



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

SEGUIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Campylobacter jejuni*
EN LAS ETAPAS DE EVISCERADO Y ENFRIADO EN DOS
PLANTAS FAENADORAS DE POLLOS BROILER

SEBASTIÁN DECAP SWINBURN

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: GUILLERMO FIGUEROA G.

Esta memoria fue financiada a través del proyecto FONDECYT 1061150

SANTIAGO, CHILE
2008



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

SEGUIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Campylobacter jejuni* EN LAS ETAPAS DE EVISCERADO Y ENFRIADO EN DOS PLANTAS FAENADORAS DE POLLOS BROILER

SEBASTIÁN DECAP SWINBURN

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: GUILLERMO FIGUEROA GRONEMEYER
PROFESOR CONSEJERO: PILAR OVIEDO HANNIG
PROFESOR CONSEJERO: HÉCTOR HIDALGO OLATE

SANTIAGO, CHILE
2008

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue aislar, cuantificar y caracterizar molecularmente a *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) proveniente de muestras de canales obtenidas en la etapa de eviscerado y enfriado en dos plantas faenadoras de pollos broiler de la Región Metropolitana. Además se obtuvo los datos del enfriador de agua de las canales (“chiller”) en ambas plantas para establecer las diferencias. Las cepas de *C. jejuni* fueron aisladas en medios de cultivo selectivos, posteriormente identificadas por pruebas bioquímicas y caracterizadas a través de “Electroforesis en Gel de Campo Pulsado” (PFGE) usando dos enzimas de restricción, *SmaI* y *KpnI*.

Los resultados mostraron que, *C. jejuni* se aisló en 166 de las 259 muestras analizadas (64%). En la planta A se obtuvo un total de 82% (107/130) muestras positivas y en la planta B 46% (59/129). Al analizar la contaminación por etapa de proceso se observó mayor porcentaje de ocurrencia en la etapa de eviscerado 71% (97/136) que enfriado 56% (69/123), mientras que al analizar los datos por planta y etapa se obtuvo que en la planta A la etapa de eviscerado tuvo un 89% y la etapa de enfriado un 74% de ocurrencia para *C. jejuni*. Comparativamente, la contaminación con *Campylobacter* en la planta B fue menor en ambas etapas con un 53% de ocurrencia en el eviscerado y un 37% en el enfriado.

Los resultados de la caracterización molecular de *C. jejuni* mostraron 13 patrones distintos de macrorrestricción al usar la enzima *SmaI* y 12 al aplicar *KpnI*. En ambos casos se obtuvo 6 patrones comunes, siendo los restantes patrones únicos (6 y 7 respectivamente). Los mismos patrones se observaron tanto en la etapa de eviscerado como de enfriado. Los controles de temperatura en el “chiller” de las plantas A y B fueron en promedio de 1,56°C y 0,59°C respectivamente. La planta B presenta temperaturas significativamente menores ($p=0,0024$). La concentración de cloro del agua del “chiller” medida en la planta A fue de 0,58 ppm y en la planta B de 0,53 ppm. Las diferencias observadas no fueron significativas ($p=0,4315$).

Solo ocurrió una disminución estadísticamente significativa de los porcentajes de ocurrencia desde la etapa de eviscerado a enfriado por parte de la Planta A. Sin

embargo, la ocurrencia en la planta A siempre fue mayor que la planta B. Los patrones de macrorrestricción observados fueron específicos para cada una de las plantas y según el día de muestreo, no así para las etapas. Estos resultados, inducen a pensar, que la mayor contaminación de las canales con *C. jejuni* corresponde a la proveniente de la crianza y no se genera al interior de la planta faenadora de aves.

SUMMARY

The aim of this study was to isolate, quantify and characterize molecularly *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) from carcass samples obtained at the stage of evisceration and chilling at two poultry slaughter plants of broiler chickens in the metropolitan area. In addition, data was obtained from a water cooler ("chiller") in both plants to establish the differences. The strains of *C. jejuni* were isolated in selective culture media, subsequently identified by biochemical tests and characterized by "pulsed-field gel electrophoresis" (PFGE) using two restriction enzymes, *Sma*I and *Kpn*I.

The results showed that *C. jejuni* was isolated in 166 samples of the 259 analyzed samples (65%). In plant A a total of 82% (107/130) positive samples were obtained and at plant B and 46% (59/129). While analyzing the contamination by process stage a higher percentage of positives was observed at the stage of evisceration (71%) than chilling (56%). Whereas when analyzing the data by plant and stage we found that in plant A at the evisceration stage 89% positives and at the chilling stage a occurrence of 74% of *C. jejuni*. Comparatively *Campylobacter* contamination was lower in plant B and was lower in two stages with 53 % positives at evisceration and 37% at chilling stage.

The results of the molecular characterization of *C. jejuni* showed 13 different patterns of macrorestriction when using the enzyme *Sma*I and 12 when *Kpn*I was applied. In both cases 6 common patterns were obtained, making the remaining patterns unique (6 and 7 respectively). Similar patterns were seen both at the stage of evisceration and chilling. The temperature controls in the "chiller" of plant A and B were on average 1.56 ° C and 0.59 ° C respectively. Plant B presents temperatures significantly lower ($p = 0.0024$). The concentration of chlorine measured in plant A was 0.58 ppm and 0.53 in plant B. The observed differences were not significant ($p = 0.4315$). However, one statistically significant decrease in the rates of occurrence from the stage of evisceration to chilling was observed in plant A. However, the occurrence at plant A was higher than at plant B. The patterns of macrorestriction observed were specific to each plant and depended on the day of sampling, and not on the stage. These

results, suggest that the greatest contamination of carcasses with *C. jejuni* occur in the rearing period and is not generated inside the bird slaughter plant.

ÍNDICE

RESUMEN	2
SUMMARY	4
1. INTRODUCCION	8
2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	10
2.1. Enfermedades transmitidas por los alimentos	10
2.2. Principales Patógenos.....	11
2.3. Contaminación en los alimentos cárnicos	13
2.4. <i>Campylobacter jejuni</i>	13
2.4.1. Generalidades	13
2.4.2. Biotipificación.....	14
2.4.3. <i>C. jejuni</i> en humanos	15
2.4.4. Cuadro Clínico y Fisopatogenia de las Enfermedades Producidas por <i>C. jejuni</i>	17
2.4.5. Transmisión y Reservorios de <i>C. jejuni</i>	18
2.4.6. Aislamiento de <i>C. jejuni</i> en los alimentos	19
2.4.7. Transmisión de <i>C. jejuni</i> en pollos broiler	20
2.5. Plantas Faenadoras de Aves	21
2.5.1. Producción Nacional de Aves	21
2.5.2. Contaminación en Plantas Faenadoras	22
2.5.3. Sistema HACCP y Producción Intensiva de Aves	25
2.6. Puntos Críticos de Control	26
2.7. Inspección Basada en el Riesgo (RBI).....	27
2.8. HACCP y <i>C. jejuni</i>	29
2.9. Tipificación Molecular de <i>C. jejuni</i>	30
3. HIPÓTESIS	33
4. OBJETIVOS	33
4.1. General	33
4.2. Específicos	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1. Diseño del Estudio	34
5.2. Tamaño de la Muestra.....	34
5.3. Obtención de Muestras.....	35
5.5. Identificación de <i>C. jejuni</i>	36
5.6. Caracterización de <i>C. jejuni</i> mediante Electroforesis por Campo Pulsado	36
5.7. Análisis Estadístico	38
6. RESULTADOS	40
6.1. Ocurrencia de <i>C. jejuni</i>	40
6.2. Ocurrencia de <i>C. jejuni</i> por Etapa Productiva.....	40
6.3. Resultados de Ocurrencia de <i>C. jejuni</i> por Planta Faenadora	41
6.4. Resultados de Ocurrencia por Planta y Etapa Productiva	42
6.5. Recuentos de <i>C. jejuni</i> en canales positivas	43

6.6.	Concentración de Cloro y Temperatura del “Chiller” y Velocidad de la línea en ambas Plantas Faenadoras.....	44
6.7.	Biotipificación de <i>Campylobacter</i> termotolerantes.....	45
6.8.	Caracterización Molecular de <i>C. jejuni</i> mediante PFGE.....	46
6.8.1.	PFGE de <i>C. jejuni</i> con <i>Sma</i> I.....	47
6.8.2.	PFGE de <i>C. jejuni</i> con <i>Kpn</i> I.....	49
7.	DISCUSIÓN	52
7.1.	Eviscerado.....	52
7.2.	Enfriado.....	54
7.3.	Recuentos.....	60
7.4.	Biotipificación.....	61
7.5.	Caracterización Molecular.....	62
7.6.	Crianza.....	65
7.7.	Evaluación de Riesgo.....	69
8.	CONCLUSIONES	72
9.	BIBLIOGRAFÍA	73
10.	ANEXOS	83

1. INTRODUCCION

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) adquieren hoy un interés creciente del público a nivel mundial ya que constituyen uno de los principales problemas en salud pública.

Dentro de los agentes contaminantes de los alimentos se encuentran los de tipo físicos, químicos y biológicos. Éstos, se pueden producir en cualquier punto de la cadena productiva por lo que su control resulta difícil.

Uno de los principales contaminantes de los alimentos es de origen bacteriano. Dentro de éstos, *Campylobacter jejuni* es, a nivel mundial la causa más importante de infecciones zoonóticas bacterianas. Su principal reservorio son las aves de consumo doméstico por lo que es crucial su control a lo largo de toda la cadena productiva, en especial a nivel de las plantas faenadoras.

Antiguamente, el control microbiológico de alimentos, se hacía sobre el producto final; sin embargo, este sistema no es efectivo, ya que no consigue la prevención, y los métodos analíticos aplicados son bastante caros y demorosos. Es por ello que se optó por implementar un método conocido como Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC o HACCP) que permite prevenir los peligros asociados con el producto, e identificar los posibles puntos de contaminación o multiplicación del patógeno (puntos críticos de control).

Para la correcta implementación del sistema HACCP es fundamental que se cuente con información epidemiológica local, la cual es indispensable para realizar el análisis de peligros. Sin embargo, en nuestro país es escasa la información disponible.

Una de las etapas claves conducentes a la implementación del sistema HACCP es la identificación y caracterización de los peligros biológicos; en el caso de los pollos, la presencia de *C. jejuni*. Entre las herramientas modernas que existen para caracterizar al agente, están las técnicas moleculares, en especial la caracterización genética, la que permite identificar posibles fuentes y/o rutas de contaminación durante el proceso de faenamiento y de esta manera implementar adecuadas medidas de control. La Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) es uno de los métodos capaces de detectar, a través de diferentes patrones de restricción, distintas cepas de *C. jejuni*. Ello

permite trazar el posible origen del agente contaminante y más específicamente detectar en que fase o etapa deben implementarse acciones correctivas para evitar o disminuir la contaminación durante los procesos.

El objetivo de esta memoria de título fue evaluar cuantitativamente la presencia de *C. jejuni* y caracterizar molecularmente las cepas provenientes de la etapa de eviscerado y enfriado, en dos plantas faenadoras de pollos broiler. Con esto se contribuyó a genera información local sobre uno de los puntos críticos de control en el faenamiento de aves, el proceso de “enfriamiento” previo al envase. La información obtenida servirá como un primer aporte para la aplicación del nuevo sistema denominado “Inspección Basada en el Riesgo”.

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1. Enfermedades transmitidas por los alimentos

Se entiende por seguridad alimentaria cuando las personas tienen acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimentarias y preferencias para poder llevar una vida sana y activa (FAO, 1996). En esta definición se aplica un doble concepto de seguridad, por una parte la seguridad en el acceso y por otra la seguridad en la inocuidad de los alimentos. En el mundo desarrollado parece claro que la seguridad al acceso está suficientemente garantizada; sin embargo, la inocuidad de los alimentos se ve amenazada en reiteradas ocasiones por elementos de riesgo (González *et al.*, 2005). Al no tener alimentos inocuos surge una infinidad de problemas tanto de tipos sanitarios como económicos, siendo los más importantes las enfermedades transmitidas por los alimentos.

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) son ocasionadas por el consumo de alimentos contaminados por diversos agentes, pudiendo ser físicos, químicos o biológicos. La monitorización y vigilancia epidemiológica demuestran que la principal fuente de ETA son debido a patógenos microbiológicos de origen animal. Estos pueden ser bacterias, virus y parásitos que se alojan en los animales (CDC, 2006) pudiendo contaminar los alimentos en cualquier punto de la cadena alimentaria, tales como las explotaciones productivas, los mataderos, las plantas de envasado o elaboración, los lugares de expendios, los casinos o en la preparación casera.

El número de brotes epidémicos, asociados al consumo de alimentos, es elevado debido a que la contaminación de éstos, por bacterias patógenas, es algo relativamente frecuente, principalmente por una manipulación incorrecta de los mismos.

Las patologías asociadas a la transmisión alimentaria pueden ser de dos tipos, infecciones alimentarias, producidas por la ingestión de microorganismos o intoxicaciones alimentarias, producidas como consecuencia de la ingestión de toxinas bacterianas presentes en los alimentos. Muchas de estas patologías son esporádicas y no se informa de ellas, pero en la mayor parte de lugares donde se dispone de sistemas de información sobre las ETA, se ha documentado un incremento con respecto a décadas pasadas en la incidencia de afecciones producidas por microorganismos en alimentos (González *et al.*, 2005).

Las ETA son un problema de interés a nivel mundial y representan una amenaza para la salud pública, tanto de países industrializados como aquellos en desarrollo (MINSAL, 2007). Se han descrito más de 250 ETA diferentes con una estimación de 76 millones de personas que las contraen cada año en Estados Unidos. Además 325.000 casos son hospitalizados y 5.000 mueren. De los 76 millones, sólo se sabe que patógeno causó de la enfermedad en 14 millones de casos, mientras que para los 62 millones restantes se desconoce el agente etiológico (Mead *et al.*, 1999).

Junto con el problema de salud pública, el impacto económico que tiene el consumo de alimentos contaminados es de miles de millones de dólares anuales, incluyendo costos de atención médica, ausentismo laboral y muerte, junto al daño de la imagen de la empresa, quien debe asumir los costos legales e indemnizaciones. Se estima que los costos directos por ETA en los Estados Unidos asciende a cifras entre 9,3 y 12,9 billones de dólares, mas miles de millones de dólares por costos indirectos (Friedman *et al.*, 2000). Por otra parte, las secuelas crónicas que pueden afectar al 2 a 3% de los casos de ETA sugieren que a largo plazo el impacto económico sea aún mayor (Lindsay, 1997). Socket y Pearson estimaron que el costo tangible, asociado a casos únicos de enteritis causada por *Campylobacter*, era de 587 Libras por paciente en el Reino Unido (Socket y Pearson, 1987). En un estudio similar en Estados Unidos, Todd estimó que el costo por las infecciones producidas por *Campylobacter* ascendían a 156 millones de dólares cada año (Todd, 1989).

2.2. Principales Patógenos

La mayoría de los países que cuentan con sistemas para la notificación de ETA, han documentado, durante las últimas décadas, aumentos significativos en la incidencia de enfermedades causadas por microorganismos tales como *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* y *E. coli 0157*, entre otros (FAO, 2002). Sin embargo, hoy en día se ha informado que la incidencia de infecciones causadas por *Campylobacter*, *Listeria*, *Shigella* y *Yersinia* ha disminuido desde 1998 hasta la fecha, a diferencia de las infecciones causadas por *E. coli* enterohemorrágica, *Salmonella sp.* y *Vibrio sp.* (MMWR, 2007).

Es difícil saber cuál es el motivo real del incremento de la incidencia de este tipo de enfermedades, pero parece que existen una serie de factores relacionados, como los cambios en los patrones de consumo, que incluyen una preferencia por productos crudos

y mínimamente procesados, el incremento de tiempo que pasa entre la preparación del alimento y el momento de consumo y el aumento de la alimentación fuera del hogar mediante comidas preparadas. Otro motivo podría ser que ha aumentado la declaración de estas enfermedades, debido a la mejora en la identificación y notificación de la enfermedad a los servicios sanitarios.

Entre las bacterias más frecuentes que producen este tipo de enfermedades se encuentran *Salmonella* y *Campylobacter*, que suelen causar gastroenteritis benignas, que en el caso de niños y ancianos pueden cursar con síntomas más graves (González *et al.*, 2005). Durante el año 2000, en Estados Unidos, la incidencia de infecciones diagnosticadas por cada 100.000 habitantes fue de 14,81 casos para *Salmonella*, 12,71 casos para *Campylobacter* y 6,09 casos para *Shigella*, siendo éstos los patógenos más relevantes (CDC, 2000).

La CDC ha estimado para el 2010 una incidencia de *Campylobacter* de 12,3 casos por cada 100.000 habitantes en Estados Unidos. Si se compara con el periodo de 1996-1998 la incidencia de *Campylobacter* ha disminuido en un 30%.

En nuestro país no se dispone de muchos datos con respecto a las ETAs y menos aún estadísticas de diagnóstico etiológico. El año 2000 se notificaron 260 brotes, de los cuales el 60% no tuvo diagnóstico microbiológico. De estos 260 brotes, un 11,5% fue por consumo de alimentos cárnicos (ave, cerdo y vacuno).

Durante el año 2006 en Chile se notificaron 1250 brotes de ETA afectando a 6.375 personas, de éstos un 4% fueron hospitalizados. Se observó una mortalidad de 0,0025 por cada 100.000 habitantes. Del total de los brotes se tomó muestras de deposiciones al 37% y de éstas un 34% arrojó resultado positivo. El principal agente detectado fue *Vibrio parahemoliticus* con un 81%, luego *Salmonella spp.* con un 11%, seguido de *Shigella flexneri* con un 3% (MINSAL, 2007). Sin embargo, cabe destacar que *Campylobacter* no se busca en las deposiciones lo que explica la carencia total de información correspondiente.

Además, en el 52,3% de los brotes no se tienen datos de donde se perdió la inocuidad del alimento. En un 15,6 % el problema ocurre en la manipulación doméstica, un 13% es por problemas de manipulación comercial, en un 8,9% el problema se produce en la producción, en un 2,2% en el almacenamiento y en un 1% en transporte. Se indica que en sólo un 0,3% de los casos la inocuidad se perdió en el lugar de procesamiento. El porcentaje restante no está determinado.

En el 89,4% de los brotes por ETA no se hace análisis de alimento y sólo en el 5,6% de los casos los resultados dan positivos. Sobre estos datos, la distribución porcentual de agentes en los alimentos en Chile es de un 44% para *Vibrio parahemoliticus* y un 18% para *Staphylococcus aureus* (MINSAL, 2007). *Campylobacter* nuevamente no aparece en esta lista.

2.3. Contaminación en los alimentos cárnicos

Los patógenos zoonóticos son frecuentemente adquiridos por los animales a través de su vida ya que ellos están expuestos a una gran variedad de microorganismos provenientes de la tierra, agua, aire y alimentos (Fundación del Instituto Cárnico Americano, 1994).

La mayor contaminación de los animales se relaciona además, con las prácticas intensivas de producción, deficiencias en medidas de bioseguridad en los planteles o criaderos y la contaminación de los alimentos y agua que se entrega a los animales (Parrilla *et al*, 1993; Tauxe, 1997; Bjerklie, 1999).

La carga bacteriana de las materias primas puede aumentar o disminuir a lo largo de la cadena productiva, como consecuencia del contacto del producto con las heces del animal infectado. También incide el uso de instalaciones inadecuadas, el empleo o aplicación de procesos y/o equipos con deficiencias en aspectos sanitarios. Finalmente, otro factor condicionante es la falta de técnicos u operarios con capacitación en higiene básica y/o de manipulación de alimentos (Eley, 1996). Un estudio mostró que el 50% de los brotes de contaminación alimentaria se relacionaron al consumo de carne (Mossel y Moreno, 1993).

2.4. *Campylobacter jejuni*

2.4.1. Generalidades

C. jejuni es una bacteria Gram negativa, delgada, curva, móvil, perteneciente a la familia *Campylobacteraceae*. Posee forma bacilar o de S y necesita reducidos niveles de oxígeno para vivir, entre 3 a 5% de oxígeno, 2 a 10% de dióxido de carbono y 85% de nitrógeno. Es una bacteria relativamente frágil y sensible a condiciones de estrés

ambiental, como sequedad, calefacción, desinfectantes, acidez (pH ≤ 5) o salinidad (FDA, 1992). Su óptima temperatura de multiplicación, dado que es un patógeno termófilo, es a 42°C, y no se multiplica bajo 30°C; sin embargo, se mantiene viable a 4°C. Se ha estimado que la ingestión de alimento con un pequeño número de microorganismos (500 o menos) puede causar infección o enfermedad.

Debido a su dificultad para cultivarlo, *C. jejuni* resulta muy difícil de aislar e identificar. Generalmente se requieren medios selectivos muy costosos y condiciones de microaerofilia específicas.

