



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENCIA DE *Campylobacter* spp. DURANTE EL PROCESAMIENTO
PRIMARIO DEL POLLO DE ENGORDA EN UN ESTABLECIMIENTO
TIPO INSPECCION FEDERAL

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:
OLIVARES HERNÁNDEZ TERESA

TUTORA:
CECILIA ROSARIO CORTÉS
(Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM)

COMITÉ TUTOR:
ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ
(Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM)

RUBÉN MERINO GUZMÁN
(Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM)

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., ENERO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mi esposo **Rubén**, por su apoyo incondicional

Al mejor regalo de Dios, mis hijos

Iván, Yael e Iyari, por todo su amor.

A mis padres **Elena y Jorge** (Q.E.P.D)

por su confianza, esfuerzo y enseñanzas.

A mis hermanos **Laura Angélica y Jorge Luis**.

Los amo

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por la formación académica y darme una identidad como profesionista.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por la beca otorgada para sustentar mis estudios de posgrado

Al **Departamento de Medicina y Zootecnia de aves** de la FMVZ-UNAM, por su ayuda para terminar con éxito este proyecto.

A mi tutora, **Dra. Cecilia Rosario Cortés** porque su apoyo, motivación y enseñanzas me permitieron concluir mis estudios de posgrado.

Dr. Antonio Verdugo Rodríguez, gracias infinitas por aceptar participar en este trabajo y enriquecerlo con sus conocimientos y comentarios.

A los miembros de mi jurado por su tiempo en la revisión de mi trabajo, sus contribuciones fueron muy valiosas.

CONTENIDO

INDICE	¡Error! Marcador no definido.
ABREVIATURAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE CUADROS	iv
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
JUSTIFICACIÓN	6
HIPÓTESIS	7
OBJETIVO.....	7
MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
I. Aislamiento e identificación de <i>Campylobacter</i> spp.	8
II. Detección de <i>Campylobacter</i> spp. por biología molecular	9
Extracción del ADN.....	9
Prueba de PCR en tiempo real	10
RESULTADOS.....	11
Detección de <i>Campylobacter</i> spp. por el método convencional.....	11
Detección de <i>Campylobacter</i> spp. por PCR.....	12
DISCUSIÓN	14
CONCLUSIONES.....	24
REFERENCIAS.....	25
ANEXOS	32

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

CDC: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades

Ct: Número de ciclos en el que la fluorescencia alcanza el límite de detección y que es directamente proporcional a la cantidad inicial del ADN blanco

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FDA: Agencia de Alimentos y Medicamentos

FSIS: Servicio de Seguridad Alimentaria e Inspecciones

HACCP: Análisis de Riesgo y Puntos Críticos de Control

ICMSF: Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas de los Alimentos

ISO: Organización de Estándares Internacionales

mCCDA: Desoxicolato-Cefoperazona-Carbón modificado

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

TIF: Tipo Inspección Federal en México

USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de muestras positivas a *Campylobacter* spp. durante el procesamiento del pollo de engorda detectadas por PCR en tiempo real.

Figura 2. Tinción de Gram en la que *Campylobacter* spp. se observa como una bacteria Gram (-) pequeña con forma espiral y curvada.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Identificación de los puntos de muestreo en la planta de procesamiento para el aislamiento de *Campylobacter* spp

Cuadro 2. Características bioquímicas de especies termófilas de *Campylobacter* spp.

Cuadro 3. Componentes de la muestra y controles utilizados en cada reacción de PCR en tiempo real para la detección de *Campylobacter* spp.

Cuadro 4. Condiciones de amplificación utilizados en el termociclador Rotor-Gene® para la detección de *Campylobacter* spp.

Cuadro 5. Presencia de *Campylobacter* spp. en muestras de ave (n= 5) en cuatro etapas del procesamiento primario identificadas mediante PCR en tiempo real.

Cuadro 6. Colonias bacterianas sospechosas a *Campylobacter* spp. en tres medios selectivos sembrados con muestras de hisopo cloacal o enjuague de canal.

Cuadro 7. Frecuencia de aislamientos de *Campylobacter* spp. en tres medios selectivos a partir de la siembra de colonias sospechosas provenientes de muestras tomadas en cuatro etapas del procesamiento primario del pollo de engorda.

Cuadro 8. Frecuencia del aislamiento de *Campylobacter* spp. en cuatro etapas del procesamiento primario en canales de pollo provenientes de cinco lotes de aves.

RESUMEN

Olivares Hernández Teresa. Presencia de *Campylobacter* spp. durante el procesamiento primario del pollo de engorda en un establecimiento Tipo Inspección Federal.

El pollo de engorda es un hospedero natural de *Campylobacter* spp., y un importante agente zoonótico que se relaciona con la etiología de gastroenteritis en todo el mundo. La colonización del tracto gastrointestinal de las aves con las especies termófilas de *Campylobacter*, desde su crianza y hasta la edad de sacrificio, sugiere la persistencia de la bacteria y por consecuencia la contaminación de las canales durante su procesamiento. En este trabajo se analizaron 100 muestras (hisopos cloacales y canales) provenientes de cinco lotes comerciales de pollo de engorda, en cuatro etapas del procesamiento primario en un establecimiento Tipo Inspección Federal (TIF) por el método convencional y un kit comercial de PCR en tiempo real. Los resultados obtenidos por el método convencional muestran la presencia de *Campylobacter* spp. en el 26% de las muestras, y con el estudio molecular se detectó en el 77% de las mismas. Con ambos procedimientos se identificó la presencia del patógeno a lo largo del proceso de sacrificio. Los resultados confirman la presencia de *Campylobacter* spp. en canales de pollo de engorda, y muestran la importancia de las aves en la transmisión del patógeno.

Palabras clave: *Campylobacter*, pollo de engorda, procesamiento primario, Tipo Inspección Federal.

ABSTRACT

Broiler chicken is a natural host for *Campylobacter*, which is a very important zoonotic agent related to human gastroenteritis around the world. Colonization of the gastrointestinal tract of these birds with thermophilic species of *Campylobacter*, from rearing to slaughter age, indicates the bacteria persistence and, therefore, the potential carcass contamination during the processing. In this study, 100 samples (cloacal swab and carcass rinse) from 5 batches of commercial broiler chickens were taken in 4 steps of the slaughtering process in a Federal Inspection Type slaughtering plant. All samples were analyzed by both, the conventional bacteria isolation method, and by using a commercial real time PCR kit. Results from this study show that conventional method detected *Campylobacter* in 26% of the samples, meanwhile 77% of the samples were positive by the real-time PCR test. Both tests confirmed the presence of *Campylobacter* during different stages of the slaughtering process of broiler chickens, and enhances the importance of testing for this pathogen in chicken carcasses since they can be a source of potential contamination for humans.

Key words

Campylobacter spp., Broiler chicken, processing, Federal Inspection Type

INTRODUCCIÓN

La presencia de *Campylobacter* spp en alimentos como el pollo, representa una amenaza a la salud pública con fuertes implicaciones en el comercio nacional e internacional de los alimentos. Lo anterior adquiere relevancia en México ya que según reportes de la Unión Nacional de Avicultores el sector avícola alcanzó el 63.6 de la producción pecuaria nacional, y el consumo de la carne de ave es de 27.42 kg *per capita* (UNA, 2016).

El creciente desarrollo de la industria avícola y la necesidad mundial de producir alimentos inocuos, exige la implementación de medidas de control sanitario durante toda la cadena de producción del pollo de engorda y así evitar enfermedades transmitidas por el consumo de productos avícolas.

En los últimos treinta años, *Campylobacter* spp. ha sido objeto de una atención creciente por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS), así como de las autoridades sanitarias en la mayor parte de los países, ya que es uno de los principales microorganismos patógenos causantes de enfermedades gastrointestinales en humanos, asociadas con el consumo de carne de pollo (Hopkins y Scott, 1983; Oosterom *et al.*, 1983; Harris *et al.*, 1986; Deming *et al.*, 1987; Kapperud *et al.*, 1992; Frost, 2001; Stern *et al.*, 2003).

