FN) (FN +VN)]$		
<b>Siendo:</b>			
FP: Falsos Positivos (Es la probabilidad o frecuencia con que la muestra sea asignada como positiva cuando en realidad es negativa).			
FN: Falsos Negativos (Es la probabilidad o frecuencia con que una muestra conocida como positiva se aginada como negativa por el método)			
VP: Verdaderos positivos obtenidos por el método de estudio			
VN: Verdaderos negativos obtenidos por el método de estudio			

La exactitud analizada, es la capacidad de un método de detectar al analito en todos los casos en que en este se encuentre en una muestra. Los resultados aportados por el proceso de verificación fueron óptimos, siendo un 100%. Cumpliendo con la especificación establecida >90%.

$$\text{EXACTITUD} = \frac{VP+VN}{VP+FP+VN+FN} = \frac{24+8}{24+0+8+0} * 100 = 100\%$$

La sensibilidad analizada, dio como resultado un 100%, lo cual indica que el método tiene la capacidad de encontrar en las concentraciones utilizadas el analito de interés. Cumpliendo con la especificación establecida >90%.

$$\text{SENSIBILIDAD} = \frac{\text{POSITIVO VERDADERO}}{\text{POSITIVO VERDADERO} + \text{FALSO NEGATIVO}} = \frac{24}{24+0} \times 100 = 100\%$$

La especificidad analizada, determina que en el 100% de los casos el método es capaz de identificar la ausencia del analito sin importar interferencia de matrices o analitos interferentes. Cumpliendo con la especificación establecida >90%.

$$\text{ESPECIFICIDAD} = \frac{\text{NEGATIVO VERDADERO}}{\text{NEGATIVO VERDADERO} + \text{FALSO POSITIVO}} = \frac{8}{8+0} \times 100 = 100\%$$

La concordancia estadística para métodos cualitativos (Kappa), es una medida de la relación existente entre las mediciones realizadas; comparándola con los datos aportados en términos de presencia-ausencia. Para el caso de esta verificación el resultado fue óptimo, dando un resultado de 1, la cual, es considerada como muy buena, según las especificaciones establecidas.

$$\begin{aligned} \text{Kappa} &= 2 * \frac{\text{VP} * \text{VN} - \text{FN} * \text{FP}}{(\text{VP} + \text{FP}) * (\text{FN} + \text{VN}) + (\text{VP} + \text{FN}) * (\text{FN} + \text{VN})} \\ &= 2 * \frac{24 * 8 - 0 * 0}{(24 + 0) * (0 + 8) + (24 + 0) * (0 + 8)} = 1 \end{aligned}$$

La tasa de falsos positivos y tasa de falsos negativos es un indicador de la confiabilidad de los resultados aportados por el método, este ligado a los demás parámetros estadísticos anteriormente analizados.

$$\begin{aligned} \text{TASA DE FALSOS POSITIVOS} &= \frac{\text{FALSOS POSITIVOS}}{\text{VERDADEROS POSITIVOS} + \text{FALSO POSITIVO}} \\ &= \frac{0}{24 + 0} = 0 \end{aligned}$$

**TASA DE FALSOS NEGATIVOS**

$$= \frac{\text{FALSOS NEGATIVOS}}{\text{VERDADEROS NEGATIVOS} + \text{FALSOS NEGATIVOS}} = \frac{0}{8 + 0} = 0$$

## 10. ANALISIS DE RESULTADOS

### **10.1 Resultados de la detección cualitativa de *Campylobacter* spp. por metodología VIDAS CAM**

Los resultados arrojados de las detecciones en las matrices no inoculadas (control negativo), son un punto importante por resaltar, ya que la muestra M2 correspondiente a carne cruda de beneficio se encontraba positiva para *Campylobacter* spp.. Esta misma muestra positiva fue utilizada para realizar el enjuague de carcasa (M3) y el esponjado (M4); la cual, al momento de la detección de *Campylobacter* spp. arrojan resultados negativos. Se descarta cualquier posible contaminación cruzada en el laboratorio de la M2 con las muestras inoculadas, ya que, las condiciones en las que se procesaron los controles negativos fueron monitoreadas y apartadas de las muestras inoculadas, realizando el montaje para la detección de *Campylobacter* spp. en el equipo VIDAS primeramente de los controles negativos, descartando una posible contaminación al momento del pipeteo, también, se destaca la hermeticidad de la muestra a través de la CombiBag (bolsa donde se dispone la muestra con el diluyente y el inductor a la microerófilia (GenBox)) la cual, se mantiene totalmente sellada para asegurar las condiciones ambientales inducidas. Igualmente, se resalta que la lectura del control negativo de la M2 se realizó por duplicado donde ambos resultados dieron positivo.