Además de lo anterior, bajo condiciones de estrés, *C. jejuni* entra a un estado “viable no cultivable”, caracterizado por captar aminoácidos y mantenerse con la membrana externa intacta, pero sin poder multiplicarse en ningún medio selectivo, no obstante, a pesar de esta condición, el microorganismo puede ser transmitido a los animales. En esta condición *Campylobacter* se ve de forma cocoide (Stern *et al.*, 1994).

Las especies del género *Campylobacter* son *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lariidis* (biovar ureasa + y -) y *C. upsaliensis*. De este grupo *C. jejuni* (subespecie *jejuni*) es agente causal de diarrea, siendo considerado el más virulento por su mayor resistencia a la fagocitosis; luego se le sigue *C. coli*, pero se considera que la diarrea que produce es más benigna. Además se describen otras especies como *C. fetus* subsp. *fetus* y *veneralis* muy importantes como patógenos de algunos animales, tales como vacuno y ovino. (INEI, 2001). Las infecciones humanas por *Campylobacter spp.* (Campylobacteriosis) son predominantemente causadas por miembros del grupo termotolerante incluyendo *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari* (Griffiths y Park, 1990). *C. jejuni* representa la especie más frecuente aislada en casos de gastroenteritis humana. En efecto, *C. jejuni* es responsable del 80 a 90% de las ETA producidas por *Campylobacter* en el mundo (Frost *et al.* 1998; Park, 2002).

2.4.2. Biotipificación

La necesidad de diferenciar los distintos tipos de *Campylobacter* ha sido esencial para clínicos y epidemiólogos, para entender mejor la fisiopatología y epidemiología de este microorganismo. Lior, para diferenciar los tipos de *Campylobacter* termotolerantes, se basó en el test de la hidrólisis del hipurato, en la producción de H₂S en un medio semi sólido de bisulfato y piruvato de hierro y en la hidrólisis del DNA en un medio de DNasa modificado (Hwang y Ederer, 1975). Además continuó los estudios de Skirrow y

Benjamin que fueron los primero en proponer un sistema de biotipificación basado en la hidrólisis del hipurato, en la producción de H₂S en medios que contienen hierro y la resistencia al ácido nalidixico para la diferenciación de *Campylobacter* dentro de *C. jejuni*, *C. coli* y un tercer grupo, *Campylobacter* termotolerantes resistentes al ácido nalidixico (Skirrow y Benjamin, 1980), que posteriormente fue llamado *C. laridis*.

Según las pruebas bioquímicas que se realizan, si se hidroliza el hipurato se considera *C. jejuni*. Si no lo hidrolizan son considerados *C. coli* o *C. laridis*. De estas, las que eran positivas a la producción de H₂S se consideraron como *C. laridis*. Los resultados obtenidos de la hidrólisis del hipurato, la producción de H₂S y la hidrólisis del DNA fueron utilizados en un sistema de biotipificación que permite reconocer las tres especies termotolerantes, pero además, Lior, diferenció cada especie en biotipos, usando la numeración romana. Para *C. jejuni* se reconocen 4 biotipos (I, II, III, IV), y para *C. coli* y *C. laridis* dos (I, II) (Lior, 1984). Esto lo logró mezclando las tres pruebas bioquímicas anteriormente descritas. Con esto se construyó un sistema de biotipificación estandarizado, que permite a los laboratorios comparar entre si sus resultados y establecer una diferenciación rápida y de bajo costo de *Campylobacter*.

2.4.3. *C. jejuni* en humanos

C. jejuni fue el primer agente patógeno, identificado en 1973, capaz de producir diarrea en el hombre (Altekruse et al, 1999). La mayoría de infecciones humanas causadas por *Campylobacter* se clasifican como casos esporádicos o como parte de pequeños brotes familiares. Es por ésto que no son muy comunes los brotes identificados.

Hay muy poca información sobre la carga de *Campylobacter* en humanos, para los países en desarrollo. Sin embargo, es probable que las tasas de campylobacteriosis sean especialmente elevadas entre los niños menores a 2 años de edad causando una sustancial morbilidad y eventualmente mortalidad.

C. jejuni es una de las causas mas comunes de gastroenteritis de origen bacteriano en los Estados Unidos y el mundo (Tauxe, 1992), con una estimación de 2,5 millones de casos anuales, 13.000 hospitalizaciones y 124 muertes para ese país. De hecho, en 2006 la CDC informó que *Campylobacter* era la segunda mayor causa de enfermedades transmitidas por los alimentos, de origen bacteriano, en Estados Unidos (CDC, 2006).

Las tasas de incidencia informadas en Estados Unidos indican que el 37% de los casos confirmados en laboratorio de gastroenteritis de origen bacteriano, reportados por FoodNet, fue atribuible a *Campylobacter spp.* (CDC, 1999).

En Europa las tasas de incidencia para *Campylobacter* son bastante variables; en Dinamarca, en el año 2006, se reportaron 3.242 casos, correspondiente a una incidencia de 60 casos por 100.000 habitantes. Esto constituyó una disminución de 12% comparado con el año anterior (DTU, 2006). En el caso de Irlanda, en el año 2000, se reportaron 44,5 casos por cada 100.000 habitantes, en Escocia 108 por cada 100.000 y en España 9,5 casos por cada 100.000. En el 2006, 46.603 casos totales, fueron reportados en Inglaterra y Gales (HPA, 2006) siendo ésto una subestimación sobre el número de casos reales en la comunidad europea (Adak *et al.*, 2002). Se ha estimado que la incidencia real sería 1.000 a 2.300 casos por 100.000 habitantes para Europa (Friedman, 2000). Por su parte en Australia se ha informado una incidencia de 80 casos por cada 100.000 habitantes (NEPSS, 2005).

Se ha estimado, en general, que en países desarrollados la incidencia de *Campylobacter* es del 0,5% para individuos adultos y en países en vías de desarrollo cercano al 15%.

La mayoría de los países en vías de desarrollo no disponen de programas de vigilancia para infecciones ocasionadas por *C. jejuni*, por lo que si bien se asume que es alta, se desconoce su real incidencia.

En África se han observado porcentajes de aislamiento, en niños menores de 5 años con diarrea, entre 9,3 y 17,7%. En América latina se disponen datos de Brasil, que reportan tasas de 6 a 10% (Coker *et al.*, 2002), de Guatemala con un 12,1% y Venezuela con un 15% (Viscaya *et al.*, 1999).

En Chile, los escasos estudios disponibles muestran una incidencia de 7% en niños menores de 7 años con síntomas de diarrea (Figueroa *et al.*, 1982). Además se ha investigado la prevalencia del agente entre individuos con mayor riesgo de exposición evaluando a trabajadores de plantas faenadoras. Se observó que el 11% de los trabajadores albergaban a *C. jejuni* en su material fecal y que entre los evisceradores este porcentaje aumentaba al 18% (Soto *et al.*, 1986).

C. jejuni y *C. coli* han sido aislados en el sur de Chile, tanto como agentes frecuentes (16,3%) de diarrea en niños, como contaminantes de hígado de ave (92,9%) para consumo humano (Fernández y Pisón, 1996). Otros estudios han demostrado una

alta tasa de colonización de *C. jejuni* en pollos tanto vivos como faenados de 96 y 84% respectivamente (Figuroa *et al.*, 1982).

Aunque cualquier persona se puede infectar por *Campylobacter*, el grupo de mayor riesgo son los niños menores a 5 años y los adultos jóvenes. Además los hombres presentan más riesgo de enfermarse que las mujeres. También se observa una mayor incidencia en pacientes con SIDA. En Estados Unidos estos pacientes se infectan 39 veces más que la población normal (Kist, 1985). La incidencia de *Campylobacter* en humanos tiene una distribución estacional, con un alza en los meses de verano.

2.4.4. Cuadro Clínico y Fisopatogenia de las Enfermedades Producidas por *C. jejuni*

Campylobacter puede causar varios cuadros clínicos, el más común es una enterocolitis aguda que recibe el nombre de campylobacteriosis. El microorganismo se adquiere por vía oral (ingestión de comida y bebidas contaminadas) o por contacto con animales infectados.

El periodo de incubación es variable, de 1 a 11 días (promedio 3,2), afectando intestino delgado y grueso. Los signos clínicos más comunes son fuerte dolor abdominal, fiebre y diarrea, que generalmente comienza 24 horas posterior al inicio de los síntomas, algunas veces acompañada de vómitos. Otros signos pueden ser dolor muscular, cefalea, anorexia y tenesmo. El dolor y la fiebre preceden a la diarrea, la que puede ser profusa, acuosa y algunas veces sanguinolenta. La diarrea acuosa aparentemente es más común en países desarrollados.

En un mismo paciente se han descrito cuadros bifásicos, lo que sugiere que pueden operar 2 mecanismos patogénicos diferentes, uno que ocasiona diarrea acuosa profusa y otro conocido como síndrome disentérico. El primero sería causado por la elaboración de una enterotoxina termolábil muy similar a la de *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli enterotoxigénica* (ETEC) que se une al gangliosido GM1 y estimula la actividad de la adenilato ciclasa. Con esto aumenta el AMP cíclico y se altera el transporte normal de iones en el enterocito, provocando una diarrea secretora. En el cuadro disentérico, en cambio, se asocia a actividad invasiva y citotóxica sobre las células del ileon o colon (CDC, 2003) encontrándose sangre fresca, mucus y leucocitos en las heces.

La patogenia de *C. jejuni* está asociada a la capacidad del agente para moverse a través del mucus y adherirse firmemente a la mucosa colónica, donde gatilla su internalización, evento en que la quimiotaxis y el flagelo juegan un rol importante (DTU, 2006).

Aunque la diarrea puede ser severa, el dolor abdominal y la deshidratación son usualmente los problemas más relevantes en jóvenes o mayores. En general el cuadro clínico es autolimitante, alcanzando su mayor expresión entre el 4° y 5° día. La presentación puede ser variable, desde una forma leve de corta duración hasta un cuadro más severo y prolongado con características similares a Shigelosis o Salmonelosis. Además es muy frecuente que se presente solamente un intenso dolor abdominal en la fosa iliaca izquierda y no así la diarrea.

Los organismos pueden ser excretados en las heces por varias semanas. La bacteremia es muy rara.

Generalmente los casos leves no requieren de tratamiento antimicrobiano; sin embargo, los casos graves o recidivantes se tratan. La droga a elección es la eritromicina.

Luego de la gastroenteritis aguda pueden presentarse complicaciones más severas, tales como infecciones extraintestinales, bursitis, artritis, meningitis, colecistitis, infección al tracto urinario, endocarditis, peritonitis, aborto, sepsis neonatal, Síndrome de Reiter y una neuropatía grave, el Síndrome de Guillain-Barré. Este es un cuadro autoinmune que afecta la envoltura miélnica de los nervios periféricos directamente al axolema o a ambos ocasionando interrupción del impulso nervioso. La incidencia de esta enfermedad se estima entre 1 a 2 por 100.000 habitantes al año.

2.4.5. Transmisión y Reservorios de *C. jejuni*

La campylobacteriosis está reconocida como una zoonosis y el principal reservorio es el tracto digestivo de aves, mamíferos salvajes y domésticos. Entre ellos, se destacan las aves de corral, cerdos, vacas, ovejas, perros y roedores, además de animales de vida libre, especialmente aves silvestres. Se ha visto también que insectos pueden llevar a *Campylobacter* en su exoesqueleto.

La transmisión de *C. jejuni* ocurre por muchas vías. Existen hoy muchas evidencias que demuestran que la infección generalmente sucede luego de la ingestión de alimentos o agua contaminada (Coker *et al.*, 2002).

Se describe, por ejemplo la ingesta de productos cárnicos tanto de ave, vacuno como de cerdo, leche cruda y sus derivados, pescado y derivados, los vegetales frescos y los alimentos envasados con atmósfera modificada como la panceta no ahumada y los vegetales para ensalada (FAO, 2001).

Se describe un ciclo corto y otro largo para la transmisión de *C. jejuni*, el primero por contacto directo de la persona con el animal portador, y el segundo por vía del consumo de agua o alimentos contaminados. En países desarrollados, por ejemplo, el procesamiento y consumo de carne de ave son las principales vías de infección. En contraste, en los países en vías de desarrollo la transmisión por fuentes de agua contaminada o por contacto directo hombre-animal pueden ser comunes debido a las deficientes condiciones sanitarias y a que la gente vive en cercana asociación con animales de consumo o de compañía. Otras potenciales fuentes de infección demostradas han sido el consumo de leche cruda, que puede estar contaminada con heces o ser procedente de vacas con mastitis por *Campylobacter*, y el contacto de personas con mascotas u otros animales infectados (WHO, 2000).

C. jejuni permanece vivo en heces por 3 a 4 semanas a 4°C, en aguas contaminadas durante 4 semanas y 5 semanas en la orina de animales contaminados (Nachamkin y blazer, 2000).

En Chile, un estudio realizado en 1999 encontró que de 141 perros, la prevalencia fue de 31,2%, de los cuales 72,7% fue *C. jejuni* (Oval y Fernández, 1999).

De todas las especies de *Campylobacter termotolerantes*, *C. jejuni* es el más frecuente encontrado en carne de pollo y vacuno, mientras que *C. coli* es más frecuente en carne de cerdo.

2.4.6. Aislamiento de *C. jejuni* en los alimentos

Hay varios métodos que pueden ser utilizados para la detección de *Campylobacter* desde productos de aves. Estos incluyen cultivos directo en placa, enriquecimiento, utilización de esponjas, lavado o incluso incubación del producto entero en caldo de enriquecimiento. Sin embargo, la enumeración es crucial debido a que los niveles de *Campylobacter* encontrados en las canales podría representar una importante fuente de exposición para los consumidores y un potencial riesgo para la infección (Stern y Robach, 2003). El cultivo directo en placa de lavados de carcasas es generalmente usado por agencias reguladoras e investigadoras tanto para presencia o

recuentos de *C. jejuni* (Ransom y Rose, 1998; Stern y Robach, 2003). Los protocolos semicuantitativos, el enriquecimiento en duplicado y el número más probable están también disponibles. Sin embargo, estos últimos métodos son más caros, consumen más tiempo, son más susceptibles a un error de técnica y no necesariamente resultan tener mejores estimaciones para *Campylobacter* comparado con el método de recuento.

En general, los alimentos que se analizan, están altamente invadidos por una flora competitiva que hace difícil el crecimiento de *Campylobacter*. Por otra parte, el número puede ser escaso y su vitalidad disminuida como consecuencia de las condiciones ambientales, de almacenamiento y procesamiento al cual fue sometido el alimento. Es por esto que se sugieren medios de enriquecimiento selectivo, que la mayoría de las veces, son modificaciones de los medios utilizados para el aislamiento. Como agentes selectivos se han usado varios antibióticos entre ellos: vancomicina, trimetoprim, polimixina B, anfotericina, cefalotina, actidiona, colistina y rifampicina.

También llevan incorporados suplementos para enriquecimiento tales como sulfato ferroso, metabisulfito de sodio, piruvato de sodio, cisteína, hematina, sangre equina y extracto de levadura.

Los medios de enriquecimiento, una vez sembrados, se incuban en atmósfera microaerófila a 42°C durante 24 - 48 horas. Si el alimento ha sido refrigerado o congelado, se debe realizar una pre-incubación a 37°C, en microaerofilia, por 6 horas evitando que los medios contengan polimixina o rifampicina ya que las células sometidas a frío sufren una alteración en sus características biológicas haciéndose sensibles a los 42°C y a estos antimicrobianos (INEI, 2001).

2.4.7. Transmisión de *C. jejuni* en pollos broiler

Recientes evidencias obtenidas por tipificación molecular señalan a los pollos comerciales como responsables de la mayor parte de las infecciones humanas por *Campylobacter*. Estudios de caso control han estimado que el 50 a 70% de la contaminación por *Campylobacter* es debido a los pollos y productos de origen avícola (Allos, 2001; Tauxe, 1992). Sin embargo no está muy claro cuál es la fuente inicial de contaminación de los pollos broiler; acorde con la mayoría de los estudios, se sugiere que principalmente se contaminan por transmisión horizontal durante la crianza (Rasschaert *et al.*, 2006).

Hay diversos estudios acerca de la epidemiología de *Campylobacter* en la producción de pollos, produciéndose un grado de disputa sobre cual es la más importante fuente de colonización de los lotes.

El intestino de los pollos es fácilmente colonizado por *C. jejuni*. De hecho, pollitos de un día pueden ser colonizados con menos de 35 microorganismos (Nielsen *et al.*, 1997). La mayoría de los pollos, en planteles comerciales, son colonizados durante las cuatro primeras semanas de edad. Los reservorios ambientales para ellos incluyen la cama de las granjas (fecas), el agua de bebida no clorada, los trabajadores de la granja y algunos insectos vectores como los escarabajos, moscas y hormigas. El alimento sería una improbable vía de contaminación ya que éste es seco y *Campylobacter* es sensible a la desecación. La transmisión vertical ha sido sugerida pero aun no es ampliamente aceptada (Fernández *et al.*, 1994).

Las aves infectadas por este agente no presentan signos de enfermedad, por lo tanto es difícil detectarla.

Una vez introducido *Campylobacter* en las granjas de crianza, se disemina muy rápidamente, a través de los bebederos de agua y debido a las conductas coprofágicas de las aves. A la edad de 5 semanas, aproximadamente, las aves son trasladadas a la planta faenadora en jabas las que son lavadas y desinfectadas luego de su uso. Sin embargo, un inadecuado lavado y desinfectado ha sido identificado como una adicional fuente de contaminación para las aves.

En un estudio realizado en granjas del Reino Unido se determinó que un 83% (189/229) de las muestras fecales recolectadas de las granjas de crianza fueron positivas para *Campylobacter* (Bull, *et al.*, 2005). Además se detectó su presencia en el 58% (26/41) de las jabas transportadoras de pollos hacia la planta faenadora.

Por otra parte, estudios nacionales estimaron una contaminación por *Campylobacter* del 70% en pollos de un plantel de la Región Metropolitana (Vergara, 2000).

2.5. Plantas Faenadoras de Aves

2.5.1. Producción Nacional de Aves

El aumento de la producción de aves para carne se ha convertido en uno de los principales desafíos de la industria avícola. Hace 40 años, la mayor parte de las aves

vendidas como carne eran subproducto de la producción de huevos (Acustic y Nesheim, 1994). Hoy la industria avícola se ha transformado en un ejemplo de integración entre la agricultura y la industria. Sus sistemas intensivos, especializados y sofisticados de crianza, hacen que ella muestre gran crecimiento al comparársela con otras categorías de carnes (Silverside y Jones, 1992). En 1960 casi el 20% de las carnes consumidas en EEUU era de ave y en 1987 su consumo constituía más del 36% de todas las carnes incluidas en la dieta (Austic y Nesheim, 1994).

En Chile la disponibilidad de carne se ha incrementado al igual que en otros países. El 2007 el consumo aparente llegó a 71,4 Kg./hab/año. De este total, el 44,3% estuvo dado por carne de ave (pollos, pavos u otras aves), seguido de los bovinos que aportaron el 30% y los porcinos con el 24,5 %, tendencia que se repite a lo largo de Latinoamérica debido a que el pollo es una fuente de proteína de alta calidad y bajo costo en comparación con otras de origen animal (APA, 2007).

El año 2007 el consumo de carne de ave fue de 31 Kg. per capita, de los cuales 27,3 Kg. fueron pollos. Esto expresado en cantidad son 526.064 toneladas al año, mientras que la producción total nacional fue de 580.980 toneladas, con una disminución del 6% respecto al año anterior. Sin embargo entre el periodo 1997-2007 el incremento ha sido de un 67%. Del total de la carne de ave producida, un 82% lo aportan los pollos broiler. Chile además ingresó US\$167.000 millones por ventas de carne de ave, aumentando un promedio del 34% en el periodo 2000-2007. El principal comprador fue México, seguido de la Unión Europea, China y Japón (APA, 2007).

Como se puede apreciar, la industria nacional de carne de ave tiene hoy un importante papel en la alimentación y la economía nacional, por lo que resulta muy relevante conocer el estatus sanitario al interior de las plantas faenadoras y disminuir los riesgos de que productos contaminados lleguen al consumidor.

2.5.2. Contaminación en Plantas Faenadoras

La producción de carne de ave, se efectúa mayormente en empresas de gran escala y altamente tecnificadas. Las técnicas de producción intensiva, así como el estrés del transporte hasta los mataderos, exacerbaban la proliferación de microorganismos intestinales potencialmente patógenos.

Diferentes fuentes indican una alta tasa de contaminación en las plantas faenadoras de aves en distintos países. Derivado de ello es que una alta proporción de

los pollos vendidos en el comercio (“retail”) están contaminados con *C. jejuni*, incluso con tasas de aislamiento de 98% (Jacob-Reitsma, 2000). Otra investigación realizada en los países bajos demostró la presencia de *C. jejuni* en el 82% de los pollos broiler faenados y en el 40% de los productos derivados de aves (Jacob-Reitsma *et al.*, 1994).