Las especies comúnmente asociadas con las enfermedades entéricas son *Campylobacter jejuni*, *C. coli* y *C. lari*, aunque la primera es la que se aísla con mayor frecuencia (Hermans *et al.*, 2012; Weinberger *et al.*, 2013). En los Estados Unidos, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés), señalan que la tasa de incidencia de infección por *Campylobacter* aumentó 13% en el 2014 en comparación con el período 2006-2008, con 845,024 casos y pérdidas económicas aproximadas de \$1,928,787,166 por gastos médicos, baja productividad y muertes (CDC, 2015). De igual manera, en la Unión Europea desde el año 2005, la campilobacteriosis es la enfermedad transmitida por los alimentos más comúnmente reportada. El número de casos

confirmados en 2014 fue de 236,851, con un aumento de 22,067 casos (10%), en comparación con 2013. De hecho, la mayoría de los estados miembros de la UE reportaron un aumento en el número de casos de campilobacteriosis en el 2014, lo que podría explicarse tanto por las mejoras en el sistema de vigilancia, como en la detección de el microorganismo de acuerdo a los informes de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2015).

El reconocimiento de *Campylobacter* spp. como un hospedero natural en el pollo de engorda (Berrang *et al.*, 2004; Rosenquist *et al.*, 2006) implica que, durante el proceso de sacrificio de las aves, la contaminación de las canales puede ocurrir no sólo por la alta carga bacteriana en el tracto gastrointestinal sino también por la presente en la piel y plumas. Además, la contaminación inicial del lote de origen de las aves, así como las condiciones higiénicas y sanitarias durante el procesamiento y conservación de la canal pueden influir y favorecer su permanencia en el alimento (Jeffrey *et al.*, 2001; Newell *et al.*, 2001; Byrd *et al.*, 2002). Al respecto, se considera que las etapas de desplume, evisceración y enfriamiento son críticas para que ocurra contaminación cruzada, ya que la bacteria puede transmitirse de una canal a otra por el equipo y maquinaria que realizan estas tareas (Potturi-Venkata *et al.*, 2007).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, reducir la prevalencia o concentración de la bacteria en un punto específico de la cadena de producción puede reducir el riesgo de incidencias en humanos. De ahí la importancia en la vigilancia y control de la bacteria a través de la elaboración e implementación de sistemas como el análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP por sus siglas en inglés) en establecimientos dedicados al sacrificio y procesamiento de aves. El HACCP es una parte integral de un sistema de inocuidad para cualquier producto alimenticio y que, en el caso particular del procesamiento permite el control de microorganismos patógenos en los productos avícolas (FSIS-USDA, 2016).

Sin duda, para lograr estos objetivos de inocuidad alimentaria es fundamental la disponibilidad y generación de información acerca de la epidemiología y la ecología del agente. Lo anterior expone una problemática en México, ya que la ausencia de políticas de vigilancia epidemiológica que involucren a *Campylobacter spp.* como organismo patógeno a controlar, dificulta el conocimiento sobre su incidencia real en la cadena de producción del pollo de engorda.

Así mismo, los datos disponibles sobre la incidencia de campilobacteriosis en humanos por causa del consumo de carne de origen aviar, son escasos. Al respecto en un estudio realizado de 2006 a 2007, Zaidi *et al.*, (2012), informaron sobre la identificación en un total de 11,811 muestras tomadas a partir de heces de niños menores de cinco años de edad con diarrea en hospitales estatales de Yucatán; así como en productos cárnicos crudos distribuidos en puntos de venta de pollo y de cerdo recolectados en rastros municipales, de 1,797 aislamientos de *Campylobacter spp.* (57%), de los cuales 1,259 correspondieron a *Campylobacter jejuni*, En el estudio se observó una contaminación significativamente mayor en las muestras de ciego (58.3 %) y carne (93.6 %) provenientes de pollo que en las respectivas en los productos cárnicos de cerdo (71.4 % y 14%). Por su parte, Quiñones *et al.*, (2000) indicaron la presencia de *Campylobacter spp.* en 100 muestras de tacos de pollo elaborados en establecimientos comerciales bien establecidos y puestos de calle en la Ciudad de México. De 600 colonias que mostraron la morfología de *Campylobacter spp.* sólo 123 aislamientos fueron positivos. De estos aislamientos, 51 (41%) fueron identificados como *C. jejuni*, 23 (19%) como *C. coli* y 49 (40%) como otras especies de este género.

En otro estudio se demostró la presencia de *Campylobacter jejuni* en el 38 % del pollo entero fresco y refrigerado distribuidos en supermercados de la Ciudad de México (Sánchez, 2007). Si bien estos trabajos demuestran la contaminación de productos de origen aviar con *Campylobacter spp.* y exponen el riesgo a la salud pública que esto implica, no ofrecen información respecto a la presencia de este patógeno en el pollo de engorda ni durante su procesamiento primario en el rastro.

Estas últimas dos situaciones en la industria avícola nacional aún son un tema poco estudiado, mientras que en países desarrollados se conoce que entre el 60 y 80% de las parvadas listas para procesar en el rastro son positivas a *Campylobacter spp.* (Jeffrey *et al.*, 2001; Stern *et al.*, 2007; Chokboonmongkol *et al.*, 2013).

JUSTIFICACIÓN

La carne de pollo en México constituye uno de los productos de origen animal con mayor demanda; evidencias epidemiológicas nacionales e internacionales indican la existencia de riesgos microbiológicos en todas las fases de su cadena productiva, y la ubica como un producto asociado frecuentemente a enfermedades transmitidas por alimentos. Los escasos datos nacionales sobre la situación sanitaria del pollo y la presencia de microorganismos patógenos, específicamente *Campylobacter spp.* durante el procesamiento del pollo de engorda hace necesario evaluar la calidad microbiológica de las canales de pollo para definir la importancia que tiene la carne de pollo en la transmisión de esta bacteria. Igualmente, la información generada puede contribuir como una guía en la elaboración e implementación de programas que salvaguarden la inocuidad de los alimentos, como el HACCP que adquiere cada vez mayor importancia dentro de la industria alimentaria y el comercio internacional, además de ser obligatorio para la operación de todos los establecimientos Tipo Inspección Federal dedicados al sacrificio y proceso de pollo, según lo estipula el Art. 214 Capítulo III del Reglamento de la Ley Federal de Sanidad Animal (RLFSA, 2012).

HIPÓTESIS

La presencia de *Campylobacter spp.* en cuatro etapas críticas permitirá confirmar que la bacteria representa un peligro durante el procesamiento primario del pollo de engorda

OBJETIVO

Analizar la presencia de *Campylobacter spp.* en cuatro etapas del procesamiento primario del pollo de engorda en un establecimiento Tipo Inspección Federal por el método convencional y un kit comercial de PCR en tiempo real.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron cinco lotes de pollo de engorda procesados en un establecimiento TIF ubicado en el centro del país. De cada lote de pollos se obtuvieron cinco muestras al azar de cuatro puntos: recepción del pollo vivo (hisopos cloacales), salida del desplumado, evisceración (después de la evisceración y antes del enfriado) y a la salida del tanque de enfriamiento (lavado de canal). De las 20 muestras por lote de pollos (100), se procedió a realizar el aislamiento e identificación de *Campylobacter spp.* Para evitar la contaminación cruzada, el orden para la recolección fue a la inversa de lo referido previamente (enfriamiento, eviscerado, desplumado, recepción de aves vivas). Las muestras fueron identificadas numéricamente de manera consecutiva; mientras que los puntos de muestreo se identificaron con las letras A, B, C y D (Cuadro 1).

El tamaño de muestra se determinó con base en el plan de muestreo sugerido por la Comisión Internacional sobre Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos (ICMSF por sus siglas en inglés), el cual depende de la gravedad relativa del peligro para la calidad alimentaria o para la salud del consumidor en función de los microorganismos implicados y de la posibilidad de destrucción, supervivencia o multiplicación de los mismos durante la manipulación normal del alimento. Bajo estos criterios, la ICMSF clasifica a *Campylobacter spp.* como un peligro moderado directo, de difusión limitada; por lo tanto, sugiere analizar cinco

unidades de muestra para la búsqueda del patógeno en los lotes de alimentos (ICMSF, 2001).