No se realizó alguna confirmación de *Campylobacter* spp. en la muestra M2 debido a que según el protocolo de verificación estandarizado por la ISO 16140-3, la muestra debía ser automáticamente invalidada del proceso de verificación, ya que no cumple como un soporte que confirme la concentración 0 UFC de una matriz, en donde se busca poner a prueba el límite mínimo para la detección; por ende, estando la M2 positiva para *Campylobacter* spp., no se puede hablar de estimar un límite de detección cuando la concentración no se ubica sobre un límite, y aún más, su concentración es desconocida.

Existen metodologías vigentes que aprueba en muestreo de *Campylobacter jejuni* (ISO 10272-1:2016) en canales a través de espolado y lavado de carcasa, en donde posiblemente no se asegura dar conformidad a un alimento frente a la presencia de *Campylobacter* spp.. Se resalta que para dar una explicación relevante a ausencia de *Campylobacter* spp. en las muestras de ambientes de producción, como en éste caso el esponjado y el lavado de carcasa, es necesario ampliar mucho más en el estudio y analizar en profundidad los factores que influyen en la detección de éste microorganismo en diferentes matrices, pero se podría inferir a una posible colonización al interior de la musculatura del pollo, donde las condiciones ambientales puede variar; disminuyendo la concentración de oxígeno y por ende, el estrés oxidativo, y aumentando el tropismo del microorganismo hacia estímulos ambientales que lo favorecen (Hermans, y otros, 2011).

También, se podría resaltar las intervenciones químicas de desinfección y conservación, posterior al sacrificio, las cuales, juegan un papel fundamental en las condiciones físicas en la superficie de la canal; causando modificaciones en el pH de la superficie y cambios en la saturación salina de la muestra, inhibiendo el crecimiento de *Campylobacter* spp. a valores de pH inferiores a 4,0 y a concentraciones de sales superiores al 1%. Cabe resaltar que los desinfectantes más utilizados es el ácido ascórbico, ácido láctico al 2% y cloruro de sodio acidificado (INS, 2013), los cuales rinden con niveles de eficacia durante cada intervención en la superficie del canal, pero los resultados al interior de la musculatura pueden variar dependiendo del tiempo de contacto y la concentración.

Se resalta igualmente, la constante exposición fisicoquímica que sufre la superficie de la canal, donde no solo se ve modificada por condiciones químicas alterantes; sino, por condiciones físicas, en la cual, procesos de desinfección posterior al sacrificio utilizando condiciones modificadas como la luz UV se pueden ver infructuosos al interior de la musculatura, debido al grosor e interferencia que sufren los rayos para penetrar las profundidades de la canal, esto se puede modificar mediante el tiempo de exposición que puede sufrir el cárnico.

## **10.2 Valor de Test VT**

El valor del test no es directamente proporcional a la cantidad de analito, es decir, no se puede utilizar como indicativo de la concentración de los microorganismos detectados en la muestra, pero puede ser un estimado de la calidad de la reacción antígeno-anticuerpo medido por la cantidad de luz producida por la fluorescencia captada por el lector del equipo. Se puede evidenciar que a pesar de que los valores del VT son altos en las muestras M1, M3 y M4, en comparación con muestra M2, esto no es así; esta situación se puede deducir a la edad del cultivo celular, causando probablemente interferencias por productos metabólicos generados durante el deceso de la curva de crecimiento del microorganismo, variando con el pH, fuerza iónica y estructura antigénica, afectando indirectamente la reacción antígeno-anticuerpo. Igualmente, otro factor que podría alterar la reacción antígeno anticuerpo y causar problemas con la señal de detección; es el contenido de grasa que posee la pechuga de pollo (M2) generando lípidos en suspensión que, aunque no reacciona de manera específica estorban en la unión antígeno-anticuerpo y también crean una dispersión luminosa al momento de traducir la señal. Se resalta que la desviación estándar de la M2 es más baja que en las demás muestras, debido probablemente a la baja calidad en la respuesta antígeno-cuerpo lo cual controla más los valores del VT. Es bueno resaltar que, a pesar de las posibles interferencias en la M2, el equipo VIDAS puede generar una respuesta en estimación a la calidad de la reacción antígeno anticuerpo y emitir un resultado lo suficientemente fuerte para confirmar la presencia de *Campylobacter* spp. con un VT >1.0 en casi todos los niveles de detección.