Diversos estudios han revelado que aproximadamente el 80% de los pollos crudos vendidos en UK están contaminados con *Campylobacter termotolerantes* y pueden ser encontrados en carcasas en niveles tan altos como miles por centímetros cuadrado (Jacob-Reitsma, 2000).

Campylobacter ingresa a las plantas faenadoras en los pollos vivos. La presencia de *C. jejuni* en el contenido fecal hace que con frecuencia las aves se contaminen externamente durante el proceso de transporte desde los planteles a las plantas faenadoras y en el matadero durante el proceso de faenamamiento. Así, canales provenientes de lotes libres de *Campylobacter* pueden ser contaminadas con cepas presentes en las jabas usadas durante el transporte de los pollos hacia las plantas faenadoras (Newell *et al.*, 2001). Es por ello que durante el procesamiento se deben hacer todos los esfuerzos necesarios para reducir el número de *Campylobacter* antes de entregar el producto final a los “retails”.

En el proceso de faenado, posterior al colgado y sacrificio de las aves, viene la etapa del escaldado. Este proceso se realiza para aflojar la inserción de las plumas en los folículos y de esta manera facilitar la posterior operación de desplumado. El escaldado ocurre inmediato al desangrado, por inmersión en agua durante 3 minutos. El agua del escaldado es una probable fuente de contaminación cruzada de las materias primas por lo tanto se debe controlar en la calidad microbiológica, en su temperatura (53-56°C) y su flujo.

Luego sigue el desplumado, proceso realizado por una máquina con una serie de discos con dedos de goma que arrancan las plumas de los folículos. Posterior a esto se arrancan las plumas desprendidas mediante un rodillo y duchas. La desplumadora ejerce una presión sobre las aves forzando que el material fecal contaminado salga al exterior diseminándolo sobre las otras canales y los equipos de la sala de faenamamiento (Berrang *et al.*, 2001). Durante el desplumado se incrementa el número de *Campylobacter* recuperado de las canales.

Posterior a esto ocurre el eviscerado, en este paso se produce el corte abdominal para la extracción e inspección de vísceras, tanto de forma manual como mecánica. En esta etapa, se puede producir la ruptura del intestino y con ello el vaciamiento de su

contenido liberando la población microbiana sobre las carcasas, y muchas veces también, al ambiente, la superficie y los equipos. La contaminación de las salas de la planta faenadora puede ocurrir, por tanto, durante el proceso de desplumando y el de eviscerado.

Desde el punto de vista higiénico, es crucial el modo como las aves son evisceradas, ya que tanto la apertura de la cavidad abdominal como la extracción de las vísceras son operaciones muy críticas, por la facilidad de contaminación con microorganismos entéricos, al producirse la ruptura del intestino a nivel de la cloaca. Además es fundamental la higiene de manos de operarios y de los instrumentos y utensilios utilizados. Estudios indican que un 80% de los pollos está contaminado con *C. jejuni* en la etapa de eviscerado (Jacob-Reisma, 2000).

Finalmente, en esta etapa, los pollos se cuelgan de los ganchos de la línea de eviscerado por ambos muslos, generalmente con su dorso hacia el operario. Acorde con la regulación del FSIS¹, la contaminación fecal diseminada durante el proceso de evisceración debe ser removida antes que las carcasas entren al chiller de agua.

Posterior al eviscerado viene la etapa de enfriado que tiene como objetivo bajar la temperatura de las aves para el proceso de empaque que continúa y así frenar o inhibir la multiplicación de los microorganismos presentes en la canal. En esta etapa, como se verá más adelante, el sistema HACCP dispone de una oportunidad para bajar los niveles de contaminación gracias a la adición de cloro en el agua fría. Además se retrasa la maduración enzimática, que podría determinar la aparición de olores no deseables.

Las aves al ingresar al proceso de enfriado tienen una temperatura promedio de 24°C, tomada al centro de la masa muscular. Se recomienda disminuir rápidamente esta temperatura a 4°C o menos. Para esto existen varios sistemas de enfriado, ya sea mediante agua o aire que disminuyen la temperatura de la canal hasta 4 °C. El enfriamiento por inmersión en agua consiste en introducir las canales en baños de agua con trozos de hielo. El USDA² recomienda que a cada ave le corresponda como mínimo 2,25 lt/ave. Además se sugiere ocupar 0,4 a 1 kg hielo /kg ave (2 kg hielo /ave) y se puede agregar dióxido de cloro (1-3 ppm) o niveles de cloro a 50 ppm, el primero

¹ De la sigla en inglés Food Safety and Inspection Service. Agencia de Salud Pública, dependiente del Departamento de Agricultura de Estados Unidos. Responsable de asegurar que productos de origen animal sean inocuos, saludables y correctamente envasados y etiquetados (USDA, 2008).

² De la sigla en inglés United State Department of Agriculture

se mide como cloro libre y el segundo como hipoclorito. Las canales deberían estar dentro del estanque en contacto con el agua por 20-30 min.

En el enfriamiento por aire las canales son pasadas por un tubo de aire frío donde, aparte de disminuir la temperatura, se logra deshidratar las carcasas disminuyendo su actividad de agua (Aw) de 0,95 a 0,92. Se basa en una corriente de aire de 1m/s con un spray en base a agua fría de 2 a 4°C que dispone 2,5 L/ave. Este proceso puede durar entre 40 minutos y 12 horas dependiendo del peso de las canales, velocidad y temperatura del aire.

Las canales luego de su paso por el enfriador deberían tener los menores recuentos de *Campylobacter* comparado con otras áreas de la planta (Berrang et al., 2000; Rosenquist et al., 2006).

2.5.3. Sistema HACCP y Producción Intensiva de Aves

Debido a la globalización y a cambios en los hábitos de los consumidores, en los años recientes, se ha producido un importante incremento de los casos de intoxicación alimentaria. Como respuesta a esta realidad es que la OMS y la FAO, a través del Codex Alimentarius aconsejaron la implementación de un sistema preventivo que asegurase a los consumidores la inocuidad de los alimentos. Este sistema se conoce como Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC o HACCP). Es una estrategia de prevención que prioriza el aspecto sanitario, con el fin de garantizar la seguridad y calidad de los alimentos, cubriendo todas las etapas de la operación productiva (Eley, 1996).

En el caso de Estados Unidos, entró en vigencia a partir de 1996. Conforme a este sistema, todos los establecimientos faenadores y procesadores de carnes rojas y blancas deben poseer y aplicar planes HACCP para controlar el riesgo en cada operación e identificar los peligros biológicos, físicos y químicos de todos los alimentos que producen. Este sistema preventivo cubre desde la granja a la mesa del consumidor. Su éxito se basa en la identificación y el control de puntos críticos, que se definen en base a datos epidemiológicos recogidos por cada empresa bajo la directa supervigilancia de las Agencias estatales pertinentes.

Chile, por su parte, tomó la decisión de incorporar en 2006 el uso del HACCP en sus normativas de inocuidad de los alimentos, para ello se modificó el Artículo 69 del Reglamento Sanitario de los Alimentos. Antes, decía que los establecimientos de

producción, preservación y envase de alimentos, que el Servicio de Salud determine, debían realizar controles periódicos de calidad sanitaria en su línea de producción, rechazando los alimentos no aptos para el consumo humano. En la actualidad el reglamento menciona que los establecimientos de producción, elaboración, preservación y envase de alimentos deberán cumplir con las Buenas Prácticas de Fabricación. Además aquellos que la autoridad sanitaria determine dentro de su correspondiente área de competencia, deberán implementar las metodologías de Análisis de Peligros y Control de Puntos Críticos (HACCP), en toda su línea de producción. Los establecimientos que deberán implementar el sistema HACCP se priorizarán de acuerdo al tipo de alimento fabricado según el grupo definido en el Reglamento Sanitario de los Alimentos. Así, se dará énfasis a los alimentos de primera prioridad, dentro de los cuales se encuentran las carnes y productos cárneos, entre otros. Además, el criterio para categorizar las empresas se hará de forma cuantitativa, o sea, se realizará de acuerdo al tamaño de cada actividad industrial, incluyendo en este concepto los volúmenes de producción de cada una de ellas y/o su nivel de actividad económica (Chile, 2006).

Antiguamente, sin el sistema HACCP la seguridad alimentaria estaba basada en el análisis de muestras de alimentos sobre el producto final, los cuales son caros, lentos y destructivos. Es por esto que resultó más económico controlar el proceso, que la producción final. Para ello se establecen medidas preventivas, durante todo el proceso productivo, frente a los controles tradicionales de inspección y análisis del producto final. Con el sistema HACCP hay una identificación y evaluación de todos los peligros asociados al producto final. Para esto se identifican los pasos de la línea productiva y sus peligros, los cuales deben ser controlados, reducidos o eliminados.

2.6. Puntos Críticos de Control

Un punto crítico de control está definido como cualquier etapa o proceso en la cadena alimentaria en el cual se aplica el control para prevenir, eliminar o reducir a niveles aceptables el (los) peligro(s) para la inocuidad del alimento (Figueroa G., 2006).

En la cadena productiva de pollos broiler se ha identificado que la etapa de enfriado de las canales, mediante la inmersión en agua refrigerada (“chiller”), es crucial en la calidad microbiológica final del producto. Esta etapa destinada a bajar la

temperatura del pollo antes del empaque, puede contribuir a la contaminación del producto ya que equilibra las cargas bacterianas entre pollos contaminados y no contaminados.

La utilización de cloro como agente bactericida es común en la industria de alimentos, de hecho, ha sido utilizada por más de 40 años. Se espera que la adición de cloro al proceso de enfriado con agua, baje las cargas bacterianas de las canales de pollos y prevenga la contaminación cruzada de canales y de equipos (SCVPH, 1998). Sin embargo, este sistema ha probado ser insuficiente para obtener la total descontaminación.

Diferentes informes indican que la mayor eficacia del cloro sobre las canales de ave sería en concentraciones de 50 ppm y utilizando sistemas de inmersión y no aspersion. Estudios muestran que si el cloro no se aplica en agua refrigerada no tendría eficacia. No obstante, el factor más limitante en la eficacia del cloro es la pérdida de poder bactericida del cloro libre asociado al alto contenido de materia orgánica presente en el agua. Además el enfriamiento se debe hacer a contracorriente y debe existir un adecuado recambio de agua. El sistema de enfriamiento, como lo revelan diversos estudios, vía aire refrigerado, en cambio, ha probado ser mucho más efectivo que el antiguo sistema en base a agua enfriada (“pre-chiller” y “chiller”). Actualmente la mayoría de los grandes productores del mundo han reemplazado con éxito este proceso por uno en base a enfriado por aire forzado refrigerado.

2.7. Inspección Basada en el Riesgo (RBI)³

Actualmente FSIS está trabajando hacia un planteamiento mas sólido sobre la inspección de las plantas procesadoras de alimentos de origen animal. Es por esto que, como resultado de la aplicación del sistema HACCP, está emergiendo otra herramienta, llamada Inspección Basada en el Riesgo (RBI). Sin embargo, ésta no reemplaza de ninguna manera al sistema HACCP, sino que todo lo contrario, lo complementa.

La RBI no es más que la utilización de una medida del riesgo para la mejor asignación de actividades y recursos en la inspección de los alimentos. Todo esto con el fin de proteger eficazmente la salud humana. El objetivo es mejorar la seguridad y disminuir los peligros en la salud pública. Para esto las agencias reguladoras deberán

³ RBI de la sigla en ingles Risk Based Inspection

asignar más recursos hacia los establecimientos que tienen la mayor probabilidad de causar enfermedad en humanos, particularmente si el control de estos establecimientos se encuentra por debajo de las prácticas de las demás industrias o de los requisitos regulatorios del país (Resolve, 2006).

Con la RBI, FSIS intenta utilizar de mejor forma la información recogida regularmente por el personal de los programas de inspección. Así la asignación de recursos esta en directa relación con el riesgo relativo de los productos producidos por cada planta (RIP⁴) y por la manera en que cada planta controla los riesgos (establecimiento del control de riesgos).

El modelo analítico utilizado para determinar el riesgo de cada planta se basa en información de la propia planta, tal como, volumen de producción, adopción de medidas correctivas, reclamos sobre inocuidad de productos o quejas de consumidores, incumplimiento en los registros de la autoridad sanitaria y resultados de análisis microbiológicos (Resolve, 2006).

Para la correcta aplicación de la RBI es fundamental contar con información local recogida por cada empresa o por los servicios de inspección. Sin ella será imposible jerarquizar a las empresas y así poder asignar de forma más eficaz los recursos.

Esta misma filosofía se puede adoptar al interior de cada empresa. De esta forma pueden actuar de forma predictiva, en base a información concreta, para la toma de decisiones.

La empresa debería entonces identificar los puntos mas conflictivos al interior de la planta faenadora y en base a los datos obtenidos implementar un sistema de control que se adelante a la contaminación de los alimentos. Generalmente, se van a identificar muchos puntos conflictivos; sin embargo, con los datos obtenidos se podrá jerarquizar en que puntos hay mayor probabilidad o riesgo que se produzca la pérdida de la inocuidad del alimento y es ahí donde se deben tomar todas las medidas o precauciones que sean posibles.

⁴ Riesgo Inherente al Producto

2.8. HACCP y *C. jejuni*

Aunque se está avanzando en la mejora de la inocuidad de alimentos, con sistemas como HACCP y RBI, todavía los países desarrollados no han logrado controlar a patógenos tales como *C. jejuni*. De hecho, la mayoría de éstos presentan elevados recuentos o prevalencias dentro de las plantas faenadoras.

Para poder eliminar este patógeno en el proceso productivo y hacer un análisis realista de la efectividad de cualquier medida de control implementado para un agente zoonótico como *Campylobacter*, se necesita contar con métodos de detección sensibles para el organismo, más específicamente con datos cuantitativos. Al tenerlos, se puede estudiar el riesgo real para la población de infectarse con el agente, mediante un análisis de riesgo. Sin embargo, la detección o enumeración de *C. jejuni* en los alimentos es problemática debido a la fragilidad del patógeno.

La USDA y FSIS han hablado mucho sobre la identificación de *C. jejuni* como parte del sistema HACCP, sin embargo, los datos disponibles sobre las poblaciones de *C. jejuni* en las canales, durante el faenamiento, son escasas. Además, otra limitante es que el reglamento sanitario de los alimentos no indica la búsqueda de *Campylobacter* como parte de sus disposiciones generales, solo hace mención al artículo 173. Este indica que si en un alimento se detecta la presencia de microorganismos patógenos no contemplados en la lista indicada (RAM y *Salmonella*), la autoridad sanitaria podrá considerar el alimento contaminado conforme a la evaluación de riesgo que de su presencia se derive. Sin embargo, en nuestro país el análisis de riesgo es una práctica limitada.

Con todos los datos disponibles es bastante difícil establecer por que *C. jejuni* ha sido un agente tan complicado al interior de las plantas faenadoras. Se sabe que este ingresa a la planta faenadora dentro del ave viva y que al interior de ésta no logra eliminarse.

Aunque se ha demostrado que la contaminación cruzada de las canales ocurre durante el proceso de faenado (escaldado, desplumado, eviscerado y enfriado), todavía hay una falta de conocimiento con respecto a la ruta de transmisión del agente (Berndtson *et al.*, 1996; Ono y Yamamoto, 1999; Berrang *et al.*, 2001). A diferencia de otros patógenos gastrointestinales, *C. jejuni* no sobrevive a condiciones ambientales y raramente se transmite entre humanos. Es por esto que resulta difícil entender las altas

incidencias de infección por este agente. La interrogante, entonces, es establecer por que los controles han sido ineficaces para el control del patógeno.

Una de las posibles explicaciones se basa en la capacidad del agente de formar biofilms en el ambiente. Un biofilm es definido como una población bacteriana encerradas en una matriz adheridas entre ellas a una superficie o a una interfase (Costerton et al., 1995). Así *C. jejuni* podría sobrevivir a condiciones ambientales y diseminarse mas fácilmente, específicamente al interior de las plantas faenadoras. Esta explicación también podría responder por que tras el paso por el chiller de agua los niveles de contaminación siguen siendo altos. Otra explicación es por la presencia de aerosoles. Está demostrada la presencia de *Campylobacter* en el aire de plantas faenadoras de aves mediante aerosoles (Wilson, 2004), sin embargo, la información actual sobre las posibles rutas de contaminación mediante aerosoles son escasas.

Para dilucidar estas interrogantes es necesario además de identificar el agente, poder caracterizarlo más específicamente, ya que así se podrá definir las diferencias entre cepas y ver, por ejemplo, si alguna cepa especifica tiene la capacidad de formar los biofilms o si las que están en los aerosoles son las mismas que las propias de las aves.

2.9. Tipificación Molecular de *C. jejuni*

Desde hace años es conocida la presencia de *C. jejuni* en la cadena productiva de pollos broiler; sin embargo, no está claro cuál es exactamente el origen de la contaminación, como tampoco cuáles son los recuentos bacterianos con que dicha contaminación se presenta en las distintas fases del proceso. Para intentar dar respuesta a estas interrogantes se han probado varias alternativas, incluyendo algunas destinadas a identificar clones bacterianos en las distintas etapas del proceso.

Así mismo, para lograr reducir la incidencia de las ETAs es muy importante la identificación de la principal fuente y ruta de transmisión del patógeno; sin embargo, los estudios se han visto obstaculizados por la carencia de métodos estandarizados de subtipificación de las cepas. La diferenciación de las mismas es necesaria para identificar el origen de la contaminación y con ello intentar cortar las rutas relevantes de transmisión; la disponibilidad de esta información permitiría definir más exactamente el origen de la contaminación y con ello centrar los esfuerzos de control, económicos y técnicos (RBI), a los puntos que sean críticos para el control (HACCP) que realmente

limiten o prevengan la posibilidad de que el producto final, que recibe el consumidor, no cumpla con el requisito de inocuidad para *C. jejuni*.

Por mucho tiempo se ha intentado usar los métodos fenotípicos para caracterizar a *C. jejuni*, este es el caso de la biotipificación, serotipificación y la fagotipificación, pero los resultados no han sido alentadores. Estos métodos no siempre están disponibles y tienen limitaciones, en particular su insuficiente poder de discriminación, reactividad cruzada y altos niveles de falsos positivos y negativos (Nielsen *et al.*, 1997). Para suplir este déficit se han diseñado varios métodos moleculares, basados en genotipificación, que han mostrado mayor sensibilidad y capacidad de discriminación. Entre ellos, PCR, la Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE), la ribotipificación y secuenciación del gen *flaA* han sido usados en diversos estudios epidemiológicos (Wassenaar y Newell, 2000). Los métodos de tipificación molecular de las cepas han ayudado a clarificar la epidemiología de muchas infecciones bacterianas.

Hoy parece haber consenso que PFGE es la técnica con mayor poder de discriminación a nivel de bacterias y es considerada el estándar (“*gold standard*”) para la caracterización de *C. jejuni*. Esta técnica es altamente reproducible; sin embargo, su sensibilidad depende del tipo de enzima de restricción que se use (On *et al.*, 1998).

La electroforesis en campo pulsado es un proceso de separación electroquímica de moléculas de DNA de las cepas bacterianas. La técnica consiste en breve, en una extracción del DNA genómico de la bacteria de interés, en este caso *C. jejuni*, que luego se digiere mediante una o más enzimas de restricción. Luego de la digestión los fragmentos de ácido nucleico se someten a separación electroforética, es decir se les hace migrar a través de un gel de agarosa sometido a cambios constantes del campo eléctrico. Así, el proceso logra separar una mezcla de moléculas de DNA según su peso molecular generando un discreto patrón de bandas características para cada cepa bacteriana.

La aplicación de nuevos protocolos, como el PFGE, permite obtener resultados rápidos (24 horas) gracias a la aplicación de sistemas computarizados para el análisis de los patrones de restricción. Con ello se logra montar un sistema de vigilancia a tiempo real de las enteritis causadas por *C. jejuni*. Su aplicación permite además acceder al sistema globalizado de PulseNet (CDC, 2008), un sistema estandarizado de vigilancia epidemiológica, de los Estados Unidos, que maneja una base de datos de los diferentes subtipos o patrones de *C. jejuni*. Esta base permite comparar “en línea” los patrones de las cepas y su origen en distintas regiones geográficas.

En este estudio, la aplicación de PFGE a las cepas de *C. jejuni* permitió comparar los patrones de restricción de cepas aisladas de distintas plantas faenadoras antes y después del paso por la etapa de enfriado. Con esta información se puede conocer que tan efectivo son los controles implementados en el plan HACCP para uno o más puntos críticos de control, así como la efectividad de un particular punto crítico de control en la disminución de la contaminación con *C. jejuni* en el producto final.

3. HIPÓTESIS

La ocurrencia de *C. jejuni* y sus recuentos, en pollos broiler, disminuyen desde la etapa de eviscerado al enfriado, en las dos plantas faenadoras de pollos broiler de la Región Metropolitana.

4. OBJETIVOS

4.1. General

- Evaluar cuantitativamente la presencia de *C. jejuni* y caracterizar molecularmente las cepas provenientes de la etapa de eviscerado y enfriado, en dos plantas faenadoras de pollos broiler.