En el área de recepción se tomaron las muestras de cinco aves por lote mediante el uso de hisopos estériles. Para ello, se tomó un hisopo estéril por ave, el cual se introdujo en la cloaca, se realizaron movimientos giratorios suaves, cada hisopo se colocó en medio de transporte Cary Blair (Copan®) y se transportaron a 4° C, dentro de las primeras cinco horas posteriores a la toma al Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Las muestras de enjuague de canal de pollo se obtuvieron en las etapas de desplume, evisceración y enfriado. En cada punto de muestreo las canales se retiraron de forma manual de la línea de proceso, y se colocaron asépticamente de manera individual en bolsas de plástico estériles previamente identificadas; para realizar el lavado a cada una se le agregaron 300 ml de agua peptonada tamponada estéril (Acumedia, Cat. 7365, Neogen Corporation, Michigan, USA). Posteriormente, las canales colocadas en las bolsas se agitaron vigorosamente durante aproximadamente un minuto, procurando que se cubriera toda la superficie del canal, transcurrido el tiempo señalado, las canales se retiraron de la bolsa usando guantes estériles, y el líquido del enjuague se transfirió asépticamente a bolsas estériles con cierre hermético y se conservaron a 4° C para ser transportadas el mismo día al laboratorio para su análisis.

I. Aislamiento e identificación de *Campylobacter spp.*

En el laboratorio se realizó el pre-enriquecimiento de las muestras, para ello se tomaron 25 ml de cada uno de los enjuagues de canal y se les adicionaron 25 ml de caldo Bolton suplementado con cefoperazona 20 mg, vancomicina 20 mg, trimetoprima 20 mg y cicloheximida 50 mg (Acumedia, Cat. 7526, Neogen Corporation, Michigan, USA), después de ello, se incubaron durante 48 horas a 40° C. En el caso de los hisopos de cloaca, cada uno se introdujo en un tubo tipo

Falcon® con 25 ml del caldo de pre-enriquecimiento Bolton con las mismas características y condiciones que se utilizaron para las muestras de enjuague de canal. Posterior al período de incubación de las muestras en el medio de enriquecimiento, se tomaron 100 µl de cada una de ellas para realizar dos siembras, una de manera directa y la otra por el método de filtración (papel filtro estéril Millipore de 25 mm de diámetro y con poro de 0.45 micras) en tres medios selectivos para *Campylobacter spp.*: mCCDA, agar modificado con deoxicolato, cefoperazona y carbón, (Acumedia, Cat. 7527, Neogen Corporation, Michigan, USA), Campy-Cefex (Acumedia, Cat. 7518, Neogen Corporation, Michigan, USA) y CHROMagar™ *Campylobacter* (CHROMagar, París, Francia) y se incubaron a 40° C por 48 horas.

La identificación inicial de las colonias se realizó mediante la observación macroscópica de las mismas (pequeñas, brillantes, confluentes, irregulares y color gris), seguida de la tinción de Gram en la que *Campylobacter spp.* se observa como una bacteria Gram negativa pequeña con forma espiral y curvada, se realizaron las pruebas de oxidasa y producción de catalasa, así como pruebas de sensibilidad al ácido nalidixico y a la cefalotina (Cuadro 2).

II. Detección de *Campylobacter spp.* por biología molecular

Extracción del ADN

La extracción del ADN se realizó con el kit comercial DNA Bacteria Kit (Fast Lysis Buffer), para bacterias Gram-negativas (Qiagen, Cat. 69525, Valencia, CA, USA); para este método se utilizó 1 ml de cada muestra previamente enriquecida en caldo Bolton, el cual se centrifugó a 15,000 rpm durante cinco minutos para descartar el sobrenadante y conservar el pellet. Conforme a las instrucciones del fabricante, se adicionaron 200µl de Buffer (Fast Lysis Buffer), la suspensión se agitó vigorosamente durante un minuto y se incubó a 100° C por 10 minutos en un termobloque; transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se removieron del equipo y permanecieron por dos minutos a temperatura ambiente (15-20°C); posteriormente se centrifugaron a 15,000 rpm durante cinco minutos y se

obtuvieron 100 µl del sobrenadante que se transfirieron a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. El ADN así obtenido se conservó a -20° C para su posteriormente análisis, en la prueba de PCR.

Prueba de PCR en tiempo real

Para conocer la presencia o ausencia de *Campylobacter* spp. se realizó un ensayo de PCR en tiempo real, para lo cual se empleó un termociclador Rotor-Gene® (QIAGEN GmbH,) con el kit comercial mericon® *Campylobacter* triple (Qiagen Cat. 290045, Valencia, CA, USA). El kit está diseñado para la detección de *Campylobacter jejuni / coli / lari* a partir de muestras de alimentos previamente enriquecidas. De acuerdo con el fabricante los iniciadores del ensayo son altamente específicos y están dirigidos a una región del ADN única y conservada del genoma de *Campylobacter* que ha sido verificada por bioinformática y experimentalmente. Cada ensayo puede detectar 10 copias del ADN diana en una reacción y se ha determinado que no presenta reacción cruzada con *Campylobacter upsaliensis*, *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella abony*, *Clostridium perfringens*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes*, *Shigella flexneri* o *Escherichia coli*. Todos los procedimientos de PCR fueron llevados a cabo de acuerdo con los protocolos proporcionados con el producto. También se incluyó la cepa 1763 de *E. coli* perteneciente al cepario del Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves de la FMVZ-UNAM como un control negativo adicional. Los componentes de la muestra y de los controles que se utilizaron en cada reacción de PCR y las condiciones de amplificación se describen en los cuadros 3 y 4, respectivamente.

La presencia o ausencia de ADN de *Campylobacter* spp. se evaluó analizando la amplificación del fragmento diana que se visualiza en tiempo real en una gráfica generada por el software 2.1.0 de aplicación EndPoint analysis del Rotor-Gene®, en el que un resultado positivo fue visible como un punto final por encima del umbral de detección.

RESULTADOS

Detección de *Campylobacter* spp. por el método convencional

Por siembra directa solo fue posible observar el crecimiento de colonias sospechosas en el medio CHROMagar (74 %) y ninguna fue visible en Campy-Cefex y mCCDA debido a la abundante presencia de microorganismos competidores. En contraste por filtración se logró obtener crecimiento compatible con *Campylobacter* spp. en 11% 67 % y 86 % en los medios Campy-Cefex, mCCDA y CHROMagar respectivamente (Cuadro 6).

El método convencional permitió el aislamiento de colonias sospechosas a *Campylobacter* spp. en 26 de las 100 muestras analizadas, las cuales fueron confirmadas como bacterias Gram negativas con morfología con forma espiral y curva (Figura 2); Sin embargo, la identificación de especie de estos aislamientos por las pruebas de oxidasa, producción de catalasa y pruebas de sensibilidad al ácido nalidixico y a la cefalotina no fue posible debido a que los resultados obtenidos en las mismas no fueron concluyentes.

El número de aislamientos obtenidos en cada uno de los medios selectivos se muestra en el cuadro 7. En el se observa que, 21 de los 26 aislamientos crecieron solo en uno de los tres medios selectivos, mientras que el resto de los aislamientos presentaron crecimiento simultáneo en dos o tres de los mismos. Además, los medios mCCDA y CHROMagarTM mostraron menor invasión de microorganismos de competencia que el Campy-Cefex.

Solo uno de los aislamientos creció simultáneamente en los tres medios de cultivo y correspondió a una muestra de hisopo cloacal.

En total, en el medio mCCDA se lograron 17 aislamientos, en CHROMagar 11 y solo cuatro con el medio Campy-Cefex.

La distribución de las muestras positivas a *Campylobacter* spp. a lo largo de la línea de procesamiento se muestra en el cuadro 8; en él se puede observar que el microorganismo estuvo presente en los cinco lotes de pollo de engorda analizados. Solo el primer lote resultó positivo a la presencia de *Campylobacter* spp. en las cuatro etapas de muestreo, mientras que los lotes dos y tres tuvieron presente al microorganismo desde el desplumado hasta el enfriado. En el lote cuatro no se aisló al *Campylobacter* spp. en la recepción de aves vivas ni en el área de enfriado, mientras que el lote 5 solo fue positivo en el área de eviscerado y enfriado. *Campylobacter* spp. fue aislado con mayor frecuencia en el área de eviscerado, 56%, las áreas con menor frecuencia de aislamientos fueron la recepción de aves vivas, desplume y enfriado con 4%, 24% y 20% muestras positivas respectivamente.