## **10.3 Paramentos estadísticos evaluados**

### **10.3.1 LOD50**

Los resultados emitidos de cara al límite de detección arrojan resultados positivos, en el cual cumple con las especificaciones descritas por el proveedor, donde se

estipula la concentración mínima que posee la metodología para poder detectar un analito en una porción de prueba; para este caso el LOD50 del nivel más bajo, correspondía a 1UFC/porción la cual fue detectada correctamente en cada una de las matrices utilizadas, demostrando la alta sensibilidad de la metodología VIDAS CAM para establecer la presencia de *Campylobacter* spp. en una porción de muestra.

### **10.3.2 Otros parámetros estadísticos**

La tasa de falsos positivos y falsos negativos presentados en la tabla 8, demuestran que ningún resultado tuvo una asignación incorrecta; siendo el 100% de los resultados positivos asignados correctamente bajo una detección positiva, no teniendo ninguna de las matrices no inoculadas un reporte erróneamente positivo. Igualmente, los resultados de la tasa de falsos negativos se encuentran establecidos de forma coherente a la metodología realizada, en donde ningunos de los resultados positivos fueron asignados erróneamente negativo, demostrando la fiabilidad en los resultados obtenidos.

La sensibilidad y especificidad registraron porcentajes acordes a los detallados por el proveedor, en donde se detalla una sensibilidad y especificidad >90%. Durante nuestro proceso de verificación de obtiene una sensibilidad del 100% evidenciando la capacidad que tiene la metodología VIDAS CAM para detectar asertivamente los antígenos presentes de *Campylobacter* spp. en la muestra. Igualmente, la especificidad registrada en el proceso de verificación fue del 100%, en donde se asignó de forma correcta la ausencia en *Campylobacter* spp. en las matrices no inoculadas. La exactitud tuvo resultados positivos, encontrándose dentro de los valores de referencia de la metodología. Estos resultados obtenidos son un reflejo de la alta especificidad en la reacción antígeno-anticuerpo que se produce al interior de la fase solida (SPR) lo cual permite generara resultados mucho más sensibles en comparación por otras metodologías, confiriéndole más fiabilidad a los resultados aportados.

La concordancia estadística Kappa para métodos cualitativos demuestra la cantidad de dispersión en cuanto a la obtención de datos cualitativos, esto genera un valor numérico, el cual, entre, más cercano a 1 se encuentre, es considerado más concordante; en este caso los datos presentaron una concordancia de 1 lo que representa un valor realmente positivo para el proceso de verificación, siendo acorde a los demás análisis estadísticos obtenidos.

Los resultados de sensibilidad y especificidad reportados en éste proceso de verificación de las metodología VIDAS CAM son acordes a los registrados en otras investigaciones. Al ser comparados los resultados con los obtenidos en investigaciones realizadas por Altun y colaboradores en matrices de carne picada, la sensibilidad obtenida es igualmente del 100% (Altun, Gurbuz, & Erdenlig, 2015). De manera concordante, estudios realizados por Razzuoli en el 2018 bajo matrices lácteas se obtiene resultados de especificidad y sensibilidad del 100% para la detección de *Campylobacter* spp. mediante la metodología VIDAS CAM (Razzuoli, y otros, 2018); siendo resultados acordes a los arrojados en nuestro proceso de verificación, dándonos seguridad y soporte al momento de presentar los datos.

En general a tasa de falso positivos, falsos negativos, especificidad, sensibilidad, exactitud y concordancia Kappa tuvieron excelentes resultados durante el proceso de verificación; donde ninguna matriz en ningún nivel de detección presento errores, incluyendo los niveles más bajos del inóculo, logrando demostrar que incluso en el LOD1 el cual se estimaba una concentración límite de detección del inóculo de 1UFC/porción de muestra se consigue recuperar el microorganismo y detectarlo mediante inmunofluorescencia; demostrando la alta eficacia que puede brindar la metodología VIDAS CAM frente a resultados veraces, tiempo e insumos, cumpliendo con los parámetros de sensibilidad y especificidad estipulados en el proceso de validación realizado por el proveedor.