4.2. Específicos

1. Aislar e identificar cepas de *C. jejuni* en carcasas de pollos broiler en las etapas de eviscerado y enfriado.
2. Determinar la ocurrencia y los recuentos de *C. jejuni* en las etapas de eviscerado y enfriado.
3. Caracterizar molecularmente, mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), las cepas aisladas de *C. jejuni* en las etapas de eviscerado y enfriado.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Diseño del Estudio

En este estudio se evaluaron muestras de canales de pollos broiler provenientes de dos plantas faenadoras de aves (A y B) ubicadas en la Región Metropolitana, donde se faenan 120.000 y 70.000 aves diarias, respectivamente. Estas plantas presentan diferencias tanto en su tamaño, como en sus procesos de faenamiento. Con respecto al procesamiento, la diferencia más importante se observa en la etapa de enfriado de las canales. En la planta A, el enfriado por agua, se efectúa en dos estanques con agregado de hipoclorito de sodio (“pre-chiller” y “chiller”) mientras que en la planta B se adiciona dióxido de cloro al estanque de agua. El segundo aspecto que los diferencia es el momento en que se realiza el marinado; en la planta A, el proceso se realiza luego del enfriado. En la planta B, el marinado se ejecuta previo al enfriado. Es por esto que las muestras de la planta A eran sin marinar mientras que las de la planta B eran marinadas.

La frecuencia de obtención de muestras de aves fue quincenal en ambos mataderos. Las muestras obtenidas en las etapas de eviscerado y enfriado del faenamiento correspondieron a canales de pollos, tomadas en forma aleatoria y de grupos independientes.

Las variables independientes corresponden a las plantas (A y B) y las etapas del faenamiento (eviscerado y enfriado). Las variables dependientes son la ocurrencia y los recuentos de *C. jejuni*.

5.2. Tamaño de la Muestra

El cálculo del tamaño muestral se hizo en función a los porcentajes de ocurrencia en ambos puntos, obtenidos de la literatura. Se consideró 83% de ocurrencia en la etapa de eviscerado y 41% en la etapa de enfriado. Se consideró un nivel de confianza del 95%. El cálculo se hizo con el software WinEpiscope 2.0., con una potencia de 90% y una significancia de 95%.

El cálculo indicó que se requerían al menos 24 muestras de cada etapa, dando un total de 48 muestras por planta y 96 muestras totales.

Sin embargo, finalmente, se obtuvo y procesó un total 259 muestras, con 136 muestras para la etapa de eviscerado y 126 para la etapa de enfriado.

5.3. Obtención de Muestras

Las muestras de canales de pollos fueron obtenidas en las etapas de eviscerado y enfriado luego de haber pasado por el enfriador o “chiller” (agua sola o agua y aire según la planta A o B). Las muestras se obtuvieron en forma aleatoria y correspondieron a un mismo lote por día de muestreo. Por cada visita a la planta se obtuvo en promedio 6 muestras de eviscerado y 6 muestras de enfriado, las cuales fueron almacenadas en bolsas estériles a 4°C. Las muestras fueron retiradas de forma manual desde la línea, respetando todas las condiciones de higiene pertinentes a la planta faenadora.

Posteriormente fueron transportadas al laboratorio de Microbiología y Probióticos del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA); durante la misma mañana, para ser procesadas inmediatamente.

En cada visita a las plantas faenadoras se consignaron datos de: temperatura del enfriador, concentración de cloro libre en el agua del enfriador (clorímetro Microcuant® por método colorimétrico) y se identificó el lote al momento del muestreo.

5.4. Cultivo y aislamiento de *C. jejuni*

El aislamiento y recuento de *C. jejuni* se realizó a través del método descrito por Stern (Stern y Pretanik, 2005) con las siguientes modificaciones:

- Las canales de pollos fueron lavadas con 200 ml de agua peptonada en bolsas estériles. Para determinar la presencia de *C. jejuni* 10 ml del agua de lavado fueron concentrados mediante centrifugación (5.000 rpm por 15 minutos), el sedimento obtenido fue directamente sembrado en placas de agar mCCDA (ANEXO N°1).
- Para determinar los recuentos de *C. jejuni* del agua de lavado obtenida se realizó una dilución 1/10 en caldo Hunt (ANEXO N°2), se tomó una alícuota (100 µl) y se sembró por duplicado en placas de agar modificado para *Campylobacter* libre de sangre (mCCDA).

Posteriormente las placas fueron incubadas a 42° por 2 a 5 días bajo condiciones de microaerofilia.

5.5. Identificación de *C. jejuni*

La identificación inicial de las colonias se realizó mediante observación macroscópica de las mismas (pequeñas, brillantes, confluentes, irregulares y color grisáceo) y tinción de Gram en la que *Campylobacter* se observa como una bacteria Gram (-) pequeña con forma espirilar, curva o de letra S.

La estimación de los recuentos de *Campylobacter* se obtuvo a través del promedio entre los recuentos de cada una de las placas de mCCDA sembradas (2) en la siguiente forma:

$$\text{UFC / Carcasa} = \text{N}^\circ \text{ Colonias contadas} \times 10 \times 10 \times 200$$

Las colonias fueron posteriormente traspasadas en agar Skirrow (ANEXO N°3) y sometidas a pruebas bioquímicas: prueba del hipurato, DNAsa y producción de H₂S, requeridas para efectuar la biotipificación de *Campylobacter sp.* según el esquema de Lior (ANEXO N°4).

Finalmente, las colonias se almacenaron a -70°C en leche descremada al 20% y en caldo tioglicolato, hasta realizar la caracterización por electroforesis en campo pulsado.

5.6. Caracterización de *C. jejuni* mediante Electroforesis por Campo Pulsado

En la caracterización de las diferentes cepas de *C. jejuni* mediante la técnica de Electroforesis en Gel de Campo Pulsado se aplicó la metodología recomendada por la PulseNet, inicialmente descrita por Ribot (Ribot *et al.*, 2001) que consta de 4 pasos:

1. Preparación de los “plug”: ello corresponde a un gel de agarosa de baja temperatura de fusión, que contiene el inóculo bacteriano de la cepa a caracterizar, estandarizado al tubo 5 de Mc Farland (ANEXO N°5).

2. Lisis celular de los “plug” de agarosa: Para ello se trata los “plugs” con una solución de proteinasa K (ANEXO N°6) y sarkosyl, que rompen la pared celular bacteriana. Posteriormente se realiza una serie de lavados con buffer TE (ANEXO N° 7).
3. Digestión del DNA: con la enzima de restricción *SmaI*, que reconoce específicamente una determinada secuencia del DNA. Para *C. jejuni* se recomienda como alternativa la enzima *KpnI*, en situaciones que los patrones obtenidos de 2 o más cepas con la *SmaI* sean indistinguibles. El sitio de reconocimiento de la enzima *SmaI* es 5'...CCC▼GGG...3', 3'...GGG▼CCC...5'. Para el caso de *kpnI* el sitio de reconocimiento es 5'...GGTAC▼C...3', 3'...C▲CATGG...5' (BioLabs®).
4. Se realiza la separación de los trozos de DNA de los geles mediante Electroforesis en campo pulsado: ello se efectúa en una corrida en gel de agarosa de bajo punto de fusión (1%) (ANEXO N°8) por 18 horas con parámetros específicos según la enzima utilizada:

	<i>SmaI</i>	<i>KpnI</i>
Tiempo inicial (seg)	6,8	5,2
Tiempo final (seg)	35,4	42,3
Tiempo total (hrs)	18	18
Voltaje (volt/cm ²)	6	6
Ángulo	120°	120°

En todas las electroforesis se utilizó el marcador de peso molecular Lambda (λ) ladder de Bio Rad® con un rango de 0,05 – 1 Mb. Es un concatemero de λ cl857 Sam7, este es un tamaño de DNA estándar. Además se utilizó una cepa ATTC como control.

Para visualizar los fragmentos se realizó una tinción del gel con una solución de bromuro de etidio al 0,1% por 20 a 30 minutos.

El análisis de los perfiles de banda obtenidos se realizó con ayuda del software Gel Pro 3.1. Posteriormente para la construcción del dendograma o análisis de disimilitud entre las cepas se usó el software Treecon, el cual utiliza el coeficiente de DICE. Así, se agrupan todas las cepas que tuvieron el mismo patrón de banda, designándose para este grupo el nombre “cluster”. Un cluster, por lo tanto, corresponde a todas las cepas que poseían el mismo perfil. Este agrupamiento se realizó mediante el modelo UPGMA⁵ que mediante una matriz de presencia o ausencia de bandas genera el dendograma.

5.7. Análisis Estadístico

Para determinar si hubo cambios en los porcentajes de ocurrencia obtenidos en la etapa de eviscerado y enfriado se usó la prueba de diferencia de proporciones. En ésta se toma el número de pollos positivos a *Campylobacter* y se compara con el total en cada etapa. Para esto se utilizó el software Infostat (Infostat, 2004).

También se determinó si hubo disminución en los recuentos de *C. jejuni* desde la etapa de eviscerado a enfriado dentro de las plantas y entre las plantas. Además se vió la interacción entre planta y etapa. Para esto se realizó un análisis de varianza y un análisis estratificado mediante chi cuadrado, por el método de Mantel y Haenszen. Todo esto se realizó con el software Epi Info 6.0 (Epi Info, 1990).

Las pruebas estadísticas se consideraron significativas con un $p \leq 0,05$. El estudio consideró un error α de 0,05 y un poder estadístico del 90%.

Se utilizó en siguiente modelo:

$$Y_{ij} = M + P_{pi} + T_{pj} + e_{ijk}$$

Donde: Y = Recuento observado

M = muestra

P = efecto de la planta

T = efecto de etapa

e = error

⁵ de la sigla en ingles Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages

Para determinar las diferencias entre los resultados obtenidos en el enfriador de agua para ambas plantas se usó análisis de varianza (SC tipo III), mediante el software Epi Info 6.0.

6. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos en el estudio.

En total se analizaron 259 muestras de canales de pollo, tanto en la etapa de eviscerado como de enfriado, en dos plantas faenadoras de pollos broiler de la región Metropolitana.

Las 259 muestras se tomaron en 20 diferentes muestreos a lo largo de un año. La frecuencia de obtención de las muestras fue quincenal, de forma intercalada entre plantas. Se realizaron 10 muestreos para cada planta.

Del total de las muestras, 130 fueron tomadas en la planta A y 129 en la planta B. A su vez, de la planta A se obtuvo 68 muestras de la etapa de eviscerado y 62 muestras de enfriado. En la planta B, se obtuvo 68 muestras de eviscerado y 61 muestras de enfriado.

6.1. Ocurrencia de *C. jejuni*

Del total de las canales de pollos analizadas que dieron positivo a *Campylobacter*, solo en un caso dio *C. coli*, siendo todos los restantes *C. jejuni*. Es por esto que si bien los resultados de ocurrencia incluyen al *C. coli*, se hablará de *C. jejuni* en todos los casos.

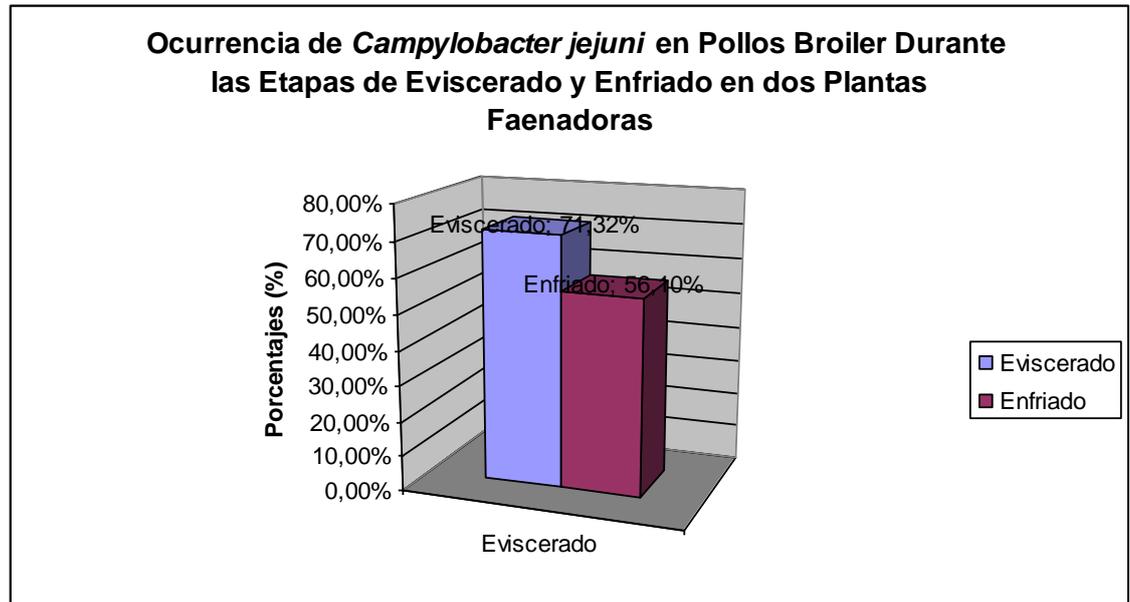
Los resultados obtenidos mostraron que en el 64% de las muestras analizadas (166/259) fue posible detectar la presencia de *C. jejuni*.

6.2. Ocurrencia de *C. jejuni* por Etapa Productiva

En la etapa de eviscerado, se aisló *C. jejuni* en el 71% (97/136) de las muestras analizadas, mientras que para la etapa de enfriado el aislamiento disminuyó significativamente ($p \leq 0,05$), alcanzando niveles del 56% (69/123).

Los resultados se ilustran en la figura N°1.

Figura N°1



6.3. Resultados de Ocurrencia de *C. jejuni* por Planta Faenadora

Ambas Plantas, se encuentran ubicadas en la Región Metropolitana y poseen integración vertical de sus empresas, es decir, las aves que llegan a cada Planta faenadora provienen únicamente de granjas de esa empresa.

Los resultados se observan en la tabla N°1.

Tabla 1. Ocurrencia de Muestras Positivas y negativas de *Campylobacter jejuni* en Pollos Broiler para las Plantas A y B (%)

<i>Campylobacter jejuni</i>	Presente	Ausente	Total
Planta A	82 % (107)	18% (23)	130
Planta B	46% (59)	54% (70)	129
Total	166	93	259

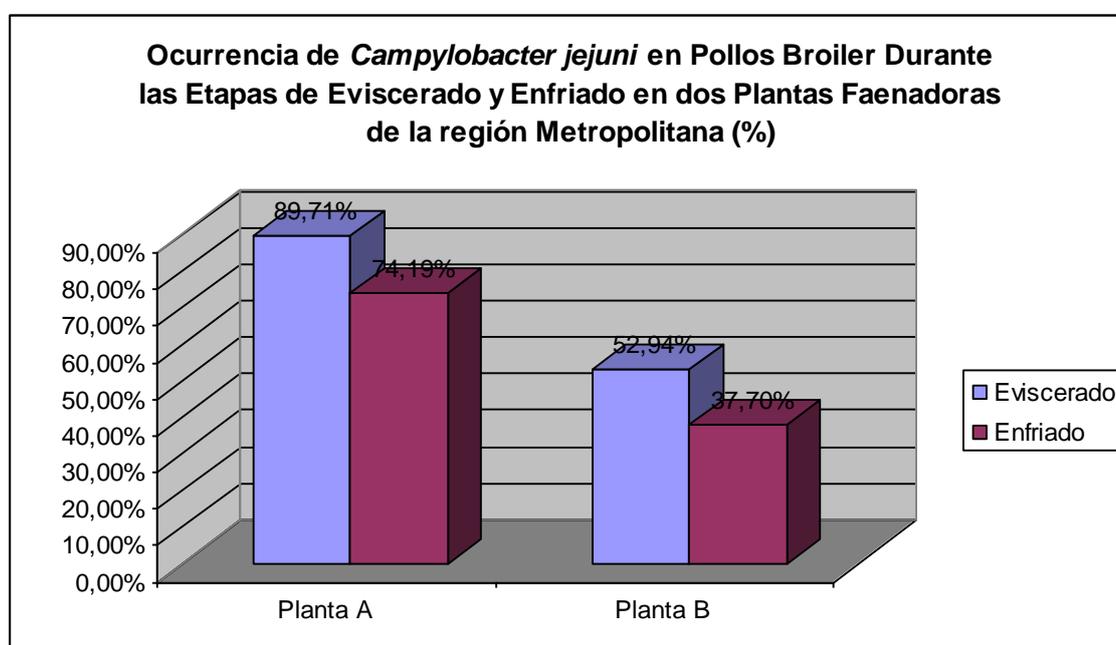
Se evidencia que la planta A presentó mayores niveles de contaminación en sus pollos broiler muestreados, que la planta B. Estas diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

6.4. Resultados de Ocurrencia por Planta y Etapa Productiva

En la Planta A se aisló *C. jejuni* en 89% (61/68) de las muestras de eviscerado, reduciéndose a un 74% (46/62) en la etapa de enfriado.

En el caso de la Planta B para la etapa de eviscerado se obtuvo 53% (23/68) de canales positivas a *C. jejuni*, reduciéndose a un 37% (23/61) en la etapa de enfriado. Los resultados se expresan en la figura N°2.

Figura N°2



Al analizar los porcentajes de contaminación de las canales de aves con *C. jejuni*, en las dos etapas del faenado incluidas en este estudio, se puede concluir que en ambas plantas hay una disminución de los porcentajes de positividad (planta A: 89% a 74%. Planta B: 53% a 37%), sin embargo sólo para la planta A la diferencia resultó ser estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Los cálculos estadísticos mostraron que los porcentajes de contaminación de las canales provenientes de la planta A fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) a la de la Planta B, en las dos etapas analizadas.

En la planta A se observó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de la contaminación por *C. jejuni*, entre la etapas de eviscerado y enfriado de las canales, no obstante esto, el nivel final de contaminación permanece muy alto (74%). En la planta B no se observó una disminución estadísticamente significativa de la contaminación por *C. jejuni* entre las etapa de eviscerado y enfriado. Conforme a lo anterior se puede concluir que las acciones aplicadas en el plan HACCP por estas dos empresas no estarían cumpliendo con su objetivo y requieren revisión urgente.

Con respecto al eviscerado entre las 2 plantas se observó que la planta A tuvo un porcentaje de ocurrencia de 89% versus 53% de la planta B. Estas diferencias son altamente significativas ($p = 0,000002$).

Para la etapa de enfriado (A: 74%; B: 37%), también se observan diferencias altamente significativas ($p < 0,000058$) sin embargo menores que la etapa de eviscerado.

Los resultados se muestran en la tabla N°2.

Tabla 2. Ocurrencia de *Campylobacter jejuni* en las etapas de eviscerado y enfriado de dos plantas faenadoras de la Región Metropolitana (%).

	Eviscerado	Enfriado	Total
Planta A	89% (61)	74% (46)	107
Planta B	53% (36)	37% (23)	59
Total	97	69	

6.5. Recuentos de *C. jejuni* en canales positivas

Se pudo obtener recuentos de *C. jejuni* en 259 canales de pollos broiler, 136 de la etapas de eviscerado y 123 canales de la de enfriado. De éstas, 130 correspondieron a la planta A y 129 a la Planta B. Los resultados expresados como \log_{10} UFC/canal se muestran en la tabla N°3.

Tabla 3. Descripción estadística de los recuentos de *C. jejuni* en pollos broiler obtenidos en las etapas de eviscerado y enfriado en dos plantas faenadoras. Media, Desviación Estándar, Valor mínimo y máximo. Valores expresados en Log₁₀ UFC/Canal

Planta	Etapas	Media	D.E	Min	Max	Mediana
A	Eviscerado	4,59	1,90	0,00	7,70	3,30
A	Enfriado	2,98	1,93	0,00	6,42	5,23
B	Eviscerado	3,07	3,05	0,00	7,70	3,57
B	Enfriado	1,60	2,13	0,00	6,41	0,00

Al hacer un análisis de varianza se pudo concluir que, en general, existen diferencias significativas entre los recuentos de ambas plantas ($p < 0,05$). También existen diferencias significativas al comparar los recuentos obtenidos en las dos etapas analizadas, eviscerado y enfriado. Sin embargo, no se observó una interacción entre planta y etapa ($p = 0,81$). Esto quiere decir que a pesar de que en ambos casos los recuentos se relacionan con las plantas, estas se comportan de forma independiente, pero similar. O sea si bien las disminuciones ocurren en ambas plantas estas diferencias se atribuyen a las etapas, mas no así a las plantas.

Para el caso de la planta A, la disminución de los recuentos desde la etapa de eviscerado a enfriado fue de 1,61, mientras que en la planta B fue de 1,47.