Detección de *Campylobacter* por PCR

En el cuadro 5 se resumen los resultados de la detección de *Campylobacter* spp. por el ensayo de PCR en tiempo real. De las 100 muestras que se incluyeron en este estudio, 20 provenientes de aves vivas y 57 de lavado de canal (25 de desplume, 24 de evisceración y 8 de enfriado), fueron positivas a la presencia de *Campylobacter* spp., por lo que 77% de las muestras del presente trabajo fueron positivas a la presencia de este microorganismo; mientras que 23% fueron negativas. El mayor número de muestras negativas se obtuvo en las muestras provenientes del área de enfriado 68 %.

Debido a que el kit mericon® *Campylobacter* triple es específico para la detección de las especies termotolerantes, sin diferenciar entre ellas, no se determinó cuál de las especies de *Campylobacter* fue la predominante en cada una de las etapas del muestreo. Se puede observar la presencia generalizada de *Campylobacter* spp. en la línea de proceso del pollo ya que se obtuvieron muestras positivas en los cinco lotes de pollos y en los cuatro puntos de muestreo.

De igual manera, los resultados visualizados en la gráfica de amplificación del ensayo molecular en el área de enfriado sugieren que las muestras tomadas en las áreas de recepción de aves vivas, desplume y eviscerado contenían mayor cantidad de ADN del patógeno, ya que el valor de Ct para las muestras en estos sitios de muestreo fue menor que los valores de Ct obtenidos en las muestras del área de enfriado, como se observa en la figura 1; en la que se presenta la distribución de los valores de Ct de las muestras consideradas positivas, de acuerdo a los valores obtenidos a 40 ciclos. Sin embargo, debido a que no se estableció una curva de calibración que permitiera determinar los valores de Ct de las muestras con el objetivo de obtener una cuantificación precisa del patógeno estos valores no son concluyentes.

DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue demostrar la presencia de *Campylobacter* spp. a lo largo de la línea del procesamiento primario del pollo de engorda, desde las aves vivas previo a su ingreso a la sala de sacrificio, y hasta las canales al salir del tanque de enfriamiento. Los resultados comprobaron que, a pesar de la diferencia en el número de muestras positivas a *Campylobacter* spp. obtenidas en cada uno de los métodos de detección utilizados, fue posible detectar la presencia del patógeno en las cuatro etapas del procesamiento primario analizadas.

Lo anterior, sugiere que existe el riesgo de exposición del consumidor con *Campylobacter* spp., ya que el pollo de engorda con frecuencia es portador asintomático de este patógeno, y es generalmente en el rastro cuando el riesgo de contaminación de las canales se incrementa (Berndtson et al., 1996). Por lo anterior, es vital para la industria avícola, el análisis de muestras y la obtención rápida de resultados que le permitan aplicar las acciones preventivas y correctivas que reduzcan o eliminen el riesgo de contaminación de la canal durante el procesamiento primario de aves comerciales. Por lo cual, los hallazgos de esta investigación pueden ofrecer una base para considerar a *Campylobacter* spp. como un agente patógeno que debe considerarse durante la elaboración del análisis de los peligros microbiológicos que pueden presentarse durante el procesamiento del pollo de engorda en el establecimiento Tipo Inspección Federal en el que se realizó el estudio.

Aunque el objetivo de la presente investigación no fue la comparación entre el método convencional y molecular para la detección de *Campylobacter* spp, los resultados muestran que los 26 aislamientos sospechosos fueron identificados como positivos a las especies termófilas de *Campylobacter* por el método molecular. Estos resultados son parecidos a los encontrados por Kulkarni et al (2002) quienes, al comparar las técnicas de cultivo bacteriano y el PCR para la identificación de *Campylobacter* spp. en 343 muestras de heces de ave obtuvieron 23 muestras positivas en uno o más de los métodos utilizados, de las cuales 18

fueron identificadas como *C. jejuni* por PCR y 14 solo a nivel de género por cultivo selectivo.

Asimismo, la mayor cantidad de muestras positivas a *Campylobacter* spp. por PCR, comparado con las obtenidas por el aislamiento, coincide con un estudio de Al Amri et al. (2007), quienes detectaron especies termófilas de *Campylobacter* mediante un ensayo de PCR en 30 muestras clasificadas como negativas tras su cultivo en medios selectivos. De manera similar, Ivanova et al. (2014) señalaron que la prueba de PCR es un método sencillo, específico y rápido que se puede utilizar para la identificación rápida, fiable y sin ambigüedades de *C. jejuni* en muestras de ave; tras observar que 36 de 40 muestras positivas a *Campylobacter* por medio de PCR fueron positivas también al agente por el método de siembra directa en el medio mCCDA en un total de 73 muestras obtenidas en diferentes sitios a lo largo de la línea de procesamiento en dos establecimientos de sacrificio de aves.

La utilidad de la técnica de PCR en la industria avícola para la detección y cuantificación de patógenos ha sido ampliamente evaluada y aceptada ya que, permite detectar incluso aquellas células del microorganismo que se encuentran en un estado viable no cultivable y que no son detectadas por el método de aislamiento convencional. Sin embargo, debido a que una de las limitaciones de la prueba molecular radica en que la amplificación del material genético se puede producir tanto por las células viables como las muertas (Linton et al., 1997; Oyarzabal et al., 2005, Persson et al., 2005) en este estudio se realizó también la detección de *Campylobacter* spp. por el método convencional con la intención de evidenciar la presencia de células viables del patógeno en las canales.

Con base en lo anterior, los aislamientos obtenidos sugieren la presencia de células viables de la bacteria en las canales, a pesar de las medidas sanitarias implementadas en el rastro y permite suponer que las canales de pollo pueden ser una fuente de infección en humanos al salir del rastro. Aunque, como se muestra en los resultados, después de la etapa de enfriamiento de las canales se observó

una disminución en el número de muestras positivas a *Campylobacter spp.* en ambos métodos de detección.

Debido a que el objetivo de esta investigación fue determinar la presencia o ausencia de *Campylobacter spp.* no fue posible evaluar si el número de células presentes en las canales al salir del área de enfriado se encontraba con una concentración suficiente para considerarse una dosis infectiva (~ 500 ufc) para los seres humanos (FAO, 2001). No obstante, la inclusión de análisis microbiológicos cualitativos en canales, como el que se realizó en el presente estudio es de suma importancia para demostrar la presencia de patógenos durante el procesamiento primario del pollo de engorda que permita estimar si un patógeno en este caso, *Campylobacter spp.* debe ser considerado a lo largo de la línea de proceso para reducir al mínimo la contaminación de las canales y por ende asegurar su inocuidad al salir del rastro.

Los resultados muestran que el lote 1 fue positivo en el área de recepción de aves vivas, tanto por la prueba tradicional como por PCR, los lotes dos al cinco fueron positivos solo por PCR, lo que pudo favorecer la diseminación del patógeno al interior del establecimiento, ya que, de acuerdo con Jeffrey et al. (2001), la principal fuente de contaminación por *Campylobacter spp.* en canales de pollo incluye la fuga de materia fecal contenida en la cloaca, la contaminación de las plumas durante el transporte al rastro, así como prácticas de limpieza y desinfección inadecuadas de los vehículos de transporte de las aves entre lotes. De manera coincidente Kotula et al. (1995) y Stern et al. (2001) informaron que después del transporte de aves al rastro las poblaciones de *Campylobacter spp.* aumentan significativamente y alcanzan niveles de $10^{6.8}$ a $10^{8.7}$ UFC/g, por lo que concluyeron que existe una correlación positiva entre la prevalencia de lotes de pollos colonizados por el patógeno y la frecuencia de canales contaminadas con la bacteria.

Con base en lo anterior, los resultados del presente estudio indican que los ensayos de PCR se pueden utilizar en conjunto con el método de cultivo

convencional para mejorar la velocidad y la precisión de la detección e identificación de *Campylobacter* spp. Conforme a estas observaciones se considera que el kit QIASymphony®AS mericon® *Campylobacter* PCR permite demostrar la presencia de especies termófilas de *Campylobacter* en muestras de hisopos cloacales y enjuagues de canal de ave.