Durante el proceso de verificación se demuestra que análisis de detección de *Campylobacter* spp. a través de metodología VIDAS CAM se realiza de manera correcta dentro de las condiciones inducidas en el laboratorio prestador de servicios,

brindando resultados acordes a los determinados por la metodología validada por el proveedor, dando evidencia del correcto funcionamiento metodológico que se realiza dentro del laboratorio y el correcto manejo de insumos y equipos durante las detecciones que se realizan.

## 11. CONCLUSIONES

El proceso de verificación evidencia satisfactoriamente el desempeño de la metodología VIDAS CAM para la detección de *Campylobacter* spp. en muestras cárnicas crudas, procesadas, y ambientes de producción (esponjado y lavado de carcasa); logrando plantear y ejecutar satisfactoriamente la detección del microorganismo, obteniendo resultados óptimos, con un LOD50 no superior a 4xLLI, una especificidad y sensibilidad del 100% y una concordancia Kappa 1, resaltando la alta calidad del análisis para la detección de *Campylobacter* spp.. Las mediciones estadísticas cualitativas referenciadas, demuestran la viabilidad y la capacidad que posee el laboratorio prestador de servicios de llevar a cabo la metodología bajo las condiciones inducidas dentro del laboratorio, cumpliendo con el desempeño dictado por el proveedor.

Con base a los resultados obtenidos por la validación de la metodología VIDAS CAM realizada por el proveedor en un ensayo para un solo laboratorio, con una sensibilidad de 98%, en referencia con los resultados mencionados anteriormente en este proceso de verificación, se comprueba el cumplimiento de la especificación detallada de la metodología VIDAS CAM, obteniendo resultados acordes a los planteados.

## 12. RECOMENDACIONES O SUGERENCIAS

Se sugiere en futuras investigaciones profundizar y realizar estudios cara a la detección de *Campylobacter* spp. en muestras de ambientes de producción, como esponjados y lavados de carcasa, utilizando muestras de canales positivas, con el fin de verificar la idoneidad y la capacidad de recuperación del microorganismo durante metodologías de muestreo para *Campylobacter* spp. estipuladas a nivel nacional.

Como recomendación general a la Universidad de Pamplona; persistir continuamente en la búsqueda de equipos e insumos que permitan enriquecer y fortalecer el conocimiento de sus estudiantes mediante nuevas alternativas para la detección de microorganismos, toxinas y sustancias a fines, permitiendo realizar futuras investigaciones contribuyendo al renombre institucional, departamental e internacional.

Como sugerencia al laboratorio prestador de servicios donde se realizó el proceso de verificación, continuar con su calurosa acogida a futuros profesionales, brindando un espacio para el fortalecimiento y desenvolvimiento de aptitudes y conocimientos, contribuyendo en la vida laboral y personal que empieza con cada uno de sus pasantes.

### 13. GLORARIO

**Anticuerpo:** también llamado inmunoglobulinas, son producto de las células B formando parte del sistema inmune, siendo una herramienta de defensa. Su función es reconocer sustancias extrañas como virus, bacterias o toxinas y neutralizarlas. Su estructura consiste en dos cadenas ligeras, dos cadenas pesadas y en su extremo una región hipervariable, ésta región cambia de un anticuerpo a otro (Graham, s.f.).

**Antígeno:** cualquier sustancia que un organismo reconoce como no propio, produciendo una respuesta inmunitaria contra ella. Dentro de los antígenos se incluyen toxinas, bacterias, virus, sustancias químicas, u otras sustancias ajenas del cuerpo (National Cancer Institute, 2020)

**Caldo CampyFood:** Medio de cultivo líquido listo para utilizar. Ideal para la recuperación bacteriana de *Campylobacter*. Cada bolsa contiene 225ml de medio de enriquecimiento y es utilizado para metodologías VIDAS CAM (BioMérieux., 2020).

**CombiBag:** Bolsa para incubar muestras que van para análisis de *Campylobacter*. Posee un filtro central y una bolsa central; su filtro central permite la recogida de una muestra libre de partículas que puedan dificultar el análisis, mientras que su bolsa interna es utilizada para contener el generador de atmósfera microaerófila (BioMérieux., 2020) .

**Índice Kappa:** Mide el grado de concordancia entre varias metodologías o analistas que clasifican un resultado según una serie de posibilidades mutuamente excluyentes. (INS, 2015).

**ELFA:** Esta técnica es similar a la ELISA, exceptuando que la enzima cataliza una fluorescencia, más no una reacción de color; utilizando un sustrato (4-metilumbeliferil fosfato) que produce un producto fluorescente en lugar de un color visible, interaccionando la enzima ligada al anticuerpo (BioMerieux).