6.6. Concentración de Cloro y Temperatura del “Chiller” y Velocidad de la línea en ambas Plantas Faenadoras

Ambas plantas tienen como último punto crítico de control del plan HACCP el enfriado de las canales. Como los procedimientos son diferentes entre ellas, sólo se midió variables del enfriador: cloro libre, temperatura. Además se midió la velocidad de la línea. Sin embargo, los resultados fueron similares para ambas plantas. Los resultados se expresan a continuación en la tabla N°4.

Tabla 4. Valores Promedio de Concentración de Cloro (ppm), Temperatura (C°), Velocidad de la línea (Pollos/min) en 2 Plantas Faenadoras de Pollos Broiler de la Región Metropolitana

	Concentración de Cloro (ppm)	Temperatura °C	Velocidad de la línea (Pollos/min)
Planta A	0,58	1,56	140
Planta B	0,53	0,59	120

Para ambas plantas los datos fluctuaron entre los 0,25 y 0,75 ppm según el día de muestreo.

No se observaron diferencias significativas ($p=0,4315$) entre las concentraciones de cloro para ambas plantas.

Con respecto a la temperatura del agua del enfriador los valores fluctuaron entre -2 y 2° C.

Al comparar estas mediciones se determinó que la temperatura del sistema de enfriado de las canales de la Planta A era significativamente mayor ($p=0,0024$) que la de la Planta B.

Con respecto a la velocidad de la línea, esta se mide en cantidad de pollos que pasan por minuto. Al saber esto se puede calcular la cantidad de pollos que están en el enfriador por unidad de tiempo determinado. Esto es muy importante en la calidad final del producto. La planta A obtuvo un promedio de 140 pollos/minuto y la planta B 120 pollos/minuto. Se observan diferencias significativas entre ambas plantas ($p<0,0001$). O sea la planta A faena una mayor cantidad de aves por minuto. Esto se traduce en que ingresan más aves al enfriador lo que podría incidir en la calidad final del producto.

6.7. Biotipificación de *Campylobacter* termotolerantes

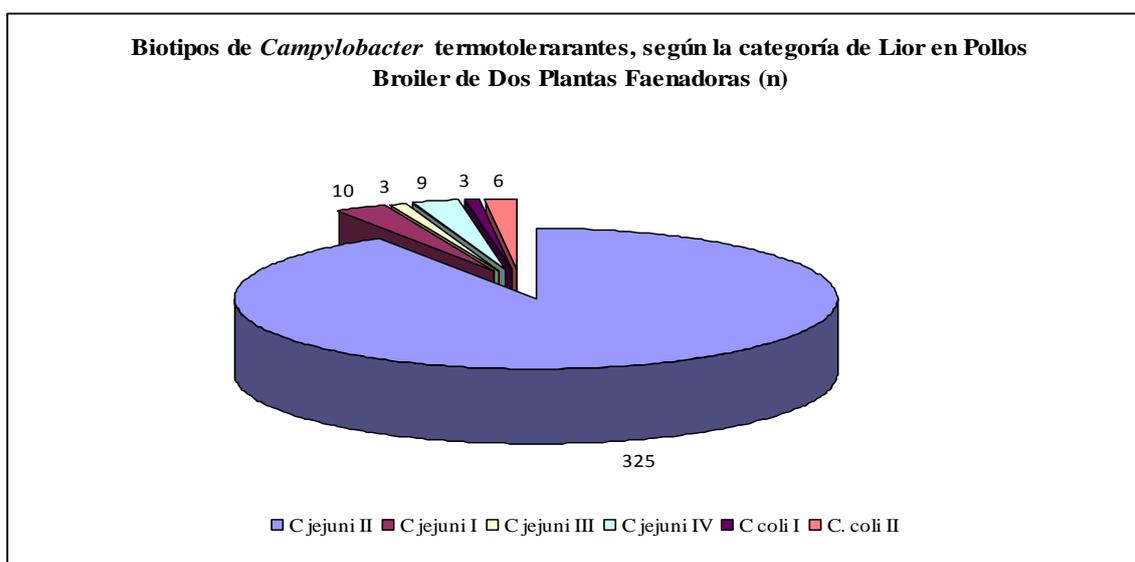
Del total de las muestras positivas (166/259) se obtuvieron entre dos y cuatro colonias por muestra, dando un total de 356 colonias. Éstas se biotipificaron según el esquema de Lior, mediante pruebas bioquímicas. En resumen se observó un 97,5 % de *C. jejuni* y un 2,53 % de *C. Coli*. Si bien, antes se indicó que se encontró solo una canal

con *C. coli*, y ahora aparecen 9 (2,53%), esto es debido, a que en algunas canales se identificaron ambos biotipos, tanto *C. jejuni* como *C. coli*.

El biotipo que se presentó con mayor frecuencia fue el *C. jejuni* biotipo II con un 91,3%. Luego le siguió *C. jejuni I* con un 2,81% y *C. jejuni IV* con un 2,53%. *C. jejuni III* fue el que menos se observó con un 0,84%. Con respecto a *C. coli*, de las 9 colonias aisladas, *C. coli II* se presentó en un 1,7% de los casos y *C. coli I* en un 0,84%.

Los resultados se ilustran en la figura N°3

Figura N°3



6.8. Caracterización Molecular de *C. jejuni* mediante PFGE

Para determinar la similitud genética las cepas aisladas de *C. jejuni* se caracterizaron molecularmente mediante Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE). Este método ha sido probado con éxito para *C. jejuni* y es reconocido hoy en día como el método más exacto de caracterización molecular para este agente (Chang, 1990). La especificidad de los fragmentos de DNA obtenidos está dada por la enzima de restricción utilizada. En este estudio se usaron dos enzimas de restricción, *SmaI* y *KpnI*.

Las cepas analizadas fueron seleccionadas por fecha de muestreo, se eligió por tanto, todas las cepas de la etapa de eviscerado y enfriado de un mismo día de muestreo. Los resultados para cada enzima de restricción se detallan a continuación

6.8.1. PFGE de *C. jejuni* con *SmaI*

De un total de seis muestreos elegidos al azar se caracterizaron 100 cepas, provenientes de la etapa de eviscerado y enfriado de ambas plantas. Como se observa en la Tabla 4, Se obtuvo en total 13 subtipos o patrones, los cuales fueron enumerados del 1 al 13. De éstos, 6 correspondieron a patrones comunes o “clusters” y 7 a subtipos únicos. Mediante el software Treecon® se reconocieron 4 grandes grupos con más de diez cepas cada uno y 2 grupos con solo dos cepas.

El primer “cluster” incluyó a 43 cepas, todas pertenecientes a la planta A. De estas 36 provenían de la etapa de eviscerado y 7 de la etapa de enfriado. Dichos aislados bacterianos se obtuvieron de 3 muestreos diferentes.

El segundo “cluster” agrupó 26 cepas, todas pertenecientes a la planta B y al mismo día de muestreo. De las mismas, 16 cepas correspondieron a la etapa de eviscerado y 10 a la etapa de enfriado.

El tercer “cluster” reunió 10 cepas, todas pertenecientes a la planta B. De éstas, nueve provenían de la etapa de eviscerado y una de la etapa de enfriado. Todos los aislados correspondieron al mismo día de muestreo.

El cuarto “cluster” también agrupó 10 cepas, todas pertenecientes solo a la etapa de eviscerado de la planta A. Estos aislados se obtuvieron en un mismo día de muestreo.

El quinto y sexto cluster agruparon menos cepas, dos cepas cada uno, todas pertenecientes a la planta A. Para el quinto cluster las cepas fueron de la etapa de eviscerado y del mismo muestreo que las cepas del cuarto cluster. En el caso del sexto, ambas cepas fueron de la etapa de eviscerado.

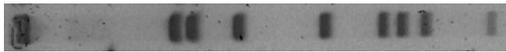
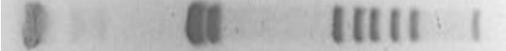
Además se obtuvo 7 subtipos distintos con patrones únicos. Cuatro pertenecieron a la planta A y 3 a la B. En relación a las etapas del proceso, 6 correspondieron a la etapa de eviscerado y solo 1 a la etapa de enfriado.

Se observa que los grandes cluster se diferencian por fecha de muestreo, planta y no por etapa.

El cluster 1 es fiel representante de lo que ocurre en la planta A, ya que reúne a 3 muestreos diferentes. El cluster 4, que también refleja a la planta A, posee un porcentaje de disimilitud entre las cepas de un 50%.

En la figura N°4 se observa el dendograma que muestra el porcentaje de disimilitud de los 13 subtipos de *C. jejuni* reconocidos por la enzima *SmaI*.

Tabla 5. Caracterización Molecular, mediante PFGE, de cepas de *C. jejuni* en pollos broiler en dos plantas faenadoras, con enzima *SmaI*

Patrón	N° cepas	Planta	Etapa	Fotografía patrón
1	43	A	V y F	
2	26	B	V y F	
3	10	B	V y F	
4	10	A	V	
5	2	A	V	
6	2	A	F	
7	1	A	V	
8	1	B	V	
9	1	A	V	
10	1	B	V	
11	1	B	V	
12	1	A	F	
13	1	A	V	

Tipo de patrón, número de cepas encontradas, procedencia de la cepa de acuerdo a etapa (V=eviscerado, F=enfriado) y planta (A y B). Fotografías de Patrones de restricción con enzima *SmaI*

6.8.2. PFGE de *C. jejuni* con *KpnI*

Con respecto a los patrones obtenidos con la enzima *kpnI*, se caracterizaron las mismas 100 cepas con la enzima *SmaI*. En el caso de *KpnI* se obtuvo 12 diferentes subtipos. De estos, se generaron 6 “cluster” y 6 patrones únicos. De los 6 “cluster”, 4 fueron los que agruparon a la mayor cantidad de cepas (Tabla 5).

El primer “cluster” agrupó un total de 45 aislados. A diferencia de los resultados obtenidos con la enzima *SmaI*, en el caso de la *kpnI*, se observa que en este “cluster” hay cepas provenientes de ambas plantas. 32 de la planta A y 13 de la planta B. En relación a las etapas, 31 aislados correspondieron al eviscerado, mientras que 14 a la etapa de enfriado.

El segundo “cluster” agrupó 26 cepas, todas provenientes de la planta B y del mismo día de muestreo. Del total de cepas, 16 pertenecían a la etapa de eviscerado y 10 a la etapa de enfriado.

El tercer “cluster” agrupó 10 cepas, todas provenientes de la planta B y del mismo día de muestreo. De todas las cepas agrupadas, 9 pertenecieron a la etapa de eviscerado y 1 a la de enfriado.

El cuarto “cluster” también agrupó 10 cepas, todas provenientes de la planta A, del mismo muestreo y de la etapa de eviscerado.

El quinto y sexto “cluster” agruparon 3 y 2 cepas respectivamente, siendo todas de la planta A. El quinto “cluster” tuvo 2 cepas de la etapa de eviscerado y una de enfriado, mientras que en el sexto solo aparecieron cepas de la etapa de enfriado.

Se obtuvieron seis patrones únicos, de los cuales 3 pertenecieron a la planta A y 3 a la B. Todos estos patrones fueron de cepas obtenidas durante la fase de eviscerado.

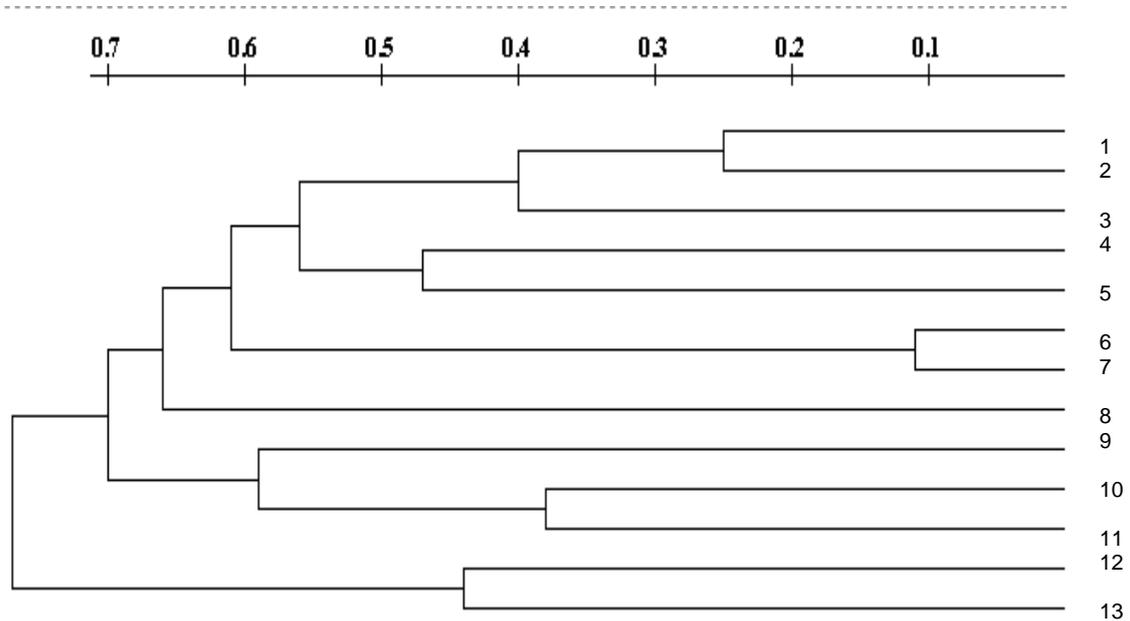
Las figuras N°4 y N°5 representan los dendogramas construidos a partir de las cepas caracterizadas de *C. jejuni*. En general se observa una buena discriminación entre cepas y no hay un grado cercano de similitud entre los “cluster” que agrupan las cepas.

Tabla 6. Caracterización Molecular, mediante PFGE, de cepas de *C. jejuni* en pollos broiler en dos plantas faenadoras, con enzima *KpnI*

Patron	N°Cepas	Planta	Etapa	Fotografía Patrón
1	45	A y B	V y F	
2	26	B	V y F	
3	10	B	V y F	
4	10	A	V	
5	3	A	V y F	
6	2	A	F	
7	1	A	V	
8	1	A	V	
9	1	B	V	
10	1	B	V	
11	1	A	V	
12	1	B	V	

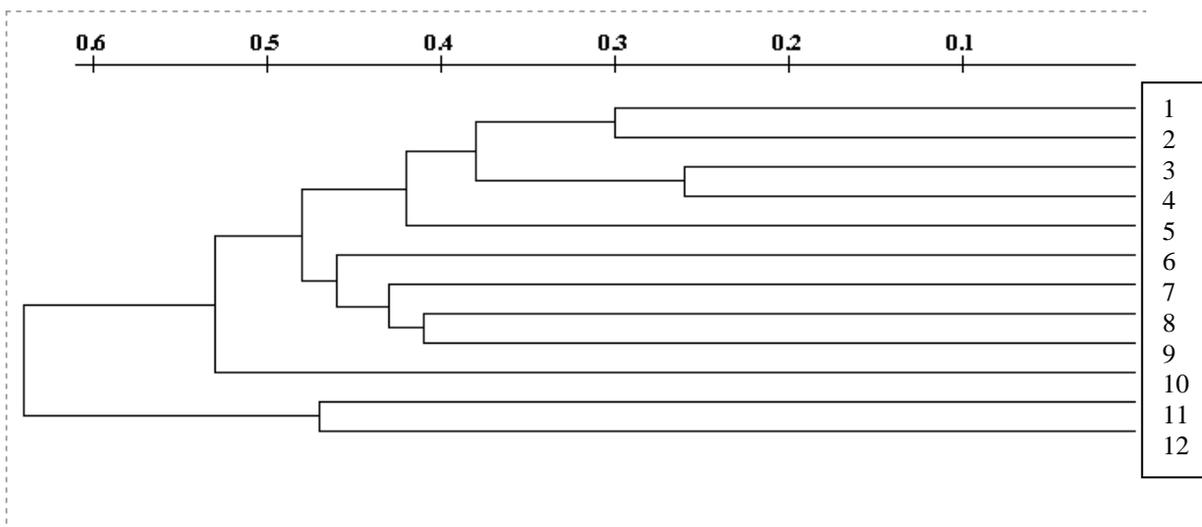
Tipo de patrón, número de cepas encontradas, procedencia de la cepa de acuerdo a etapa (V=eviscerado, F=enfriado) y planta (A y B). Fotografías de Patrones de restricción con enzima *KpnI*

Figura N°4. Dendograma de cepas de *C. jejuni* obtenidas desde pollos broiler digeridas por *SmaI*.



Dendograma donde se muestran los distintos “cluster” obtenidos mediante la enzima *SmaI*, construido por el software treecon®, mediante análisis UPGMA.

Figura N°5. Dendograma de cepas de *C. jejuni* obtenidas desde pollos broiler digeridas con *KpnI*



Dendograma donde se muestran los diferentes “cluster” obtenidos mediante la enzima *KpnI*, construido por el software treecon®, mediante análisis UPGMA.

7. DISCUSIÓN

Acorde con la mayoría de los estudios realizados a nivel mundial, el presente estudio mostró que los niveles de contaminación de pollos con *Campylobacter* en ambas plantas faenadoras fueron elevados. Esto podría representar un alto riesgo a los consumidores de aves de la región y el país.

Los resultados observados en el presente estudio mostraron que la contaminación por *Campylobacter* estaba presente en el 64% de las canales de ave analizadas. Estudios previos, realizados también en plantas faenadoras de la Región Metropolitana mostraron ocurrencias inferiores, un 50% (10/20) de los pollos faenados eran positivos a *Campylobacter* (Vergara, 2000). La diferencia observada en cuanto a los resultados podría deberse a diferencias en el tamaño muestral (259 v/s 20).

Como contraste a estos resultados, Cortez, encontró que al interior de una planta faenadora de pollos en Brasil el porcentaje de ocurrencia para *C. jejuni* fue solo del 4,9% (14/288) (Cortez et al., 2006), porcentajes muy bajos en comparación con la mayoría de los estudios mundiales.

7.1. Eviscerado

En la etapa de eviscerado se aisló *Campylobacter* en el 71% (97/136) de las muestras. Si éstos resultados los separamos por plantas encontramos que se observó que la planta A tuvo un 89% (61/68) de ocurrencia mientras que la B sólo del 53% (23/68).

Estas diferencias son altamente significativas ($p=0,000002$) entre plantas. Ambos resultados son concordantes con los niveles encontrados en diferentes partes del mundo.

Los resultados demuestran que las materias primas de la planta A tenían un nivel de contaminación de sus productos mucho mayor al de la planta B. Esto se confirma en estudios no mostrados, en que se observan los recuentos para *C. jejuni* en la etapa del colgado, mediante tórula cloacal. En tal estudio, se evidencia mayores porcentajes para la planta A que para la B.

Las diferentes ocurrencias en ambas plantas podrían deberse a que las granjas que proveen los pollos a la planta B presentó un mayor número de lotes de pollos negativos o libres de *Campylobacter*, o sea que el día de muestreo todas las muestras dieron negativas (A = 1 lote libre de *Campylobacter*, B = 4 lotes libres de

Campylobacter) (ANEXO N°9), y no debido a que esta planta tuviese mejores medidas de higiene para garantizar la inocuidad del producto.

En cualquier caso las altas ocurrencias demostradas en este estudio no son infrecuentes.

Estudios anteriores realizados en Europa indican que el 80% de los pollos están contaminados con *Campylobacter* en la etapa de eviscerado (Jacob-Reisma, 2000).

Sin embargo existen resultados contrastantes como uno efectuado en Brasil donde se obtuvo solo 5,6% (2/36) de canales positivas para *C. jejuni* en la etapa de eviscerado (Cortez et al., 2006). La explicación que dan los autores, de esta investigación, fue que los lotes analizados podrían haber estado libre de *C. jejuni*. No obstante en un estudio anterior, también en Brasil, se comunicó porcentajes de ocurrencia del 61% (Carvalho et al., 2002).

Por lo general, la etapa de eviscerado es la que presenta los mayores porcentajes de ocurrencia de *Campylobacter*, debido a que en esta fase se puede diseminar el contenido intestinal del ave, lo que facilita la contaminación cruzada de *Campylobacter* presente en las canales. En Japón los resultados de tres investigaciones mostraron que la contaminación de las canales, la línea de proceso y las manos de los manipuladores, provenían de las fecas de las aves. Más aún, se ha correlacionado la contaminación de las canales con la de duodeno y ciego. Sin embargo, la correlación es más fuerte para el primero, debido a que, durante el faenamiento, el ciego es raramente dañado mientras que el duodeno generalmente es roto (Rasschaert et al., 2006).

Según Altekruze la contaminación de las carcasas de pollos por *C. jejuni* puede aumentar entre 10 y 100 veces durante el proceso de desplumado y mas aún en el proceso de eviscerado.

La inadecuada evisceración puede ser el origen de una importante contaminación cruzada para el producto y los manipuladores, ya que la extracción de órganos e intestinos aumenta el peligro de contaminación con su contenido. Es por esto que se deberían tomar varias medidas para intentar evitar la contaminación, tales como:

- Corte de intestino evitando la salida de fecas y su diseminación en la línea de eviscerado.