La detección de muestras positivas a *Campylobacter* spp. por el método convencional pudo verse afectada negativamente por el crecimiento excesivo de otras bacterias competidoras en los medios de cultivo las cuales complicaron la recuperación de colonias del patógeno, previamente Jørgensen *et al.* (2002) demostraron algunas dificultades en la detección del patógeno en muestras de carne de pollo debido a la presencia de biota competidora. Esto particularmente puede ser cierto en el caso del medio mCCDA, ya que Hilbert *et al.* (2010) observaron que la presencia *Pseudomonas* y otros microorganismos como *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Micrococcus luteus* y *Enterococcus faecalis* inhibieron el crecimiento de *Campylobacter jejuni*, al usar los medios selectivos mCCDA y Skirrow.

En el presente estudio se observó que el medio Campy-Cefex mostró mayor susceptibilidad a la contaminación con microorganismos de competencia, principalmente *Proteus*, y menor eficiencia en el aislamiento de *Campylobacter* spp. que los medios mCCDA y CHROMagar™ lo que coincide con un estudio de Davis y Conner (2007) quienes informaron que *Pseudomonas*, *Proteus* y *Lactobacillus* disminuyeron el crecimiento y la supervivencia de *Campylobacter jejuni* en el medio Campy-Cefex, de manera similar Chon *et al.* (2012) observaron que la tasa de aislamiento del patógeno en el agar Campy-Cefex fue la más baja tras comparar la eficacia del medio de enriquecimiento Bolton en tres medios selectivos Campy-Cefex, Preston y mCCDA. No obstante, otros autores como Oyarzabal *et al.* (2005) y Potturi-Venkata *et al.* (2007), no observaron diferencias significativas en las tasas de aislamiento de *Campylobacter* spp., de los enjuagues de canal entre el medio mCCDA y el Campy-Cefex.

Los resultados del medio de cultivo CHROMagar™ para el aislamiento de *Campylobacter spp.*, revelaron que bajo las condiciones de esta investigación, el número de aislamientos positivos obtenidos fueron cercanos a los obtenidos con el medio mCCDA, este último considerado por la FDA, la Organización de Estándares Internacionales (ISO) y por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) como el medio de cultivo idóneo en la detección cualitativa y cuantitativa de especies termotolerantes de *Campylobacter*. Sin embargo, este medio CHROMagar™ *Campylobacter* aún se encuentra en etapa de evaluación y validación para ser utilizado en la detección, aislamiento y diferenciación de *Campylobacter jejuni*, *C. coli* y *C. lari*, por lo que la futura incorporación de este medio en los laboratorios de microbiología de los alimentos dependerá de evaluaciones científicas que validen la sensibilidad y costo equiparable con los medios de cultivo selectivo que se utilizan actualmente.

Aunque la presente investigación, los resultados de las pruebas bioquímicas y sensibilidad a antibióticos para la identificación de la especie de *Campylobacter* en los 26 aislamientos no fueron concluyentes, se puede sugerir que los aislamientos obtenidos pertenecen a cualquiera de las tres especies termotolerantes de *Campylobacter* que con mayor frecuencia se encuentran en las muestras de origen aviar, es decir, *C. jejuni*, *C. coli* o *C. lari*. (Man *et al.*, 2011; Gharst *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2013); ya que las condiciones de temperatura de incubación de las muestras fueron de 40° C con el propósito de minimizar el crecimiento de microbiota contaminante y favorecer el crecimiento óptimo de las especies termófilas del patógeno; además de los resultados positivos obtenidos con el kit de PCR QIASymphony®AS mericon® *Campylobacter* triple, el cual es específico para la identificación de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*.

De acuerdo con Ivanova *et al.*, (2014), en los años recientes se recomienda la utilización de métodos moleculares para facilitar la identificación de especies de *Campylobacter* en los alimentos debido a las inconsistencias y dificultades en la identificación del agente por pruebas bioquímicas, ya que se ha informado de cepas de *Campylobacter jejuni* negativas a la hidrólisis del hipurato (Van Landuyt

et al., 1987) aun cuando se consideraba que *C. jejuni* era la única especie de *Campylobacter* positiva a esta prueba. Por otro lado, la sensibilidad al ácido nalidíxico que solía ser una de las características frecuentemente utilizadas para la identificación de la especie hoy en día ha revelado que existen problemas en la interpretación, debido al aumento de cepas de *C. jejuni* y *C. coli* resistentes, y también al aislamiento de *C. lari* sensibles a este antibiótico.

En México, no existen estudios científicos publicados que analicen la presencia de *Campylobacter* durante el procesamiento del pollo de engorda, a pesar de que diversos trabajos han reconocido la correlación positiva que existe entre la contaminación de las canales durante el procesamiento primario y la presentación de campilobacteriosis en humanos como consecuencia del consumo de carne contaminada con este patógeno.

En este estudio el 77% y 26% de las muestras fueron positivas a *Campylobacter* spp. por PCR y el método convencional respectivamente. Lo que es consistente con los hallazgos de Figueroa *et al.* (2009) quienes encontraron 72% y 36% de muestras contaminadas con *Campylobacter* spp. en cuatro etapas del procesamiento de aves en dos plantas chilenas por medio de PCR y método convencional respectivamente. Por otro lado, Wiczorek *et al.* (2012) detectaron al patógeno en 74 y 75.4% las canales de aves con el método convencional durante un estudio en Polonia realizado entre el 2004 y 2005. Del mismo modo, otros estudios informaron resultados similares en la prevalencia de *Campylobacter* spp. en canales de pollo, con incidencias de 56.3% y 87.5% (Hue *et al.*, 2010; Kovalenko *et al.*, 2013).

Por otra parte, diversas investigaciones consideran que las etapas de desplume y evisceración de las canales durante el procesamiento son críticas, debido a que pueden generar una elevación en el recuento de microorganismos patógenos sobre las canales como resultado de la contaminación de los equipos, superficies de trabajo y agua de proceso, lo que queda demostrado en el presente trabajo en el que se observó un incremento en el número aislamientos de *Campylobacter*

spp. en el área de desplume, 24 % y evisceración, 56 % en comparación con las obtenidas en el área de enfriamiento de canales, 20 % por medio del método de detección convencional.

De igual manera los resultados por PCR mostraron un incremento en el porcentaje de muestras positivas durante estas dos etapas con el 100 % y 96 % respectivamente. Asimismo, los valores de Ct obtenidos en las muestras durante el desplumado y evisceración sugieren que podrían haber contenido más ADN del patógeno ya que la fluorescencia se detectó en un menor número de ciclos en comparación con los que se obtuvieron en el área de enfriado. Sin embargo, debido a que en este estudio la prueba de PCR tiempo real solo se llevó a cabo a nivel cualitativo sin establecer una curva de calibración para obtener una cuantificación precisa del patógeno, estos valores no son concluyentes y solo sugieren que podrían ser una referencia del comportamiento del patógeno durante el procesamiento del pollo de engorda.

La menor recuperación de *Campylobacter* spp. por el cultivo convencional comparada con la obtenida mediante el ensayo molecular sugiere que este último tiene mayor capacidad para detectar células que fueron indetectables en los cultivos como consecuencia del enmascaramiento de las colonias por la biota de competencia. No obstante, los resultados obtenidos en ambos métodos de detección en estas áreas sugieren que el incremento del patógeno pudo deberse a un fenómeno de contaminación cruzada por la permanencia del patógeno en los dedos de goma de la desplumadora, equipo de evisceración o bien en superficies de contacto con la canal, incluyendo las manos de los operadores de la línea, ya que algunos estudios como el de Perko-Mäkelä *et al.*, (2009) han relacionado la capacidad de supervivencia de *Campylobacter* spp. con la formación de biofilms en las superficies de contacto o incluso en las tuberías que abastecen el agua de proceso.

Otra posibilidad es que el contacto de los dedos de goma y la región celómica de las canales pudo provocar la liberación del contenido intestinal sobre la canal y por

ende la contaminación de acuerdo con un estudio de Berrang *et al.* (2011), en el cual se examinó la prevalencia y la cantidad de *Campylobacter* spp. en las canales de pollo de engorda en plantas de procesamiento avícola en Estados Unidos observaron que el recuento de coliformes, *E. coli* y *Campylobacter* tuvo un aumento significativo después del desplume y fue atribuido a la contaminación del equipo con las plumas de las aves. Adicionalmente, debe tenerse en cuenta el agua de goteo del desplume, según Wempe *et al.* (1993) quienes aislaron *Campylobacter jejuni* en el 94.4 % de las muestras de agua proveniente del área de desplumado.