**Equipo DensiCHEK:** es una herramienta utilizada para medir la densidad óptica de una suspensión microbiana (BioMérieux., 2020).

**Equipo VIDAS:** es un sistema automatizado de detección de patógenos mediante métodos inmunológicos. Este sistema posee cinco compartimientos independientes, cada uno con espacios para recibir hasta 6 tiras reactivas VIDAS. El equipo VIDAS se basa en el ensayo fluorescente ligado a enzima (ELFA) (BioMérieux., 2020).

**LOD50:** Es el límite de detección para pruebas cualitativas, definiendo el número de organismos por gramo o mililitro en los cuales el 50% de las pruebas son positivas. Es usado en metodologías microbiológicas para precisar un rango específico de partículas en el que en método es capaz de detectar la mínima cantidad de analito en una porción (INS, 2015)

**Métodos cualitativos:** Es un método de análisis cuya respuesta es la presencia o ausencia de un analito en una porción de muestra, en donde la respuesta instrumental es transformada en respuesta binaria de ausencia o presencia (GMIGLIARINO., 2020).

**Patrón McFarland:** son estándares utilizados como referencia para ajustar la densidad del inóculo en una suspensión bacteriana. Su preparación se genera mediante la precipitación de compuestos químicos para formar una turbidez reproducible, añadiendo ácido sulfúrico a una solución acuosa de cloruro de bario produciendo la precipitación de sulfato de bario suspendido (Becton, Dickinson and Company., 2005)

**Validación:** según la ISO 9001 la validación es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista (ISO, 2015)

**Verificación:** según la ISO 9001 un proceso de verificación es la confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos

especificados (ISO, 2015), en este caso los requisitos que se plantean en un proceso de validación.

## 14. BIBLIOGRAFÍA

- Acheson, D., & Allos, B. (15 de Abril de 2001). *Campylobacter jejuni Infections: Update on Emerging Issues and Trends*. Obtenido de Clinical Infectious Diseases, Volume 32: <https://doi-org.unipamplona.basesdedatosezproxy.com/10.1086/319760>
- Altun, S., Gurbuz, S., & Erdenlig, S. (2015). *Efficiency of Mini VIDAS and Culture Technique for Detection of Campylobacter Spp. In Minced Beef*. Obtenido de <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/308515>
- Becton, Dickinson and Company. (2005). *Patrón de turbidez BBL preparado. McFarland Turbidity Standard No. 0.5*. Obtenido de [https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421\(0205\)\\_es.pdf](https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421(0205)_es.pdf)
- Benemérita, E. B. (2007). *Validación y Verificación de Sistemas de Medición en el Laboratorio Clínico*. Obtenido de Universidad Autónoma de Puebla, México: <https://www.ifcc.org/media/216093/Validacion.pdf>
- BioMérieux. (2020). *VIDAS®*. Obtenido de Detección de patógenos: <https://www.biomerieux.es/microbiologia-industrial/vidasr>
- BioMérieux, I. (s.f.). *VIDAS® Campylobacter (CAM) Ultra Performance Summary*. Obtenido de [https://www.biomerieux-usa.com/sites/subsidiary\\_us/files/vidas\\_campylobacter\\_cam\\_8.5x11\\_v4.pdf](https://www.biomerieux-usa.com/sites/subsidiary_us/files/vidas_campylobacter_cam_8.5x11_v4.pdf)
- BioMérieux. (2020). Obtenido de <https://biomerieuxdirect.com/industry/>
- Butzler, J.-P. (2004). *Campylobacter, from obscurity to celebrity*. Obtenido de Clin Microbiol Infect: <https://doi-org.unipamplona.basesdedatosezproxy.com/10.1111/j.1469-0691.2004.00983.x>