- Utilizar un sistema mecanizado el cual reduce posible contaminación de las carnes por los manipuladores.

-Si se utiliza un sistema manual, se recomienda que lo realice personal estable, bien entrenado en las prácticas correctas del eviscerado de tal forma que sea un proceso rápido y sin los errores ya descritos.

-Asegurar que los cortes sean homogéneos, reduciendo la posibilidad de hacer cortes adicionales antes del enfriado de las canales, cortes en el canal del muslo o algún corte en cualquier parte del tracto alimentario.

Todas éstas medidas se deben tomar durante el eviscerado, ya que es muy importante que las canales lleguen a esta etapa con la menor carga posible de *C. jejuni*. En el proceso de escaldado, previo al eviscerado, también se produce un riesgo de contaminación. Es por esto que se recomiendan varias medidas para bajar los niveles de contaminación en esta etapa. Generalmente las medidas están relacionadas con el agua del escaldado. Se recomienda revisar su calidad microbiológica (Coliformes fecales /ml de muestra), el flujo de renovación por ave (1 lt) y el control de tiempo de permanencia de las canales (max 3 min.). Supuestamente cumpliendo con estas medidas las canales llegarán al eviscerado con menores recuentos de *C. jejuni*

7.2. Enfriado

La etapa de enfriado es un punto crítico de control (PCC) para asegurar la calidad microbiológica del producto final. Esta es la ultima oportunidad para disminuir la contaminación de las materias primas que se convertirán luego en el producto terminado que recibirán los consumidores.

Como se mostró en los resultados, la disminución de los niveles de contaminación, luego del enfriado fue significativa, no obstante a ello, la carga final, sigue siendo inaceptablemente alta. El presente estudio reveló que el 56% (69/123) de las canales estaban contaminadas con *C. jejuni* en la etapa de enfriado. Los resultados aportados por la planta A fueron significativamente mayores ($p < 0,05$), alcanzando al 74% (46/62) y los de la planta B al 37% (23/61). Nuevamente se observan las diferencias vistas en la etapa de eviscerado y se establece la misma conclusión respecto a estas diferencias.

Si bien la etapa de enfriado tiene como objetivo bajar las cargas de *Campylobacter*, en este estudio se vió que las canales no lograron disminuir la contaminación por *C. jejuni* a niveles aceptables. Esto, sin duda, se debe a que las

canales llegan del eviscerado, al enfriado, con altas cargas del patógeno. Así los niveles de contaminación del eviscerado determinarían la contaminación final.

Pezzoti muestreo carcasas a la salida del “chiller” (de aire refrigerado), en plantas faenadoras de Italia durante el año 200 y 2001. Los resultados mostraron que un 81,3% de las canales estaban contaminadas con *Campylobacter* (Pezzoti et al., 2003). Otro estudio determinó que un 52% de canales presentaban *C. jejuni* tras su paso por el “chiller” (Padungton y Kaneene, 2003).

Estudios nacionales anteriores han mostrado una gran variabilidad en sus resultados. Por ejemplo, durante el 2004 el laboratorio del INTA informó que la prevalencia para carne de ave ascendía a un 45%, sin embargo este resultado se obtuvo de pollos congelados, que deberían tener una contaminación menor que la de los frescos. Otro estudio presentado por el INTA en el Congreso Latinoamericano de Microbiología mostró que la contaminación total de carne de ave fue de un 17% (40/204) siendo de un 20% (20/204) en pollo congelado y del 8,3% (5/60) en carne de pavo (Troncoso, 2004). Posteriormente se aisló *C. jejuni* de carne de ave congelada proveniente de mataderos de la región Metropolitana dando una contaminación, igualmente menor, del 12% (36/300). En otro estudio en Turquía se encontró que *Campylobacter spp.* fue aislado en un 83% y *C. jejuni* en un 75% de muestras de pollos frescos provenientes de supermercados. Moore (Moore et al., 2002) encontró en Irlanda de Norte que un 94% de 63 pollos frescos y un 77% de 44 pollos congelados estaban contaminados con *Campylobacter spp.* termotolerantes. Otro estudio realizado en Corea mostró que *Campylobacter spp.* fue aislado de 181 muestras (69%) provenientes de pollos vendidos en el comercio.

En general las diferencias observadas en los diversos estudios entre los porcentajes de ocurrencia de los aislamientos pueden obedecer a varias causas. En primer lugar están las diferencias entre los métodos de aislamiento. El aislamiento puede realizarse a partir de un trozo de carne de pollo o bien a partir del lavado de canales enteras. De hecho, el cultivo directo en placa proveniente del lavado de canales es el más usado por las agencias reguladoras (Ransom y Rose, 1998; Stern y Robach, 2003).

Otra técnica empleada es el uso de esponjas. Estas se ponen en la piel de las aves absorbiendo el líquido presente. La ventaja que tienen estas dos últimas técnicas es que no se necesita perder pollos por parte de la planta faenadora para realizar el estudio.

Los medios de cultivo también varían, los mas comunes son el Agar brucella, el CCDA y el Campyefx. Además puede haber cambios en los medios de enriquecimiento.

Otro factor que influye es la variación estacional. Si bien el presente estudio se realizo durante todo el año, generalmente, la prevalencia de *C. jejuni* aumenta en los meses de primavera y verano y disminuye a medida que se acerca el invierno. Es por esto que diferentes estudios que solo han tenido sus épocas de muestreo en periodos invernales o estivales pueden mostrar diferencias.

Los resultados de la contaminación por *C. jejuni* encontrados luego del enfriado son el reflejo final de todas las medidas tomadas en la planta para tratar de obtener un producto lo mas inocuo posible.

Al consumidor le da lo mismo que porcentajes de ocurrencia se hayan encontrado en las diferentes etapas. Lo importante es el resultado luego del paso por el enfriador ya que este será el producto que finalmente llegará a los diferentes hogares.

Como se ha dicho anteriormente las diferencias pueden obedecer a las técnicas de muestreo, aislamiento y cultivo de los diferentes laboratorios. A la estación del año de cuando se realizó el muestreo y a la cantidad de lotes libres del patógeno que lleguen a la planta. Otro factor fundamental que puede moderar la contaminación final de las plantas es la aplicación cabal del plan HACCP.

Al tomar el enfriado como último punto crítico de control, pasa a ser automáticamente la etapa más importante para corregir cualquier peligro que ocurra y pueda contaminar el producto final.

Con respecto al inadecuado enfriado se deberían tomar en cuenta las siguientes consideraciones:

- Rápido sometimiento a enfriado (4°C max.)
- Uso de agua potable para obtener el hielo
- Utilización de antisépticos (1-3ppm dióxido de cloro)
- Flujo agua/ave adecuado (2,25 lt/ave)
- Medición T° interna en la parte profunda de la musculatura de la pechuga.

Diversos productos químicos, para la desinfección de carcasas, se han usado al interior de las plantas faenadoras para adicionar al agua del “chiller”. Generalmente el

producto mas usado es el cloro. Aprovechando su condición bactericida se le adiciona al agua del “chiller” para bajar las cargas bacterianas.

La mayoría de las plantas faenadoras de aves norteamericanas utilizan en promedio 2kg hielo/ave en el chiller de agua (International Meat and Poultry HACCP Alliance, 1996). Las canales en el agua con o sin hielo pueden difundir patógenos entéricos, por ello normalmente se agregan antisépticos. En EEUU se utiliza dióxido de cloro en concentraciones 1-3ppm o cloro a 50ppm (International Meat and Poultry Alliance, 1996).

En este estudio se observó que la planta A agregó hipoclorito de sodio a los estanques de agua, mientras que en la planta B se usaba dióxido de cloro. En cada muestreo se obtuvieron los valores de las concentraciones de cloro en el estanque del chiller. Los resultados fueron muy similares, en el caso de la planta A el promedio fue de 0,58 ppm y en el caso de la planta B 0,53 ppm. Las concentraciones de cloro de ambas plantas no tuvieron diferencias significativas ($p \leq 0,05$). En general para todos los muestreos las concentraciones se comportaron de forma similar. Además cabe destacar que las reducciones de los recuentos también se comportaron de forma similar en ambas plantas, con una reducción de 1,61 \log_{10} UFC/ canal para la planta A y una reducción de 1,47 \log_{10} UFC/canal para la planta B. Al tomar esta disminución como porcentajes de canales positivas el resultado arroja un resultado similar. En ambos casos la disminución fue de 16%. Sin embargo para la planta A los niveles finales de *Campylobacter* son de un 74% mientras que para la planta B son de un 37%. La diferencia reside por lo tanto en la carga inicial.

Estos resultados son de suma importancia ya que dan un indicio de las estrategias que se deben tomar para la disminución de *C. jejuni* en los productos avícolas. Si bien las medidas al interior de la planta son fundamentales para la disminución de *C. jejuni*, queda demostrado que si las materias primas ingresan con una alta contaminación al enfriado, saldrán también con una alta contaminación. Estos resultados sugieren que los esfuerzos se deben enfocar en tratar de obtener lotes de pollos en las granjas, libres de *C. jejuni* o con concentraciones muy bajas, para que en la planta faenadora se logre disminuir hasta niveles aceptables la contaminación que recibirá el consumidor.

Waldroup y colaboradores sostenían que el uso de agua clorada en el “chiller” y en el lavado pre evisceración eran efectivos para reducir la prevalencia de

Campylobacter en las carcasas (Waldroup et al., 1992). Los actuales datos, sin embargo, indican que el lavado con agua clorada antes de la evisceración no es un factor suficiente para lograr la disminución a niveles aceptables.

La ducha de interior y exterior que se realiza corrientemente en las plantas faenadoras, permite la eliminación de suciedad visible o macroscópica (sangre, fecas), sin embargo, hay quienes piensan que ella contribuye en la redistribución y extensión de la contaminación bacteriana en la superficie de las carcasas. Este sistema de ducha si bien se acepta en la mayoría de los países, no está estandarizado en relación a la temperatura, presión, duración o utilización de antisépticos (Bremner, 1981).

En un estudio se probó el efecto de la adición de productos químicos en la inocuidad de las canales. En las plantas donde los recuentos eran más altos antes del eviscerado hubo una gran reducción del recuento de *Campylobacter* (Berrang et al., 2007).

Al contrario, las plantas que usaron agua clorada para lavar las carcasas antes del eviscerado no tuvieron una reducción significativamente mayor que las que no usaron ($p=0,44$). Sin embargo la aplicación de agua clorada en el “chiller” si causó una reducción significativa ($p=0,0003$) en el número de *Campylobacter* al menos 1 log ufc/carcasas (Berrang et al., 2007). La aplicación de clorhidrato de sodio acidificado a las carcasas (acidified sodium chlorite) demostró mayor efectividad logrando una mayor disminución (6 log) en la prevalencia de *C. jejuni* luego del paso por el chiller con el agregado del antibacteriano.

Aunque ha sido demostrado que la contaminación cruzada de las materias primas ocurre durante el procesamiento, incluido el escaldado, desplumado, eviscerado y enfriado (Berndtson et al., 1996; Ono y Yamamoto, 1999; Berrang et al., 2001) todavía se conoce poco sobre las posibles rutas de transmisión de *Campylobacter* en las superficies. Diversos autores han demostrado la existencia de *Campylobacter spp.* en el aire de las plantas faenadoras (Oosteron et al., 1983; Hagmar et al., 1990; Berndstone et al., 1996; White et al., 2001). Sin embargo la información es limitada considerando la asociación entre *Campylobacter* ambiental y la contaminación de los pollos. En un estudio se determinó la presencia de *Campylobacter spp.* en el aire. En el área del eviscerado se encontró $5,9 \times 10^2$ UFC /M3 en el aire. Fuera de la planta no se encontró *Campylobacter*. Además previo al eviscerado tampoco se aisló *Campylobacter*, sólo se obtuvo cultivos positivos en el momento de la faena.

Las otras posibles rutas de transmisión son las máquinas y utensilios usados durante la faena, además de los trabajadores. En un estudio realizado en plantas faenadoras de la Región Metropolitana se encontró *C. jejuni* en los equipos utilizados durante la evisceración. (Cortadora de ano, tijera, cuchillo contre, paleta eviscerado y cuchillo). El resultado fue relativamente alto con 40% (2/5) de equipos contaminados (Vergara, 2000). También se buscó *C. jejuni* en el agua del “chiller”, sin embargo no pudo ser aislado el patógeno. Esto es concordante con estudios realizados en el INTA donde tampoco se ha observado la presencia de *C. jejuni* en el agua del “chiller” (datos no publicados).

Diversas investigaciones han sido realizadas para disminuir la ocurrencia de *C. jejuni* en los pollos broiler. Por ejemplo se ha probado la irradiación de las canales. Si bien este es un método efectivo, resulta costoso y no siempre aceptado por los consumidores ya que por normas del etiquetado debe informarse al consumidor. Otro método sería la aplicación de ácido láctico a las canales al 2,5%, pero falta más investigación. Como se ha dicho anteriormente las estrategias más usadas son la aplicación de frío a las canales, si bien la aplicación de aire frío es mucho más efectiva que el enfriado por agua (“chiller” de agua), resulta mucho más costosa. El otro método que se ha usado con éxito es el congelamiento de las canales o parte de ellas por pocas semanas, con esto se logra reducir un factor de 10 a 100 la contaminación por *C. jejuni*, sin embargo por asuntos logísticos de las empresas no siempre se puede vender aves congeladas ya que el consumidor las prefiere frescas (Wagenaar *et al.*, 2006).

Lindblad, informó que el “chiller” de aire podría ser mas efectivo que el de agua, por disminuir en un mayor grado la prevalencia de *Campylobacter* en las canales de pollos broiler, esto debido a que el aire puede dañar y matar a *Campylobacter*, debido a la desecación que le provoca (caída de Aw) (Lindblad *et al.*, 2006). Sin embargo otro estudio mostró que las diferencias entre un chiller de aire y uno de agua, eran estadísticamente significativas, con menores recuentos para el “chiller” de agua, contrario a lo que sugiere la literatura. Sin embargo los autores sostienen que esta fue menor. Para el caso del enfriado por agua los recuentos fueron de 1,81 contra 2,40 por aire. La explicación que dan los autores fue por un efecto de dilución o lavado de las carcasas en el caso del “chiller” de agua comparado con el de aire (Berrang *et al.*, 2008).

Tal como se ha dicho anteriormente los principales esfuerzos deberían realizarse durante la crianza, en la granja, para obtener pollos libres de *Campylobacter*. La

prevalencia de las canales está directamente relacionada con la condición del lote de origen. Por ello existen algunos lotes de pollos que están libres de *Campylobacter* y entre los lotes positivos algunos pueden llevar más que otros. Es así que el estatus inicial del lote influenciará en las carcasas procesadas.

Un trabajo realizado en Bélgica, que estudió la prevalencia de *C. jejuni* en granjas de crianza y luego en el matadero arrojó que de 39 lotes había 11 libres de *C. jejuni* (28%). Luego de la faena, se encontraron solamente 8 lotes libres de *Campylobacter* (22%) (Rasschaert *et al.*, 2006). Esto podría dar indicios que existe la contaminación cruzada de una planta, por lo que el buen trabajo durante la crianza debe ser complementado por higiene durante el faenamamiento.

7.3. Recuentos

Si bien el conocimiento de los porcentajes de ocurrencia de *C. jejuni* en las canales es muy importante, dentro de la epidemiología de *C. jejuni* en pollos broiler, una herramienta fundamental para evaluar el riesgo potencial para el consumidor, son los recuentos presentes en las canales. Los recuentos obtenidos en las canales de ambas plantas estudiadas tuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), sin embargo el comportamiento observado en cuanto a la disminución de los recuentos fue similar. Esto sugiere que los métodos de desinfección en el “chiller” de agua y la forma como se realiza el eviscerado más todos los procedimientos de la faena, serían mucho más efectivos si las aves llegaran a la planta faenadora con bajos recuentos de *C. jejuni*.

En las etapas también se observó una diferencia significativa, por lo que se concluye que hay disminución de los recuentos en ambas plantas, sin embargo estos siguieron siendo altos con respecto a los niveles aceptables.

Los resultados mostraron que en general los recuentos obtenidos fueron mayores en la planta A que en la B. Informes de otros autores han reportado recuentos de 2,66 \log_{10} UFC/ml en el eviscerado y 0,43 luego de su paso por el chiller (Berrang *et al.*, 2007). Estos resultados son bastante más bajos que los obtenidos en el presente estudio (planta A 4,59 eviscerado y 2,98 enfriado; planta B 3,07 eviscerado y 1,60 enfriado). Cabe citar otro estudio, realizado en Italia, que mostró recuentos para *Campylobacter* mayores que el presente, con una media de 5,16 \log_{10} UFC/canal. En este estudio los rangos se movieron entre 3,18 y 7,99 (Manfreda *et al.*, 2006). En dicho estudio pudieron relacionar el paso por el enfriador con la disminución de los recuentos.

Debido a que *C. jejuni* y *C. coli* son capaces de multiplicarse entre 30 y 46°C y requieren condiciones de microaerofilia, es altamente improbable que los recuentos de estos organismos se incrementen en las canales contaminadas. Es por esto que los niveles obtenidos en las carcasas procesadas representan en si un riesgo real para los consumidores, ya que bastan 500 células, para iniciar la infección en los huéspedes susceptibles.

A pesar de que la adecuada cocción de los pollos elimina todos los riesgos, existen consumidores que continúan cometiendo errores en esta etapa, lo que llevan a la presentación de la enfermedad.

Michaud y colaboradores, mediante caracterización molecular por PFGE, intentaron correlacionar si los brotes de infecciones por *Campylobacter* en humanos, se podían relacionar al consumo de productos avícolas. En su estudio encontraron que el 46% de los pollos aislados, coincidieron con uno o mas subtipos de *C. jejuni* en humanos. Sin embargo, la mayoría de los subtipos que causan infecciones clinicas en humanos nunca fueron encontrados en aislados de pollos, sugiriendo que puede haber otra fuente importante de infección que no sean los productos avícolas (Michaud *et al.*, 2005).

Si bien esta no es la tendencia general, es importante este estudio ya que marca la pauta que se debiera seguir. Tratar de tener caracterizadas las cepas de *Campylobacter* provenientes de los pollos de la región, para así luego poder tratar de relacionarla con brotes de infecciones humanas.

Es por esto que aparte de saber los recuentos y canales positivas de *Campylobacter*, resulta de mucha utilidad la individualización e identificación de las cepas aisladas. Con esto se recoge información epidemiológica del patógeno para poder relacionar fuentes de contagio y métodos de transmisión.

7.4. Biotipificación

Los métodos fenotípicos convencionales tales como las pruebas bioquímicas pueden conducir a resultados discrepantes entre laboratorios y tienen poder de discriminación mucho menor a las pruebas genotípicas, ellos aportan información útil, ya que la mayoría de los laboratorios los utiliza con lo que se puede comparar información a nivel mundial y local.

En el presente estudio se usó la biotipificación según lo propuesto por Lior. De las especies de *Campylobacter termotolerantes*, se encontró que el más prevalente en las canales de pollo fue *C. jejuni* con un 97,5%, *C. coli* con un 2,53%. *C. lari* no se detectó en el presente estudio.

Rasschaert caracterizó 309 cepas, obteniendo 275 (90%) correspondientes a *C. jejuni*, 27 (8,7%) que correspondieron a *C. coli* y 7 (2,2%) a *C. lari*. El estudio además mostró que lotes contaminados con *C. coli* tuvieron una menor densidad de contaminación que los lotes contaminados con *C. jejuni* (Rasschaert et al., 2006). Otro estudio arrojó que un 70,1% de las cepas fueron *C. jejuni*, 21,1% *C. coli* y 8,6% *C. lari*.

Por lo general todos los estudios son concordantes, sin embargo en Italia se encontró que en una planta faenadora un 49% correspondía a *C. jejuni* y un 47,5% a *C. coli* (Manfreda et al., 2006).

7.5. Caracterización Molecular

En este trabajo se caracterizaron 100 cepas de *C. jejuni* aisladas de canales de aves provenientes durante las etapas de eviscerado y enfriado. La caracterización molecular se realizó mediante PFGE. Para el caso de la enzima *SmaI* los resultados mostraron 13 subtipos, de los cuales cuatro (1, 2, 3, 4) fueron los más frecuentes, dos diferentes en cada planta. De ellos, tres se encontraron en ambas etapas de proceso, el restante sólo se encontró en la fase de eviscerado. Esto indica que por lo general los patrones obtenidos eran propios para la planta y día de muestreo. Los patrones obtenidos en la etapa de eviscerado fueron similares a los de las cepas analizadas durante el enfriado lo que sugeriría que la presencia de dicha contaminación no se debe a agentes externos.

Se puede concluir que en general los patrones obtenidos en la etapa de eviscerado fueron los mismos obtenidos en la etapa de enfriado, para una misma planta y un mismo día de muestreo. Sin embargo cabe destacar que para la planta A se observó un patrón diferente en la etapa de enfriado, que no se vio en el eviscerado. Este aislado a la cepa que más se asemeja es a una tomada el mismo día de muestreo en la etapa de eviscerado (45% de disimilitud).