Los hallazgos obtenidos en este trabajo con relación al incremento de muestras positivas a *Campylobacter* spp. durante la evisceración, 56 %, coinciden con estudios como los de Jacob-Reisma *et al.* (2000) en Europa, quienes señalaron que el 80% de las canales examinadas en esta etapa del procesamiento fueron positivas al patógeno, y con el de Figueroa *et al.* (2009) quienes encontraron 90% y 54% de canales evisceradas positivas a *Campylobacter* spp. al evaluar dos plantas de procesamiento. En contraste, el estudio de Cortez *et al.* (2006) en Brasil obtuvo solo 5.6% de canales positivas para *C. jejuni* en la etapa de eviscerado la explicación que dieron los autores fue que los lotes analizados podrían haber estado libres del patógeno desde la granja.

Los resultados obtenidos en el área de enfriado de las canales fueron coincidentes en ambos métodos de detección, ya que se observó una disminución en el número de muestras positivas a *Campylobacter* spp. Incluso resultó interesante encontrar una disminución de los valores de Ct obtenidos en el ensayo molecular; sin embargo, debido a las limitaciones del ensayo en el cual no se determinó la concentración del patógeno en esta etapa para evaluar si la disminución fue realmente significativa, los valores fueron tomados únicamente como una referencia del posible comportamiento de *Campylobacter* spp. a lo largo de la línea de proceso gracias a las diversas acciones para el control de patógenos implementados en el establecimiento Tipo Inspección Federal en el que se realizó este estudio.

Resultados diferentes fueron observados por Pezzotti *et al.* (2003) durante un estudio de canales a la salida del tanque de enfriamiento en plantas de procesamiento aviar de Italia durante el año 2000 y 2001 en el que demostraron que 81.3% de las canales estaban contaminadas con *Campylobacter spp.*, sin embargo, en este estudio no se señaló si las plantas de procesamiento evaluadas tenían implementado sistemas de control de patógenos u otros programas para asegurar la inocuidad de las canales similares a los establecidos en el rastro TIF en donde se realizó el presente estudio.

En coincidencia con los resultados de esta investigación, los hallazgos presentados en el estudio de Figueroa *et al.* (2009) señalan que, al comparar los recuentos del microorganismos en las canales de aves antes y después del enfriamiento en dos plantas de sacrificio chilenas se observó una disminución significativa en el número de canales positivas a *Campylobacter spp.*, lo cual fue atribuible a los beneficios de una concentración adecuada de cloro y temperatura del agua en los tanques de enfriamiento. Estas conclusiones se apoyan con las de Berrang *et al.* (2004) quienes señalaron que el uso de cloro en el tanque de enfriamiento se relacionó con cantidades más bajas en la concentración de *Campylobacter spp.* en las canales post enfriamiento. La detección de la bacteria en el área de enfriamiento de la canal indica que la posibilidad de contaminación cruzada de las canales se puede dar incluso en esta etapa tan avanzada del procesamiento, lo que coincide con Wempe *et al.* (1993) quienes recuperaron *Campylobacter spp.* en muestras del agua del tanque de enfriamiento en tres plantas de procesamiento aviar.

Finalmente, a pesar de que los resultados de esta investigación demostraron la presencia de *Campylobacter spp.* en cuatro etapas del procesamiento del pollo de engorda, éstos no son suficientes para asegurar que al salir del rastro las canales representan un riesgo potencial para la salud de los consumidores, ya que, de acuerdo con Stern *et al.* (2013), es necesario tener en cuenta que la contaminación cruzada con este patógeno puede producirse incluso en el supermercado donde se expende el pollo e incluso durante la manipulación,

preparación y la refrigeración casera de este alimento. Por ello, resulta importante destacar la importancia de generar información epidemiológica nacional sobre *Campylobacter* spp. que evidencie la presencia de este riesgo en el procesamiento del pollo de engorda y permita la conducción de un análisis de peligros, el cual es un proceso para valorar la probabilidad de que un peligro se presente durante la producción, procesamiento, distribución, almacenamiento y preparación de un alimento. Sin embargo, la aún escasa investigación en la detección de *Campylobacter* spp. en la carne de pollo desmerece su importancia como un agente patógeno causante de enfermedades gastrointestinales en humanos.

Aunque los resultados de esta investigación solo involucran las condiciones sanitarias particulares que se llevan a cabo en un establecimiento TIF que influyen en la permanencia y supervivencia de microorganismos patógenos durante el procesamiento, se considera que los resultados pueden ser útiles como un modelo para el desarrollo de otros estudios microbiológicos que corroboren si los niveles y frecuencias de *Campylobacter* spp. encontradas durante el procesamiento del pollo de engorda en este rastro son similares a los que se pudieran encontrar en otros establecimientos dedicados al procesamiento de aves comerciales.

Asimismo, la información obtenida puede servir como apoyo para evaluar el riesgo de contaminación de la canal con este patógeno y permita adoptar en el rastro las medidas que reduzcan el número de canales positivas y mejoren la calidad microbiológica de la carne de pollo y con ello se obtengan beneficios para la salud pública y el comercio internacional de los productos avícolas.

CONCLUSIONES

- Se demostró la presencia de *Campylobacter* spp. desde las aves que ingresaron al rastro hasta las canales de pollo de engorda al salir del tanque de enfriamiento.
- Con base en los resultados, el kit mericon® *Campylobacter* triple descrito en este estudio puede ser utilizado para la detección de especies termotolerantes de *Campylobacter* en muestras de ave y enjuagues de canal.
- Bajo las condiciones de este estudio, el medio selectivo mCCDA favoreció el aislamiento de *Campylobacter* spp. a partir de muestras de hisopos cloacales y enjuagues de canal de pollo
- Este es el primer trabajo que muestra información local sobre la presencia de *Campylobacter* spp. durante el procesamiento primario del pollo de engorda que puede ser de utilidad durante el análisis de peligros, etapa fundamental en la elaboración e implementación del sistema HACCP en los establecimientos dedicados al sacrificio y procesamiento de aves.

REFERENCIAS

1. Al Amri A, Senok AC, Ismaeel AY, Al-Mahmeed AE, Botta GA. Multiplex PCR for direct identification of *Campylobacter* spp. in human and chicken stools. *J Med Microbiol* 2007; 56:1350-1355.
2. Berndtson E, Tivemo M, Engvall A. Distribution and numbers of *Campylobacter* in newly slaughtered broiler chickens and hens. *Int J Food Microbiol* 1992; 15:45–50.
3. Berrang ME, Smith DP, Windham WR, Feldner PW. Effect of intestinal content contamination on broiler carcass *Campylobacter* counts. *J Food Prot* 2004; 67:235–238.
4. Berrang ME, Windham WR, Meinersmann RJ. *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* on broiler carcasses subjected to a high pH scald and low pH post-pick chlorine. *Poult Sci* 2011; 90:896–900.
5. Byrd JA, Hargis B, Corrier D, Brewer R, Caldwell D, Bailey R, McReynolds JL, Herron HL, Stanker LH. Fluorescent marker for the detection of crop and upper gastrointestinal leakage in poultry processing plants. *Poult Sci* 2002; 81:70–74.
6. CDC, 2015. Preliminary Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006-2014. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6418a4.htm>.
7. Chokboonmongkol, C., Patchanee, P., Gözl, G., Zessin, K. H., & Alter, T. (2013). Prevalence, quantitative load, and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. from broiler ceca and broiler skin samples in Thailand. *Poultry science*, 92(2), 462-467.
8. Chon JW, Hyeon JY, Park JH, Song KY, Seo KH: Comparison of 2 types of broths and 3 selective agars for the detection of *Campylobacter* species in whole-chicken carcass-rinse samples. *Poult Sci* 2012; 91:2382-2385.