- Camaró, M., Martínez, R., Olmos, P., Catalá, V., Maria, O., & Gimeno, C. (2015). *Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(7), e31-e36. Obtenido de <https://doi-org.unipamplona.basesdedatosezproxy.com/10.1016/j.eimc.2013.11.010>
- CDC. (20 de Diciembre de 2019). *Centers for Disease Control and Prevention*. Obtenido de *Campylobacter (campilobacteriosis). Brotes causados por Campylobacter, por categoría de alimentos 2010-2017.*: <https://www.cdc.gov/campylobacter/outbreaks/outbreaks.html>
- CEM. (2012). *Vocabulario Internacional de Metrología. Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados*. Obtenido de Centro Español de Metrología: <https://www.cem.es/sites/default/files/vim-cem-2012web.pdf>
- Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. (2019). *Campylobacter (campilobacteriosis). Brotes causados por Campylobacter, por categoría de alimentos, 2010-2017*. Obtenido de <https://www.cdc.gov/campylobacter/index.html>
- Domenech, M., & Gascon, N. (2017). *Interferencias en los procedimientos de medida inmunoquímicos*. Obtenido de *Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular*.: [https://www.seqc.es/download/revista/278/1114/1192001922/1024/cms/Qu%C3%ADmica%20Cl%C3%ADnica%201997;16%20\(4\)%20214-217.pdf/](https://www.seqc.es/download/revista/278/1114/1192001922/1024/cms/Qu%C3%ADmica%20Cl%C3%ADnica%201997;16%20(4)%20214-217.pdf/)
- EMA. (2008.). *Entidad Mexicana de Acreditación*. Obtenido de *Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico.*: <http://qualitat.cc/sitebuildercontent/sitebuilderfiles/CENAM.EMA.Validacion-verificacion.pdf>

- Escherich, T. (1886). Beitrage zur Kenntniss der Darmbakterien. III. Ueber das Vorkommen von Vibrionen im Darmcanal und den Stuhlgangen der Sauglinge. 815, 817.
- GMIGLIARINO. (2020). *Validación de Métodos Cualitativos "Casos de Aplicación"*. Obtenido de <https://www.qcnet.com/Portals/75/PDFs/Validacion%20de%20Metodos%20Cualitativos.pdf>
- Goding, J. W. (1996). *Monoclonal Antibodies (Third Edition). Immunofluorescence*. Obtenido de Department of Pathology and Immunology, Monash University, Alfred Hospital, Prahran, Victoria, Australia: <https://doi-org.unipamplona.basesdedatosezproxy.com/10.1016/B978-012287023-1/50060-2>
- Gölz, G., Kittler, S., Malakauskas, M., & Alter, T. (2018). *Survival of Campylobacter in the Food Chain and the Environment*. Obtenido de <https://doi-org.unipamplona.basesdedatosezproxy.com/10.1007/s40588-018-0092-z>
- Graham, B. (s.f.). *Antibodies*. Obtenido de National Human Genome Research Institute.: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Antibody>
- Hazeleger, W., Wouters, J., Rombouts, F., & Abee, T. (1998). *Physiological Activity of Campylobacter jejuni Far below the Minimal Growth Temperature*. Obtenido de American Society for Microbiology: <https://doi.org/10.1128/AEM.64.10.3917-3922.1998>.
- Hermans, D., Deun, K., Martel, A., Immerseel, F., Messenes, W., & Heyndrickx, M. (2011). *Colonization factors of Campylobacter jejuni in the chicken gut*. Obtenido de <https://doi-org.unipamplona.basesdedatosezproxy.com/10.1186/1297-9716-42-82>
- Hofreuter, D. (2014). *Defining the metabolic requirements for the growth and colonization capacity of Campylobacter jejuni*. Obtenido de Institute for

Medical Microbiology and Hospital Epidemiology. Hannover Medical School:  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00137>

INS. (2015). *Instituto Nacional de Salud*. Obtenido de VALIDADCIÓN DE MÉTODOS CUALITATIVOS PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO:  
<https://www.ins.gov.co/conocenos/sig/SIG/POE-R01.0000-014.pdf>

INS, I. N. (2013). *PERFIL DE RIESGO DE Campylobacter spp. EN POLLOS DE ENGORDE*. Obtenido de NSTITUTO NACIONAL DE SALUD:  
<https://www.ins.gov.co/Direcciones/Vigilancia/Publicaciones%20ERIA%20y%20Plaguicidas/PERFIL%20CAMPYLOBACTER%20EN%20POLLOS.pdf>

Ketley, J. (1997). *Pathogenesis of enteric infection by Campylobacter*. Obtenido de Society for General Microbiology : <https://doi.org/10.1099/00221287-143-1-5>

Madigan, M., Martinko, J., Paul, D., & Clark, D. P. (2009). BROCK. Biología de los microorganismos. DUODÉCIMA EDICIÓN. PEARSON EDUCACIÓN, S.A.,. Obtenido de PEARSON EDUCACIÓN, S.A.,: Documento PDF