Es difícil conocer el origen de este aislado ya que no se puede concluir que exista contaminación ambiental por *C. jejuni*, ni que sea un subtipo específico de la planta. Para poder responder a estas interrogantes habría que aislar cepas ambientales en

esta etapa del proceso y caracterizarlas molecularmente para ver si son similares a las encontradas.

Se cree que los subtipos de *C. jejuni*, son exclusivos del lugar de procedencia de las ave y no de la planta y que al interior de esta no ocurre contaminación sino que simplemente las cargas de *C. jejuni* en las canales de los pollos son provenientes del contenido intestinal de estos.

La teoría mas valida para explicar la contaminación de las canales a la salida del “chiller” sería la alta carga de *C. jejuni* con que llegan las aves a la planta faenadora. El hecho que se demostrara que existen algunas cepas que solo se aislaron durante la etapa de eviscerado sugiere la necesidad de estudiar de forma más detallada estos aislados. Con esto se podría establecer si las cepas encontradas en ambas etapas son más resistentes a condiciones ambientales o desinfectantes utilizados (biofilms) que las cepas encontradas solo en la fase de eviscerado.

Estudios anteriores han sugerido que el procesamiento de los pollos podría afectar la diversidad de las bacterias encontradas, planteando que tras el paso por el “chiller” se podrían seleccionar ciertos subtipos de *Campylobacter* (Sanchez et al., 2002). Sin embargo, Berrang encontró que los subtipos identificados tras el paso por el chiller eran los mismos que los encontrados previo a esta fase, por lo que aparentemente no habría un factor selectivo positivo para ciertas cepas (Berrang et al., 2008).

Con las cepas analizadas se observó que *C. jejuni* muestra gran heterogeneidad genética, con *SmaI* se observó 13 patrones y con *KpnI* 12. Además, con ambas enzimas se generaron 4 grandes cluster con igual cantidad de cepas cada uno. Los patrones generados en ambos casos fueron diferentes, debido al sitio de corte específico de cada enzima.

Una diferencia observada entre ambas enzimas fue que en el caso de *KpnI* se encontró un patrón semejante en ambas plantas (cluster 1), evento que no ocurrió para el caso de la *SmaI*. Esto podría indicar una mayor discriminación para *SmaI* que para *KpnI* ya que es capaz de diferenciar en un cluster a las cepas de cada planta. En otras palabras *SmaI* encontró menor grado de disimilitud entre cluster.

Tanto *SmaI* como *KpnI* agruparon los patrones según planta y día de muestreo, y no según etapa, por lo que se puede pensar que la contaminación con *C. jejuni* proviene en gran medida del ave y no es producto de la contaminación ambiental al interior de la planta faenadora.

En esta tesis se encontraron cepas de *C. jejuni* del mismo subtipo en una planta, en diferentes días de muestreo, como por ejemplo en el cluster 1 (*SmaI*). Las posibles explicaciones con respecto a este fenómeno pueden ser que los lotes provenían de las mismas granjas de origen o que existan algunas cepas de *Campylobacter* arraigadas en las plantas faenadoras (“biofilms”). Si bien se tiene la información de que subtipo corresponde a cada lote, desgraciadamente no se pudo establecer si estos lotes provenían de la misma granja. En un futuro se debería investigar esta incógnita, a nivel de granja, para ver donde hay que poner más esfuerzos para la erradicación de *Campylobacter* de la industria avícola.

Los resultados de PFGE mostraron, que con ambas enzimas, se obtuvo uno o dos patrones estaban presentes en la etapa de enfriado, sin embargo, solo con esta información, no se puede concluir que esto obedezca a contaminación ambiental. Para ello se debería detectar el mismo patrón en cepas ambientales, ya sea en el agua del “chiller” o en la superficie de estos. Ello es posible ya que se sabe que *Campylobacter* forma “biofilms”, un conglomerado de bacterias que se hacen más resistentes a las condiciones ambientales así como a las sustancias sanitizantes y antibióticos. No obstante se sabe que nunca se pudo aislar *Campylobacter* del “chiller” en ambas plantas (estudios del INTA no publicados).

Al analizar toda la información generada en este estudio, se puede concluir que además de los esfuerzos al interior de la planta faenadora, por mantener las Buenas Prácticas de Manufactura y la aplicación del sistema HACCP, se deben poner mucho esfuerzo en obtener aves con la menor carga posible de *C. jejuni* al momento del ingreso a la planta. Esto se sustenta en el hecho que los distintos patrones obtenidos se agrupan según día de muestro y planta visitada. Para contribuir a esta teoría se debe intentar aislar *C. jejuni* en la etapa de colgado, lo que representaría la condición de la materia prima en la granja.

Un estudio caracterizó 309 cepas de *Campylobacter* provenientes de tres plantas faenadoras de Bélgica. La caracterización se realizó mediante PFGE con la enzima *SmaI* dando 25 genotipos diferentes. El resultado fue similar a los obtenidos en esta memoria de título. En general se observó que los subtipos fueron únicos para cada planta y en muy pocas ocasiones se encontró genotipos comunes. Además los subtipos identificados en la piel de las aves al inicio de la faena lo fueron también en el duodeno

y el ciego posteriormente en el mismo lote o en lotes previamente faenados el mismo día (Rasschaert *et al.*, 2006).

En esta memoria de título siempre se muestreó sólo un lote en un mismo día de muestreo, sin embargo se encontraron subtipos comunes en la planta, de lotes distintos, faenados también en fechas diferentes. Por lo que la pregunta a continuación sería si esas aves provinieron de las mismas granjas de crianza. Lamentablemente tal información no se pudo obtener en el presente estudio.

Información disponible indica que lotes de aves libres de *C. jejuni* al ingreso a la faena, poseen niveles de contaminación menores en el producto final que los lotes positivos. A pesar de esto no se puede descuidar la higiene al interior de la planta ni la adecuada ejecución del sistema HACCP, ya que esta es la única forma de controlar la contaminación una vez que el ave ya está positiva a la bacteria.

7.6. Crianza

Además de las medidas de higiene al interior de la planta faenadora (HACCP, BPM) que son fundamentales, se deben realizar otros esfuerzos para el control de *Campylobacter* en las granjas, durante la crianza. Es por lo tanto muy necesario identificar las más importantes fuentes de colonización de los lotes, para que así las estrategias de intervención puedan ser desarrolladas (FSA, 2004). Estudios previos indican que generalmente los reservorios ambientales tales como el agua de bebida, las camas y los trabajadores de las granjas han sido señalados como las fuentes más probables de contaminación.

Por lo general las aves llegan a las plantas faenadoras con altos niveles de *Campylobacter* provenientes de las granjas. Un estudio realizado en la Región Metropolitana estimó que el 70% de los pollos que ingresaban a la planta estaban contaminados con *Campylobacter*, además entre las gallinas el 31% que entraban a la faena estaban contaminadas. Otro estudio que se realizó en tres plantas faenadoras indicó que los pollos a la entrada de la planta venían con 73%, 34% y 87% de contaminación por *Campylobacter* (Rasschaert *et al.*, 2006).

Estudios internacionales han revelado grandes diferencias entre las prevalencias al interior de las granjas. Por ejemplo en Suecia se observó una prevalencia del 27%

(n=287) (Berndston *et al.*, 1996) mientras que un estudio del Reino Unido se vio un 95% (n=100) (Evans y Sayer, 1997). Otro estudio indicó que el 72% (n=39) de los lotes que llegaban a la planta faenadora estaban colonizados por *Campylobacter* (Rasschaert *et al.*, 2006).

Las diferencias en los resultados pueden obedecer a diversos factores, entre los cuales se incluyen los diferentes métodos de aislamiento, diferentes manejos sanitarios de los lotes en las granjas, y probablemente el periodo estacional en el cual los pollos fueron criados.

Diferentes estudios mencionan una variación estacional en la prevalencia de *C. jejuni* en los lotes (Berndston *et al.*, 1996). Esto se expresa con una mayor tasa de colonización en verano que en invierno. Sin embargo en el presente estudio no se pudo establecer la relación directa entre estacionalidad y porcentaje de carcasas más contaminadas, pero se observa que, por lo general, en los muestreos de los meses de verano la contaminación es más alta que los meses de invierno. Manfreda y colaboradores encontraron que los muestreos de otoño y verano fueron significativamente mayores que los de invierno y primavera (Manfreda *et al.*, 2006). Otra diferencia encontrada en el mismo estudio fue entre lotes muestreados de granjas que provenían mas lejos y cerca de las plantas faenadoras. Encontraron que granjas que estaban a más de 100km de distancia tuvieron una diferencia significativa de las que estaban cerca. Además estudiaron si había diferencias entre las canales que provenían de lotes mayores y menores a 10.000. Por lo general, transportes largos y galpones con mucha cantidad de animales, favorecen el estrés, favoreciendo la presencia de *C. jejuni*.

Cuando una planta faenadora tiene como estrategia para conseguir la inocuidad de los alimentos, puntos críticos de control, está diciendo que posee un plan HACCP. Por lo tanto para la correcta implementación del plan, se debe cumplir antes con una serie de requisitos, tanto en la crianza como en el faenamamiento.

Estos prerequisites de seguridad alimentaria se definen como los procedimientos básicos que permiten el control sanitario de las condiciones operacionales dentro de un establecimiento. El cumplimiento de tales prerequisites es un factor clave que permitirá asegurar que los procesos de un alimento cumplan con las normas sanitarias (American Meat Institute, 1997).

Las buenas prácticas constituyen los prerequisites. Dentro de las cuales se encuentran, las buenas prácticas agrícolas (BPA), las buenas prácticas ganaderas (BPG),

las buenas prácticas de manufactura (BPM) y las buenas prácticas higienicas (BPH). Todas las mencionadas se han incorporado en los códigos de la producción y manejo agropecuario con el nombre genérico de Buenas Practicas Agrícolas.

Las dos primeras hacen referencia a todas las acciones que se deben realizar en las granjas con el ave viva. Tanto las construcciones, los insumos avícolas, los manejos de las aves, la alimentación, el bienestar animal y el manejo medioambiental entre otros. Mientras que las dos últimas son las que interesan al interior de la planta faenadora de aves.

Las Buenas Prácticas de definen como las acciones tendientes a prevenir y controlar los peligros para la inocuidad del producto en las etapas de proceso y manipulación del mismo. Además debe considerar un mínimo impacto sobre el ambiente y la salud de los trabajadores. Se fundamentan en la identificación de peligros y la determinación de las prácticas más apropiadas para su prevención y control.

Al relacionar el presente trabajo con las buenas prácticas se puede mencionar que al encontrar *Campylobacter* en cantidades considerables en el producto final, el cual constituye un peligro microbiológico, se debiera considerar donde puede haber ingresado el patógeno y cual acción fue la que fallo para eliminar el peligro.

En un estudio anterior se evaluaron las medidas a tomar cuando se encuentran aves positivas para *Campylobacter* tanto en su intestino como carcasas.

Sobre las medidas a tomar al interior de la planta tanto para el enfriado como eviscerado ya se habló anteriormente, sin embargo, con respecto a las medidas antes que las aves lleguen a la planta no se ha comentado.

Se sabe que las aves portan en su intestino porcentajes variables de microorganismos enteropatogenos tales como *Salmonella entérica* y *C. jejuni*, los que pueden estar presentes en el producto final.

Las aves al ser sometidas a sistemas de producción altamente intensivos, favorecen la diseminación de estos patógenos en el plantel. Lo anterior se traduce en materias primas que ingresan a la planta faenadora con una determinada carga de patógenos zoonóticos, que pueden ir aumentando o disminuyendo, según las medidas de control que se apliquen durante el proceso. Por tales motivos las empresas deben tener información básica sobre sus materias primas.

Las medidas a tomar serían el control de la planta sobre sus proveedores tanto en el conocimiento sobre las condiciones productivas de los planteles proveedores y certificación de las materias primas. La información debe referirse puntualmente a la

ubicación de los planteles, la construcción y diseño de estos y las medidas de bioseguridad que deben tener.

Además las empresas deben exigirle a los planteles certificación de los siguientes aspectos:

- Confirmación del periodo de ayuno previo al sacrificio con la finalidad de disminuir la carga de contenido intestinal.

- Realización de inspección Ante Mortem en el plantel para excluir las aves enfermas del lote que ingresará al matadero.

- Homogeneidad en los lotes de aves, especialmente para la correcta ejecución de las etapas mecanizadas del proceso (por ejemplo regularse los equipos al tamaño de las aves) (Vergara, 2000).

Si bien, en el presente estudio, las plantas donde se muestreo poseían integración vertical, es conveniente manejar las granjas y plantas como empresas separadas exigiendo todos los certificados y documentos para tener información mas fluida y transparente.

Aparte de esto, las plantas faenadoras deberían cumplir con los siguientes aspectos:

- Tener documentación que demuestre la aplicación de las buenas prácticas de producción en los planteles de pollos

- Realizar monitoreos periódicos a los proveedores para verificar el cumplimiento de las exigencias.

- Realizar auditorias al proveedor para validar la condición de su programa de certificación.

- Mantener los registros de toda la información obtenida y relacionada a materias primas. Los registros deben ser legibles y accesibles.

En el caso que las materias primas no cumplieran con la conformidad de las especificaciones se debería impedir el faenamiento de las aves o faenarse con posterior análisis determinado por la autoridad sanitaria.

La otra oportunidad para la contaminación de las materias primas con agentes biológicos sería durante el transporte. En este, debido al estrés, se produce una proliferación de microorganismos intestinales. Las medidas a tomar en este caso serían

disminuir el estrés teniendo jaulas de transporte en buen estado y evitar las maniobras violentas durante el recorrido de los camiones.

Si bien corroborar esta información escapa a los objetivos del presente estudio, en las visitas a las plantas se pudieron observar jabs en buen estado, patios de espera techados y ventiladores para las épocas de calor. Por otro lado cada vez se están haciendo más esfuerzos por capacitar a conductores para un manejo responsable durante el transporte de las aves.

Con respecto al estrés también hay que tener en cuenta la duración del viaje desde las granjas hacia la planta faenadora. Sobre este punto no se pudo obtener la información necesaria sin embargo se presume que las distancias en general fueron menores a 100km.

7.7. Evaluación de Riesgo

Conocer la contaminación de *Campylobacter spp.* y específicamente *C. jejuni* en los productos avícolas es importante tanto para las perspectivas de la salud pública como para el comercio internacional. Hoy en día la estrategia que deben tomar los gobiernos para el control de estos patógenos se basa en la evaluación de riesgo. Este método promovido por la FAO y OMS entrega la base científica para generar las mejores acciones que aseguren la inocuidad de los alimentos. La evaluación de riesgo se basa en la probabilidad de ocurrencia de una enfermedad en una determinada combinación patógeno-producto, en este caso *C. jejuni* en pollos broilers enteros.

Dentro de la evaluación de riesgo se describen cuatro fases que son: la identificación del peligro, la caracterización del peligro, la evaluación de la exposición y la caracterización del riesgo. La primera fase tiene por fin determinar el o los agentes que pueden causar el efecto nocivo para la salud y que pueden estar presentes en un determinado alimento. En este caso fue *C. jejuni* en los pollos broiler. La segunda etapa tiene como objetivo lograr una descripción cualitativa y/o cuantitativa de la gravedad y duración de los efectos adversos que pueden resultar de la ingestión del agente patógeno.

La probabilidad que un patógeno desencadene una infección está influenciada hasta cierto grado por tres factores. Estos incluyen las características del patógeno y del huésped y la matriz o condiciones de ingesta (FAO, 2001). Si bien en este estudio no hay un alcance sobre esto, podría contribuir debido a que se obtuvieron patrones

específicos de *C. jejuni* mediante PFGE. Así se podría estimar en un futuro si algún tipo específico de *Campylobacter* es más virulento que otro o podrían servir como base genética para dilucidar si algunas cepas tienen mayor capacidad de generar infecciones en las personas.

Otra contribución sobre la caracterización del peligro sería los recuentos en que *Campylobacter* está presente en los pollos. El informe de la FAO/OMS concluye que a pesar que la probabilidad condicionada que la probabilidad de enfermedad depende de la probabilidad de infección, la probabilidad última de enfermedad aumenta con la dosis ingerida. Es por esto que es necesario saber y cuantificar los niveles de contaminación de *C. jejuni* a través de los recuentos.

La tercera etapa es la evaluación de la exposición. Esto es estimar la probabilidad y la magnitud de las exposiciones a *Campylobacter* como resultado del consumo de una comida con pollo. Para esto la FAO/OMS recomienda desarrollar un modelo que detalle la prevalencia y la cantidad de *Campylobacter* en la cadena de producción completa de la granja a la mesa. Para esto se construye un modelo de naturaleza modular y cada etapa de la cadena de abastecimiento se describe mediante un modelo matemático por separado. Así los módulos serían crianza y transporte, faena y procesamiento y preparación y consumo. El resultado consiste en un estimado de la probabilidad de que un individuo quede expuesto a por lo menos un *Campylobacter*, junto con una medición del número de células de *Campylobacter* ingerida.

El presente estudio no logra ni pretende establecer la evaluación de la exposición de *C. jejuni*, sin embargo entrega herramientas para que se pueda construir el modelo.

Sobre el módulo faena y procesamiento que es el que interesa para efectos de este estudio, se indica que se requieren mediciones cuantitativas de la cantidad de *Campylobacter* en un ave muerta antes y después de cada una de las etapas de procesamiento consideradas. Sin embargo en el documento señalan que los datos disponibles son escasos y solo hay pequeños grupos de datos disponibles en la actualidad.

Finalmente la caracterización del riesgo representa la estimación cualitativa y/o cuantitativa, respecto a la probabilidad que debido a la ingesta del alimento contaminado con el patógeno se produzca uno o más efectos nocivos, evaluándose su gravedad para la salud. Nuevamente mediante la caracterización molecular del patógeno se podrá contribuir a esta etapa, conociéndose si una cepa será mas agresiva que otra.

En resumen, el presente estudio entregó información local, de vital importancia, acerca de lo que está sucediendo en algunas plantas faenadoras de la región. En el caso específico de las plantas revisadas se recomienda una revisión por parte de sus sistemas HACCP, ya que los resultados estarían indicando que hay fallas. Por otra parte se recomienda a entidades gubernamentales afines desarrollar la evaluación de riesgo como política para la búsqueda de patógenos y fiscalización de las plantas faenadoras.

8. CONCLUSIONES

- La planta A presentó mayores porcentajes de ocurrencia y recuentos de *C. jejuni* para la etapa de eviscerado y enfriado.
- Las dos plantas se comportaron de forma similar en cuanto a su disminución en los niveles de *C. jejuni* al pasar de una etapa a otra. Sin embargo, solo en la planta A la diferencia fue estadísticamente significativa.
- En relación a las características del chiller, los niveles de cloro medidos en el agua de ambas plantas fueron similares, sin embargo la temperatura en el agua de chiller de la planta B fue menor.
- La planta B tuvo menores porcentajes de ocurrencia y recuentos a la salida del enfriador ya que en el eviscerado también tuvo menores porcentajes y recuentos.
- Los esfuerzos deben centrarse en el ingreso de los pollos a la planta faenadora con la menor contaminación posible de *C. jejuni*.
- Mediante la caracterización molecular se pudo concluir que por lo general las cepas aisladas eran propias de la planta y fecha de muestreo, no así para la etapa.
- No hay evidencias de contaminación ambiental al interior de la planta. Por lo general siempre las cepas del eviscerado aparecen en el enfriado.
- Todas las prácticas sanitarias son necesarias, desde la granja a la mesa. Ya sea buenas prácticas agrícolas, ganaderas, de higiene, manufactura y fundamentalmente el sistema HACCP. Solo así se podrá obtener un producto inocuo.