9. Cortez AL, Carvalho, Scarcelli E, Miyashiro S, Bürger K.P. 2006. Survey of chicken abattoir for the presence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Rev Inst Med Trop 2006; 48(6): 307-310.
10. Davis MA, Conner DE. Survival of *Campylobacter jejuni* on poultry skin and meat at varying temperatures. Poult Sci 2007; 86: 765-767.
11. Deming MS, Tauxe RV, Blake PA, Dixon SE, Fowler BS, Jones TS, Lockamy EA, Patton CM, Sikes RO. *Campylobacter* enteritis at a University: transmission from eating chicken and from cats. Am J Epidemiol 1987; 126(3):526–534.
12. EFSA. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA Journal 2015; 13(12):4329.
13. FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2001. Identificación de peligros, evaluación de exposición y caracterización de peligros de *Campylobacter* spp. en pollos para asar y *Vibrio* spp. en Mariscos. In: Consulta Mixta FAO/OMS de Expertos sobre la Evaluación de Riesgos asociados a los Peligros Microbiológicos en los Alimentos. Ginebra, Suiza. 23-27.
14. Figueroa G, Troncoso M, López C, Rivas P, Toro M. Occurrence and enumeration of *Campylobacter* spp. during the processing of Chilean broilers. BMC Microbiol; 2009; 9:94. DOI: 10.1186/1471-2180-9-94
15. Frost, J.A. Current epidemiological issues in human campylobacteriosis. Journal of App Microbiol. 2001; 90: 85S–95S.
16. FSIS-USDA. Food Safety and Inspection Service, USDA. New Performance Standards for Salmonella and Campylobacter in Not-Ready-to-Eat Comminuted Chicken and Turkey Products and Raw Chicken Parts and Changes to Related Agency Verification Procedures. Federal Register. 2016; Vol. 81, No. 28.

17. Gharst G, Oyarzabal OA, Hussain SK. Review of current methodologies to isolate and identify *Campylobacter* spp. from foods. *Journal of Microbiological Methods* 2013; 95:84–92.
18. ICMSF. *Microorganisms in Foods 6. Microbial Ecology of Food Commodities*. España, Acribia, 2001.
19. Ivanova M, Singh R, Dharmasena M, Gong C, Krastanov A, Jiang X. Rapid Identification of *Campylobacter jejuni* from poultry carcasses and slaughtering environment samples by real-time PCR. *Poult Sci* 2014; 93:1587–1597.
20. Jacobs-Reitsma. *Campylobacter in the food supply*. *Campylobacter 2 Edition*. Washington D.C. ASM Press 2000; 467–481.
21. Harris NV, Weiss NS, Nolan MC. The role of poultry and meats in the etiology of *Campylobacter jejuni/coli*. *Am J. Publ Hlth* 1986; 76:407–411.
22. Hermans FP, Messens W, Martel A, Van Immerseel F, Rasschaert G, Heyndrickx M, Van Deun K, Haesebrouck F. Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2012; 89-98.
23. Hilbert F, Scherwitzel M, Paulsen P, Szostak MP. Survival of *Campylobacter jejuni* under conditions of atmospheric oxygen tension with the support of *Pseudomonas* spp. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76(17):5911-5917.
24. Hopkins RS, and Scott SA. Handling raw chicken as a source for sporadic *Campylobacter jejuni* infections. *J Infect Dis* 1983; 148:770.
25. Hue OR, Laisney MJ, Allain VO, Lalande FD, Petetin IA. Prevalence of and risk factors for *Campylobacter* spp. contamination of broiler chicken carcasses at the slaughterhouse. *Food Microbiol* 2010 Dec; 27(8):992-999.
26. Jeffrey JS, Tonooka KH, Lozano JH. Prevalence of *Campylobacter* spp. from skin, crop, and intestine of commercial broiler chicken carcasses at processing. *Poult Sci* 2001; 80:1390–1392.
27. Jørgensen F, Bailey R, Williams S, Henderson P, Bolton FJ, Frost J. Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw,

- whole chickens in relation to sampling methods. *Int J Food Microbiol* 2002 Jun 5; 76(1-2):151-64.
- 28.Kapperud G, Skjerve E, Bean NH, Ostroff SM, Lassen J. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infections: Results of a case-control study in southeastern Norway. *J Clin Microbiol* 1992; 30:3117–3121.
- 29.Kotula, K. L. and Y. Pandya. Bacterial contamination of broiler chickens before scalding. *J Food Prot* 1995; 58:1326–1329.
- 30.Kovalenko K, Roasto M, Liepin E, Mäesaar M. High occurrence of *Campylobacter* spp. in Latvian broiler chicken production. *Food Contr* 2013; Vol. 29:188–191.
- 31.Kulkarni SP, Lever S, Logan JM, Lawson AJ, Stanley J, Shafi MS. Detection of *Campylobacter* species: a comparison of culture and polymerase chain reaction based methods. *J Clin Pathol* 2002; 55:749–753.
- 32.Line JE, Oakley BB, Stern NJ. Comparison of cumulative drip sampling with whole carcass rinses for estimation of *Campylobacter* species and quality indicator organisms associated with processed broiler chickens. *Poult Sci* 2013 92:218–224
- 33.Linton D, Lawson AJ, Owen RJ, Stanley J. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2568-2572.
- 34.Luber P, Bartelt E. (2007). Enumeration of *Campylobacter* spp. on the surface and within chicken breast fillets. *J Appl Microbiol* 2007; 102: 313-318.
- 35.Man S. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011; 8(12):669-85.
- 36.Manfreda G, De Cesare A, Bondioli V, Stern NJ, Franchini A. Enumeration and identity of *Campylobacter* spp. in Italian broilers. *Poult Sci* 2006; 85: 556-562.
- 37.Newell DG, Shreeve JE, Toszeghy M, Dominique G, Bull S, Humphrey T, Mead G. Changes in the carriage of *Campylobacter* strains by poultry

- carcasses during processing in abattoirs. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67:2636–2640.
38. Neimann J, Engberg J, Mølbak K, Wegener HC. A case-control study of risk factors for sporadic *Campylobacter* infections in Denmark. *Epidemiol Infect.* 2003 Jun; 130 (3): 353-66.
39. Oosterom J, De Wilde GJ, De Boer, Blaauw LH, Karman H. Survival of *Campylobacter jejuni* during poultry processing and pig slaughtering. *J. Food Prot* 1983; 46: 702–706.
40. Oyarzabal OA. Reduction of *Campylobacter* spp. by Commercial Antimicrobials Applied during the Processing of Broiler Chickens: A Review from the United States Perspective. *J Food Protect* 2005; Vol. 68, No. 8; 1752–1760.
41. Perko-Mäkelä P, Isohanni P, Katzav M, Lund MA, Hänninen ML, Lyhs U. A Longitudinal study of *Campylobacter* distribution in a turkey production chain. *Acta Vet Scand* 2009 Apr 7; 51: 18.
42. Persson S, Olsen KE. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. *J Med Microbiol* 2005 Nov; 54:1043-7.
43. Pezzotti G, Serafin A, Luzzi I, Mioni R, Milan M, Perin R. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. *Int J Food Microbiol* 2003; 82(3): 281-287.
44. Potturi-Venkata LP, Backert S, Vieira SL, Oyarzabal OA: Evaluation of logistic processing to reduce cross-contamination of commercial broiler carcasses with *Campylobacter* spp. *J Food Prot* 2007; 70:2549-2554.
45. Quiñones EI, Vázquez C, Rodas OR, Ramos MO, Rodríguez R. Frequency of isolation of *Campylobacter* from roasted chicken samples from Mexico City. *J Food Prot* 2000; 63: 117-119.