Ministerio de la Protección Social. (2007). *Resolución 4287*. Obtenido de [https://www.minsalud.gov.co/Normatividad\\_Nuevo/RESOLUCI%C3%93N%204287%20DE%202007.pdf](https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/RESOLUCI%C3%93N%204287%20DE%202007.pdf)

Ministerio de Salud y Protección Social. (2012). *DECRETO NÚMERO 2270*. Obtenido de <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/Decreto-2270-de-2012.pdf>

Ministerio de Salud y Protección Social. (2013). *Resolución 242*. Obtenido de <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/resolucion-0242-de-2013.pdf>

Ministerio de Salud y Protección Social. (2015). *Resolución 1619*. Obtenido de <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/resolucion-1619-del-2015.PDF>

- Ministerio de Salud y Protección Social. (2015). *Resolución 2690*. Obtenido de [https://www.minsalud.gov.co/Normatividad\\_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%202690%20de%202015.pdf](https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%202690%20de%202015.pdf)
- National Cancer Institute. (2020). *Antigen*. Obtenido de <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/antigen>
- OMS. (01 de Mayo de 2020). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de *Campylobacter*. Fuentes y transmisión: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>
- Organización Internacional de Normalización. (2006). *ISO10272-1. Microbiología de alimentos y piensos: método horizontal para la detección y enumeración de Campylobacter spp. - Parte 1: Método de detección*. Documento PDF.
- Organización Internacional de Normalización. (2016). *ISO 16140-3. Microbiología de la cadena alimentaria - Validación de métodos - Parte 3: Protocolo para la verificación de métodos de referencia y métodos alternativos validados en un solo laboratorio*. Documento PDF.
- Organización Internacional de Normalización. (2017). *ISO 17025. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*. Documento PDF.
- Pan American Health Organization. (2002). *VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS. Buenas Prácticas para Laboratorios Nacionales de Control Farmacéutico*. Obtenido de [https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13\\_Modulo\\_VALIDACION\\_de\\_Metodos\\_Fisicoqcos.pdf](https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13_Modulo_VALIDACION_de_Metodos_Fisicoqcos.pdf)
- Park, S. (2002). *The physiology of Campylobacter species and its relevance to their role as foodborne pathogens*. Obtenido de *International journal of food microbiology*: <https://doi->

org.unipamplona.basesdedatosezproxy.com/10.1016/S0168-1605(01)00678-X

- Penner, J. L. (1988). *The Genus Campylobacter: a Decade of Progress*. Obtenido de American Society for Microbiology: <https://doi.org/10.1128/cmr.1.2.157>
- Razzuoli, E., Vencia, W., Fedele, V., Mignone, G., Lazzara, F., & Rubini, D. (2018). *Evaluation and validation of an alternative method to detect Campylobacter spp. in dairy products*. Obtenido de Italian Journal of Food Safety: <https://doi.org/10.4081/ijfs.2018.7180>
- Sánchez, E. N. (2014). Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico. *REVISTA CON-CIENCIA*.
- Shange, N., Gouws, P., & Hoffman, L. C. (2019). *Campylobacter and Arcobacter species in food-producing animals: prevalence at primary production and during slaughter*. Obtenido de World Journal of Microbiology and Biotechnology: <https://doi-org.unipamplona.basesdedatosezproxy.com/10.1007/s11274-019-2722-x>
- Tamagnini, L., & Paraje, M. (2015). ¿Qué son las bacterias viables no cultivables? (revisión bibliográfica). *Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba*, VOL. 2, NO. 2. Obtenido de Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba,.
- Ugarte, M. (2015). *Detección y caracterización de Campylobacter procedentes de animales, alimentos y agua residual*. Obtenido de UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID. Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET): <https://www.visavet.es/data/tesis/deteccion-caracterizacion-campylobacter-procedentes-animales-alimentos-agua-residual.pdf>

## 15. Anexos

**Anexo 1** Resultados emitidos por el equipo VIDAS según la metodología CAM para la detección de *Campylobacter* spp. en muestras no inoculadas de carne procesada lista para el consumo (M1), carne de pollo de beneficio (M2), enjuague de carcasa (M3) y esponjado de canal (M4).