46. Reglamento de la Ley Federal de Sanidad Animal. Texto vigente. Nuevo Reglamento publicado en el Diario Oficial de la Federación el 21 de mayo de 2012.
47. Rosenquist H, Sommer HM, Nielsen NL, Christensen BB: The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. *Int J Food Microbiol* 2006; 108:226-232.
48. Sánchez CN. Búsqueda de *Campylobacter jejuni* en pollo entero fresco y refrigerado de dos marcas en puntos de venta (tesis de licenciatura). México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2007.
49. Stern NJ, Robach MC. Enumeration of *Campylobacter* spp. in broiler feces and in corresponding processed carcasses. *J Food Prot* 2003; 66:1557–1563.
50. Stern NJ, Pretanik S: Counts of *Campylobacter* spp. on U.S. broiler carcasses. *J Food Prot* 2006; 69:1034-1039.
51. Stern NJ, Georgsson F, Lowman R, Bisailon JR, Reiersen J, Callicott KA, Hiett KL. Frequency and Enumeration of *Campylobacter* Species from Processed Broiler Carcasses by Weep and Rinse Samples. *Poult Sci* 2007; 86:394–399.
52. Taylor EV, Herman KM, Ailes EC, Fitzgerald C, Yoder JS, Mahon BE, Tauxe RV. Common source outbreaks of *Campylobacter* infection in the USA, 1997-2008. *Epidemiol Infect* 2013 May; 141(5):987-96.
53. Unión Nacional de Avicultores. Compendio de Indicadores Económicos del Sector Avícola. 2015. Ed. Dirección de Estudios Económicos. México (D.F).
54. Van Landuyt HW, Fossépré JM, Gordts B. A blood-free medium for isolation of thermophilic *Campylobacter* species. *Eur Clin Microbiol*. 1987; 6(2):201-3.
55. Weinberger N, Lerner L, Valinsky L, Moran-Gilad J, Nissan I, Agmon V, Peretz C. Increased Incidence of *Campylobacter* spp. Infection and High Rates among Children, Israel. *Emerg Infect Dis* 2013; 19(11): 1828–1831.

56. Wempe JM, Genigeorgis CA, Farver TB, Yusufu HI. Prevalence of *Campylobacter jejuni* in two California chicken processing plants. *J Food Prot* 1993; 46, 868–872.
57. Wieczorek K, Szewczyk R, Osek J. Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from retail raw meat in Poland. *Veterinarni Medicina* 2012; 57: 293–299.
58. Zaidi MB, McDermott, Campos FD, Chim R, León M, Vázquez G, Estrada-García. Antimicrobial-resistant *Campylobacter* in the food chain in México. *Foodborne pathogens and disease* 2012; 9: 841-847.

ANEXOS

Cuadro 1. Identificación de los puntos de muestreo en la planta de procesamiento para el aislamiento e identificación de *Campylobacter*.

Identificación	Punto de muestreo*	No. muestras / lote	Tipo de muestra
A	Enfriamiento		Enjuague de canal
B	Eviscerado		
C	Desplumado	5	
D	Recepción de aves vivas		Hisopo cloacal

* El muestreo se realizó en sentido contrario al flujo de operaciones para evitar la contaminación cruzada

Cuadro 2. Características bioquímicas de especies termófilas de *Campylobacter*

	<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>
	<i>Jejuni</i>	<i>Doyle</i>		
Oxidasa	+	+	+	+
Producción de catalasa	+	+	+	+
Producción de SH ₂	-	-	-	-
Resistencia al Ac. Nalidixico	S	S	S	R
Resistencia a la Cefalotina	R	V	R	R

(S) sensible (R) resistente (V) variable

Cuadro 3. Componentes de la muestra y controles utilizados en cada reacción de PCR en tiempo real para la detección de *Campylobacter*.

Componente	Muestra	Control (+)	Control (-)
Ensayo <i>mericon</i> [®]	10 µl	10 µl	10 µl
Muestra ADN	10 µl	-	-
ADN control (+)	-	10 µl	-
Diluyente control (-)	-	-	10 µl
Volumen total	20 µl		

Cuadro 4. Condiciones de amplificación utilizados en el termociclador Rotor-Gene[®] para la detección de *Campylobacter*.

Etapa	Tiempo	Temperatura (°C)
Activación inicial	5 min	95 HotStarTaq Plus [®]
Desnaturalización	15 s	95
Alineamiento	15 s	60
Extensión	10 s	72
No. ciclos	40	

Cuadro 5. Presencia de *Campylobacter* en muestras de ave (n= 5) en cuatro etapas del procesamiento primario identificadas mediante PCR en tiempo real.

Etapa	Lote					positivos/total (%)
	1	2	3	4	5	
Recepción	4	4	2	5	5	20/25 (80)
Desplume	5	5	5	5	5	25/25 (100)
Eviscerado	5	5	5	4	5	24/25 (96)
Enfriado	1	1	2	1	3	8/25 (32)
TOTAL	15	15	14	15	18	77/100 (77)

Cuadro 6. Colonias bacterianas sospechosas a *Campylobacter* en tres medios selectivos sembrados con muestras de hisopo cloacal o enjuague de canal (n= 100)

Método de siembra	Medio de cultivo		
	Campy-Cefex %	mCCDA %	CHROMagar™ %
Directa	0	0	74
Filtración	11	67	86

Porcentajes correspondientes al total de muestras sembradas en cada medio (100 en cada uno)

Cuadro 7. Frecuencia de aislamientos de *Campylobacter* en tres medios selectivos a partir de la siembra de colonias sospechosas provenientes de muestras tomadas en cuatro etapas del procesamiento primario del pollo de engorda.

Etapa	Crecimiento de <i>Campylobacter</i>					
	Solo en un medio*			Dos o más medios**		
	Campy- Cefex	mCCDA	CHROMagar	mC/Ch	CC/mC	mC/CC/Ch
Recepción						1
Desplume		6				
Eviscerado	2	2	7	2		
Enfriado		4		1	1	
TOTAL	2	12	7	3	1	1

* Aislamientos identificados exclusivamente en uno de cualquiera de los 3 medios

** Crecimiento simultáneo de *Campylobacter* en 2 o 3 de los medios (CC: Campy-Cefex; mC: mCCDA; Ch: CHROMagar)

Cuadro 8. Frecuencia del aislamiento de *Campylobacter* en cuatro etapas del procesamiento primario en canales de pollo provenientes de cinco lotes de aves.

Lote	Punto de muestreo			
	Recepción	Desplume	Evisceración	Enfriado
1	1	1	2	1
2	-	2	2	1
3	-	2	2	1
4	-	1	5	-
5	-	-	3	2
TOTAL	1/25 (4%)	6/25 (24%)	14/25 (56%)	5/25 (20%)

Figura 1. Distribución de muestras positivas a *Campylobacter* durante el procesamiento del pollo de engorda detectadas por PCR en tiempo real

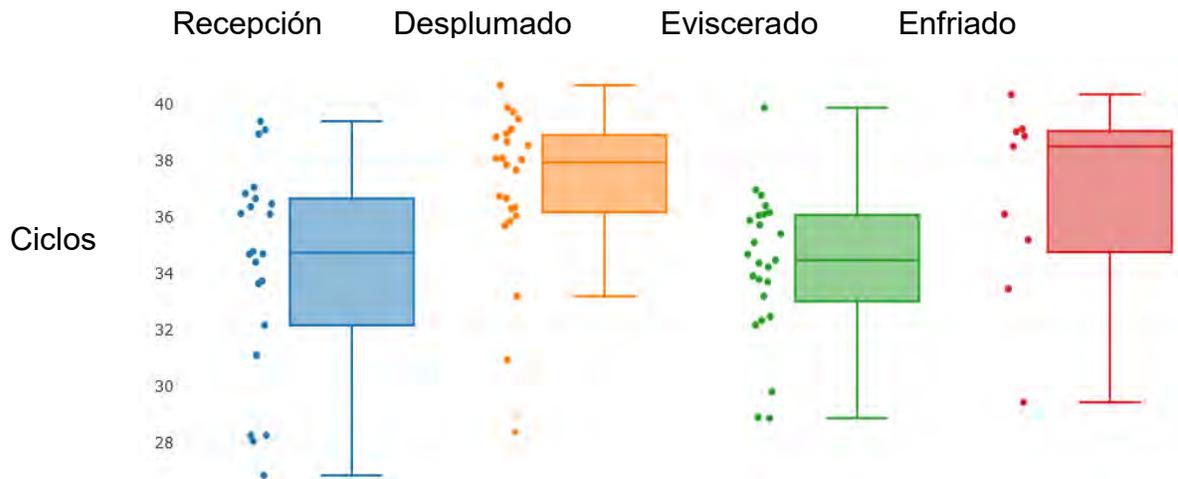


Figura 2. Tinción de Gram en la que *Campylobacter* se observa como una bacteria Gram (-) pequeña con forma espiral y curvada