Lista de resultados

Imprimido el 07 nov 2020 12:08:52

Muestra	Test	Result. Unidad	Dil. Interpr.	Status	Fecha	Sección
M1BLANCO	CAM	0.02	Negativo	Correcto	30/10/2020 10:52	680
M1BLANCO	CAM	0.02	Negativo	Correcto	30/10/2020 10:52	680
M2BLANCO	CAM	0.17	Positivo	Correcto	30/10/2020 10:52	680
M2BLANCO	CAM	0.10	Positivo	Correcto	30/10/2020 10:52	680
M3BLANCO	CAM	0.02	Negativo	Correcto	30/10/2020 10:52	680
M3BLANCO	CAM	0.03	Negativo	Correcto	30/10/2020 10:52	680
M4BLANCO	CAM	0.01	Negativo	Correcto	30/10/2020 10:53	681
M4BLANCO	CAM	0.01	Negativo	Correcto	30/10/2020 10:53	681

**Anexo 2** Resultados emitidos por el equipo VIDAS según la metodología CAM para la detección de *Campylobacter spp.* en muestras inoculadas según cada nivel de contaminación durante el proceso de verificación

Lista de resultados

Imprimido el 07 nov 2020 12:09:48

Muestra	Test	Result. Unidad	Dil. Interpr.	Status	Fecha	Sección
M1L0D10	CAM	3.39	Positivo	Correcto	30/10/2020 11:16	682
M1L0D10	CAM	3.64	Positivo	Correcto	30/10/2020 11:16	682
M2L0D10	CAM	0.54	Positivo	Correcto	30/10/2020 11:16	682
M2L0D10	CAM	0.48	Positivo	Correcto	30/10/2020 11:16	682
M3L0D10	CAM	1.33	Positivo	Correcto	30/10/2020 11:16	682
M3L0D10	CAM	1.86	Positivo	Correcto	30/10/2020 11:16	682
M4L0D10	CAM	3.33	Positivo	Correcto	30/10/2020 11:17	683
M4L0D10	CAM	3.17	Positivo	Correcto	30/10/2020 11:17	683
M1L0D5	CAM	3.46	Positivo	Correcto	30/10/2020 12:40	684
M1L0D5	CAM	3.53	Positivo	Correcto	30/10/2020 12:40	684
M3L0D5	CAM	3.47	Positivo	Correcto	30/10/2020 12:40	684
M3L0D5	CAM	3.72	Positivo	Correcto	30/10/2020 12:40	684
M4L0D5	CAM	2.91	Positivo	Correcto	30/10/2020 12:40	684
M4L0D5	CAM	2.36	Positivo	Correcto	30/10/2020 12:40	684
M1L0D1	CAM	2.43	Positivo	Correcto	30/10/2020 12:41	685
M1L0D1	CAM	3.06	Positivo	Correcto	30/10/2020 12:41	685
M3L0D1	CAM	1.03	Positivo	Correcto	30/10/2020 12:41	685
M3L0D1	CAM	3.84	Positivo	Correcto	30/10/2020 12:41	685
M4L0D1	CAM	3.85	Positivo	Correcto	30/10/2020 12:41	685
M4L0D1	CAM	3.06	Positivo	Correcto	30/10/2020 12:41	685

**Anexo 3** Repetición del proceso de verificación para la detección de *Campylobacter* spp. mediante metodología VIDAS CAM en la muestra de carne de pollo de beneficio sin inoculación.

Lista de resultados

Imprimido el 07 nov 2020 12:10:57

Muestra	Test	Result. Unidad	Dil. Interpr.	Status	Fecha	Sección
BLANCO M2	CAM	0.02	Negativo	Correcto	06/11/2020 18:25	760
BLANCO M2	CAM	0.02	Negativo	Correcto	06/11/2020 18:25	760

**Anexo 4** Repetición del proceso de verificación para la detección de *Campylobacter* spp. mediante metodología VIDAS CAM en la muestra de carne de pollo de beneficio según cada nivel de contaminación.

Lista de resultados

Imprimido el 07 nov 2020 12:11:22

Muestra	Test	Result. Unidad	Dil. Interpr.	Status	Fecha	Sección
M2-L0D1	CAM	1.03	Positivo	Correcto	07/11/2020 11:09	768
M2-L0D1	CAM	1.10	Positivo	Correcto	07/11/2020 11:09	768
M2-L0D5	CAM	1.10	Positivo	Correcto	07/11/2020 11:09	768
M2-L0D5	CAM	1.11	Positivo	Correcto	07/11/2020 11:09	768
M2-L0D10	CAM	1.07	Positivo	Correcto	07/11/2020 11:09	768
M2-L0D10	CAM	1.08	Positivo	Correcto	07/11/2020 11:09	768