9. BIBLIOGRAFÍA

- **ACUSTIC, R.E.; NESHEIM, M.C.** 1994. Producción Avícola. México, D.F., El Manual Moderno. 395p.
- **ADAK, G. K.; LONG S.M.; O'BRIENS, J.** 2002. Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Gut* 51: 832-841.
- **ALLOS, B. M.** 2001. *Campylobacter jejuni* infections: Update on emerging issues and trends. *Clin. Infect. Dis.* 32:1201–1206.
- **ALTEKRUSE, S.F.; STERN, N.J.; FIELDS, P.I.; SWERDLOW, D.L.** 1999. *Campylobacter jejuni*—An Emerging Foodborne Pathogen. *Emerging Infectious Diseases.* 5(1): 28-35.
- **AMERICAN MEAT INSTITUTE.** 1997. Guidelines for Development of Gool Manufacturing Practices (GMP's) 10 p.
- **APA. ASOCIACIÓN DE PRODUCTORES AVÍCOLAS DE CHILE A.G.** 2007. Informes estadísticos. [en línea]. <www.apa.cl> [consulta: 05-11-2008].
- **BERNDTSON, E.; DANIELSSON-THAM, M.L.; ENGVALL, A.** 1996. *Campylobacter* incidence on a chicken farm and the spread of *Campylobacter* during the slaughter process. *International Journal of Food Microbiology,* 32: 35–47.
- **BERRANG, M.E.; BUHR, R. J.; CASON, J. A.** 2000. *Campylobacter* Recovery from External and Internal Organs of Commercial Broiler Carcass Prior to Scalding. *Poultry Science.* 79:286-290.
- **BERRANG, M.E.; BUHR, R.J.; CASON, J.A.; DICKENS, J.A.** 2001. Broiler carcass contamination with *Campylobacter* from feces during defeathering. *Journal of Food Protection,* 64(12): 2063–2066.
- **BERRANG, M.E.; BAILEY, J.S.; ALTEKRUSE, S.F.; PATEL, B.; SHAW, W.K.; MEINERSMANN, R.J.; FEDORKA-CRAY, P.J.** 2007. Prevalence and numbers of *Campylobacter* on broiler carcasses collected at rehang and postchill in 20 U.S. processing plants. *J. Food Prot.* 70(7): 1556-60.
- **BERRANG, M. E.; MEINERSMANN, R. J.; SMITH, D.P.; ZHUANG, H.** 2008. The Effect of Chilling in Cold Air or Ice Water on the Microbiological Quality of Broiler Carcasses and the Population of *Campylobacter*. *Poultry Science* 87:992–998.
- **BJERKLIE, S.** 1999. Control del *Campylobacter*, *Industria Avícola,* 43(3): 12-14.

- **BREMNER, A.S.** 1981. Higiene e Inspección de Carne de Ave. Zaragoza (España), Acribia. 210 p.
- **BULL, S.A; ALLEN, V.M.; DOMINGUE, G.; JORGENSEN F.; FROST J.A.; URE, R.; WHYTE R.; TINKER, D.; CORRY, J.E.L.; GUILLARD-KING, J.; HUMPHREY T.J.** 2005. Source of *Campylobacter* spp. Colonizing Housed Broiler Flocks during Rearing. *Applied and Environmental Microbiol.* p. 645-652.
- **CARVALHO, A.C.F.B.; LIMA V.H.C.; PEREIRA, G.T.** 2002. Determinasao dos principais pontos de risco de contaminacao de frangos por *Campylobacter*, durante o abate industrial. *Hig Aliment.*, 16:89-94.
- **CDC. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION .** 1999. Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illnesses –selected sites United State. *MMWR Weekly* 49(10):201-5.
- **CDC. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION .** 2000. Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illnesses –selected sites United State. *MMWR Weekly* 49(10):201-5.
- **CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.** 2003. FoodNet Annual report. [en línea]. <www.cdc.gov/foodnet/annual/2003/2003_report.pdf> [consulta: 18-05-2007]
- **CDC. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.** 2006. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food-10 states, United States 2005. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 55:392-395.
- **CDC. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.** 2008. PulseNet. [en línea]. < <http://www.cdc.gov/pulsenet/>> [consulta: 3-11-2008]
- **CHANG, N.; TAYLOR, D. E.** 1990. Use of pulsed-field agarose gel electrophoresis to size genomes of *Campylobacter* species and to construct a *SalI* map of *Campylobacter jejuni* UA580. *J. Bacteriol.* 172:5211–5217.
- **CHILE. MINISTERIO DE SALUD.** 2006. Decreto supremo N° 977/96 Reglamento sanitario de los alimentos. 12 de julio 2006.
- **COKER, A.; ISOKPEHI, O. R. D.; THOMAS B. N.** 2002. Human *Campylobacteriosis* in Developing Countries. *J. Emerg. Infect. Dis.* 8: 237-243.
- **CORTEZ, A.L.; CARVALHO,A.; SCARCELLI, A.E.; MIYASHIRO,S.; VIDAL-MARTINS, A.M.; BÜRGER, K.P.** 2006. Survey of Chicken

Abattoir For The Presence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Rev. Inst. Med. 48(6):307-310.

- **COSTERTONE, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDEWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M.** 1995. Microbial biofilms. Annu Rev Microbiol 49, 711-745.
- **DTU. TECHNICAL UNIVERSITY OF DENMARK.** 2006. Anual Report on Zoonoses in Denmark 2006. Birgitte Helwigh and Tine Hald. The Danish Zoonosis Centre. National food institute. Denmark.
- **ELEY, R.** 1996. Infective Bacterial Food Poising. In Microbial Food Poising. 2 ed. Chapman&Hall. Pág. 15-25.
- **EPI INFO.** 1990. Epidemiology Program Office. *version 6*. Atlanta: Centers for Disease Control.
- **EVANS, S.A.; SAYERS, A.R.** 1997. A longitudinal study of campylobacter infection of broiler flocks in Great Britain. Prev. Vet. Mead. 46:209-223.
- **FAO. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN.** 1996. Declaración de Roma sobre la Seguridad Alimentaria Mundial. **In:** Cumbre Mundial sobre la Alimentación. Roma, Italia. 13-17 mayo 1996. Depósito de Documentos de la FAO.
- **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 julio 2001. Oficina Central de la OMS.
- **FAO. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN.** 2002. Conferencia Paneuropea Sobre Calidad e Inocuidad de alimentos. Cooperación Institucional y Científica, Establecimiento de Redes y Creación de Capacidad en la Esfera de la Calidad e Inocuidad de Alimentos [en línea] Budapest, Hungría <<http://www.fao.org/DOCREP/MEETING/004/Y3088S.HTM>> [consulta: 12 mayo 2007]
- **FDA. U.S.A. FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION.** 1992. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook [en línea]. <<http://www.foodsafety.gov/~mow/chap4.html>> [consulta: 20-04- 2007].
- **FERNÁNDEZ, H.; KAHLER, K.; SALAZAR, R.; RIOS, MA.** 1994. Prevalence of thermotolerant species of *Campylobacter* and their biotypes in

children and domestic birds and dogs in southern Chile. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 36(5):433-6

- **FERNANDEZ, H.; PISÓN, V.** 1996. Isolation of thermotolerant species of *Campylobacter* from commercial chicken livers. *Int. J. Food Microbiol.* 29:75-80.
- **FIGUEROA, A.** 2006. Presencia de *Campylobacter jejuni* en carne de ave congelada en una planta procesadora de la región metropolitana. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria.
- **FIGUEROA, G.; ARAYA, M.; ESPINOZA, J.** 1982. Agentes bacterianos asociados a diarrea aguda en niños de nivel socio-económico bajo. Estudio comparativo en terreno. In: XX Reunión anual de la Sociedad Latinoamericana de Investigación Pediátrica, Lima, Perú.
- **FIGUEROA, G.** 2006. Principios del Sistema HACCP (principios 1 al 3). Santiago, Chile. U. Chile, Instituto de Nutrición y Tecnología de los alimentos, Diploma “Aplicación del Sistema HACCP para la Producción de Alimentos Sanos y Seguros”
- **FRIEDMAN, C. R.; NEIMANN, J.; WEGENER, H. C.; TAUXE, R. V.** 2000. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. 121– 138. In: *Campylobacter*. 2nd ed. I. Nachamking and M. J. Blaser, ed. American Society for Microbiology Press, Washington, DC.
- **FROST, J.A.; OZA, A.N.; THWAITES, R.T.; ROWE, B.** 1998. Serotyping schema for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on direct agglutination of heat-stable antigens. *J. Clin. Microbiol.* 36, 335–339.
- **FSA. FOOD STANDARDS AGENCY.** 2004. Advisory Committee in the microbiological Safety of Food. ACMSF report on campylobacter [on line.] <<http://food.gob.uk>> [consulta: 16-12-2007].
- **FUNDACIÓN DEL INSTITUTO CÁRNICO AMERICANO.** 1994. HACCP: El sistema de Analisis de Riesgo y Puntos Criticos Controlables en la Industria Carnica. Santiago de Chile, GL Seviches 167 p.
- **GONZÁLEZ, V.; RUIZ, O.; GÁRCIA, E.; VEGA, M.** 2005. Aplicación de Biotecnología en Seguridad Alimentaria. Silvia Enríquez Encinas (Genoma España). Agencia Española de Seguridad Alimentaria/Fundación Española para el Desarrollo de la Investigación en Genómica y Proteómica. Madrid, España. 7-8.
- **GRIFFITHS, P. L.; PARK R. W. A.** 1990. *Campylobacter* associated with human diarrhoeal disease. *J. Appl. Bacteriol.* 69:281–301.

- **HAGMAR, L.; SCHUTZ, A.; HALLBERG, T.; SJOHOLM, A.** 1990. Health effects of exposure to endotoxins and organic dust in poultry slaughterhouse workers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 62: 159–164.
- **HPA. HEALTH PROTECTION AGENCY.** 2006. *Campylobacter spp.* Laboratory reports of faecal isolates reported to the Health Protection Agency Centre for Infections England and Wales, 1986-2006. [en línea]. <www.hpa.org.uk/infections> [consulta: 16-03-2008].
- **HWANG, M. N.; EDERER, G. M.** 1975. Rapid hippurate hydrolysis method for presumptive identification of group B streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 1:114-115.
- **INEI. INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS.** 2001. Manual de aislamiento *Campylobacter*. Ministerio de Salud Subsecretaría de Investigación y Tecnología ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” Departamento Bacteriología, Servicio Bacteriología Sanitaria. Buenos Aires, Argentina.
- **INFOSTAT.** 2004. *InfoStat version 2004*. Grupo Infostat. FCA. Universidad Nacional de Cordova. Argentina.
- **INTERNATIONAL MEAT AND POULTRY HACCP ALLIANCE.** 1996. Generic HACCP model for Poultry slaughter. Kansas City, Missouri 54 p.
- **JACKSON, W. C.; CURTIS, P. A.; CARAWAN, R. E.; KEENER, K. M.; TAYLOR, M. C.** 1999. Survey shows that poultry processors can save money by conserving water. No. CD-23. North Carolina Cooperative Extension Service, NC State University, Raleigh, NC.
- **JACOB-REITSMA, W. F.; BOLDER, N. M.; MULDER, R.W.A.W.** 1994. Cecal carriage of *Campylobacter* and *Salmonella* in Dutch broiler flocks at slaughter: a one-year study. *Poult. Sci.* 73:1260–1266.
- **JACOB-REITSMA, W.F.** 2000. *Campylobacter* in the food supply. **In:** Nachamkin, I.; Blaser, M.J. ed. *Campylobacter*, Society for Microbiology, Washington DC. Pp.467-481.
- **KIST, M.** 1985. The historical background to campylobacter infection: new aspects. **In:** Pearson A.D.; Skirrow M.B.; Lior H.; Rowe B. ed. *Campylobacter III*. London: Public Health Laboratory Service, 23–27.
- **LINDBLAD, M.; LINDMARK, H.; LAMBERTZ, S.T.; LINDQVIST, R.** 2006. Microbiological baseline study of broiler chickens at Swedish slaughterhouses. *J. Food Prot.* 69(12): 2875-82.
- **LINDSAY, J.A.** 1997. Chronic Sequelae of Foodborne Disease. *Emerging Infectious Disease*, 3 (4): 443-452.

- **LIOR, H.** 1984. New, extended biotyping Scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y “*Campylobacter laridis*”. Journal of Clinical Microbiology. 20(4): 636-640.
- **MANFREDA, G.; DE CESARE, A.; BONDIOLI, V.; STERN, N. J.; FRANCHINI, A.** 2006. Enumeration and Identity of *Campylobacter* spp. in Italian Broilers. Poultry Science 85:556–562.
- **MEAD, P. M.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V.** 1999. Food-related illness and death in the United States. Emerg. Infect. Dis. 5:607–625.
- **MICHAUD, S.; MENARD, S.; ARBEIT, R.D.** 2005. Role of Real-Time Molecular Typing in the Surveillance of *Campylobacter* Enteritis and Comparison of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Profiles from Chicken and Human Isolates. J. Clin. Microbiol. 43 (3): 1105–1111.
- **MINSAL. MINISTERIO DE SALUD.** 2007. Situación Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos en Chile. Departamento de epidemiología. División de planificación sanitaria. Gobierno de Chile. [en línea]. <<http://epi.minsal.cl/epi/html/presenta/VETA2007.pdf>> [consulta 10-11-2007].
- **MMWR. MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT PRELIMINARY.** 2007. FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — 10 States, 2006
- **MOSSEL, D.A.A. Y MORENO B.G.** 1993. Microbiología de los alimentos: Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos. Zaragoza (España), Acribia. 375 p.
- **MOORE, J.E., WILSON, T.S., WAREING, D.R.A., HUMPHREY, T.J. and MURPHY P.G.** 2002. Prevalence of thermophilic *Campylobacter* spp. in ready-to-eat foods and raw poultry in Northern Ireland. J. Food Prot. 65, 1326–1328.
- **NACHAMKIN, I.; BLASER, M.J.** 2000. *Campylobacter* infection association with Guillian-Barré syndrome. In: *Campylobacter* 2^a ed. Nachamkin and Blaser, M. eds. ASM press, washington DC. Pag: 155-169.
- **NEPSS. National Enteric Pathogens Surveillance Scheme.** 2005. Human Annual Reports. Microbiological Diagnostic Unit, Department of Microbiology and Immunology, University of Melbourne, Australia.
- **NEWELL, D.G.; SHREEVE J.E.; TOSZEGHY M.; DOMINGUE G.; BULL S.; HUMPHREY T.; MEAD, G.** 2001. Changes in the carriage of *Campylobacter* strains by poultry carcasses during processing in abattoirs Appl. Environ. Microbiol, 67:2636-2640.

- **NIELSEN, E.M.; ENBERG, J.; MOGENS, M.** 1997. Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from Danish patients, poultry, cattle and swine. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 19:47–56.
- **ON, S.L.; NIELSEN, E.M.; ENGBERG, J.; MADSEN, M.** 1998. Validity of *Sma*I-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *Sal*I, *Kpn*I, and *Bam*HI polymorphisms: evidence of identical clones infecting humans, poultry, and cattle. *Epidemiol. Infect.* 120:231–237.
- **ONO, K.; YAMAMOTO, K.** 1999. Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama, Japan. *International Journal of Food Microbiology*, 47: 211–219.
- **OOSTEROM, J.; DE WILDE, G.J.A.; DE BOER, E.; DE BLAAUW; KARMAN, H.** 1983. Survival of *Campylobacter jejuni* during poultry processing and pig slaughtering. *Journal of Food Protection* 46, 702±706.
- **OVAL, A.; FERNÁNDEZ, H.** 1999. Prevalencia de *Campylobacter* sp. en perros de la ciudad de Valdivia. Estudio de susceptibilidad a 6 drogas antimicrobianas mediante el método de E-test. **In:** XXI congreso Chileno De Microbiología “Dr. Manis Grinbergs M.” Valdivia, Chile. 9-12 octubre 1999. Asociación Chilena de Microbiología. Pp. 74.
- **PADUNGTON, P.; KANEENE, J.B.** 2003. *Campylobacter* spp. In *Human, Chickens, Pigs and Their Antimicrobial Resistance.* *J. Vet. Med. Sci.* 65(2): 161-170
- **PARK, S.** 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 74, 177–188.
- **PARRILLA, M.C.; VAZQUES, J.L.; SALDATE, E.O.; NAVA, L.M.** 1993. Brotes de Toxiinfecciones Alimentarias de Origen Microbiano y Parasitario. *Salud Pública de México*, 35 (5): 456-463.
- **PEZZOTI, G.;; SERAFIN,A.; LUZZI, I.; MIONI, R. MILAN, M.;PERIN, R.** 2003. Occurrence and resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 82:271–287.
- **RANSOM, G. M.; ROSE, B. E.** 1998. Isolation, identification, and enumeration of *Campylobacter jejuni/coli* from meat and poultry products. **In:** *Microbiology laboratory guidebook*, 3rd ed. USDA Food Safety and Inspection Service, Washington, D.C. [En línea.]< <http://www.fsis.usda.gov/Ophs/Microlab/Mlghcp6.pdf>>. [Consulta: 15-12-2007].
- **RASSCHAERT, G.; HOUF, K.; VAN HENDE, J.; DE ZUTTER, L.** 2006. *Campylobacter* contamination during poultry slaughter in Belgium. *J. Food Prot.* 69, 27–33.

- **RESOLVE.** 2006. Risk-Based Inspection of Meat and Poultry Products. Final Report On The RBI Stakeholder Input Process. Washington, DC. Estados Unidos. [en línea] <http://www.fsis.usda.gov/PDF/RBI_Stakeholder_Input_Process.pdf>. [Consulta: 17-04-2008].
- **RIBOT, E.F.; FITZGERALD, C.; KUBOTA,K.; SWAMINATHAN, B; BARRET, T.J.** 2000. Rapid Pulse-Field Gel Electrophoresis Protocol for Subtyping of *Campylobacter jejuni*. J. Clinical Microbiol. 39: 1889-1894.
- **ROSENQUIST, H.; SOMMER, H.M.; NIELSEN, N.L.; CHRISTENSEN, B.B.** 2006. The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with *thermotolerant Campylobacter*. Int. J. Food Microbiol 108
- **SANCHEZ, M. X.; FLUCKEY, W. M.; BRASHEARS,M. M.; McKEE,S.R.** 2002. Microbial profile and antibiotic susceptibility of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. in broilers processed in air-chilled and immersion-chilled environments. J. Food Prot. 65:948–956.
- **SCVPH. SCIENTIFIC COMMITTEE ON VETERINARY MEASURES RELATING TO PUBLIC HEALTH.** 1998. Benefits and Limitations of Antimicrobial Treatments for Poultry Carcasses. [en línea]. <http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out14_en.html> [consulta: 08-04-2008]
- **SELLERS, J.; KIEPPER, B.** 2001. A survey of wastewater treatment practices and experiences in the poultry processing industry. Completed Research project 562. US Egg and Poultry Association, Athens, GA.
- **SILVERSIDE, D.; JONES M.** 1992. Small-scale poultry processing. Roma, FAO 117p.
- **SKIRROW, M.B.; BENJAMIN, J.** 1980. Differentiation of enteropathogenic campylobacter. J. Clin. Pathol. 33:1122.
- **SOCKETT, P.N.; PEARSON, A.D.** 1987. Cost implications of human *Campylobacter* infections. **In:** *Campylobacter* IV. Proceedings of the Fourth International Workshop on *Campylobacter* Infection (edited by B. Kaijser & E. Falsen). Pp. 261±264. Kungälv, Sweden: Groterna Printers, University of Goteborg.
- **SOTO, A.; FIGUEROA, G.; URCELAY. S.** 1986. Tasas de infección IgG, IgM y anticuerpos fijadores de complemento para *Campylobacter jejuni/coli* en trabajadores de plantas faenadoras de aves en Santiago, Chile. J Vet Med. 33: 676-684.
- **STERN, N.J.; JONES, D.M.; WESLEY, I.V.; ROLLINS, D.M.** 1994. Colonisation of chicks by non-culturable *Campylobacter* spp. Lett Appl Microbiol 18, 333–336.

- **STERN, N. J.; ROBACH, M. C.** 2003. Enumeration of *Campylobacter* spp. in broiler feces and in corresponding processed carcasses. *J. Food Prot.* 66:1557–1563.
- **STERN, N.J.; PRETANIK, S.** 2005. Counts of *Campylobacter* spp. On U.S. Broiler Carcasses. *J. Food Prot.* 69: 1034-1039.
- **TAUXE, R.V.** 1992. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* in the United State and other industrialized nations. **In:** Nachamkin, I.; Blasser, M.J.; Tompkins, L.S. ed. *Campylobacter jejuni: curret status and future trends.* American Society for Microbiology, Washington, DC. Pp.9-19.
- **TAUXE, R.V.** 1997. Emerging Fooborne Diseases: AnEvolvingo Public Health Challenge. *Emerging Infectious Diseases*, 3(4): 425-434.
- **TODD, E.C.D.** 1989. Preliminary estimates of costs of foodborne disease in the United States. *Journal of Food Protection*, 52, 595±601.
- **TRONCOSO, M.; RIVAS, P.; FIGUEROA, G.** 2004. Contaminacion con *C. jejuni* y *Salmonella enterica* en carne de ave expendida en supermercados chilenos. **In:** XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología y X Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires, Argentina. 18-21 de Octubre 2004. UBA, Facultad de Farmacia y Bioquímica.
- **USDA. UNITED STATE DEPARTAMENT OF AGRICULTURE. FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE.** 2008. About FSIS. [en línea]. < http://www.fsis.usda.gov/About_FSIS/index.asp> [consulta: 3-11-2008]
- **VERGARA, A.** 2000. Evaluación de pre-requisitos para la implementación de HACCP en una planta faenadora de aves. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac Medicina Veterinaria 73 p.
- **VISCAYA, L.E.; A. CARRERO, A; HERNANDEZ, J. G.** 1999. Origen bacteriano de la enfermedad diarreica aguda en Mérida, Venezuela. *Rev. Cubana Med. Trop.* 51: 14-19.
- **WAGENAAR, J.A.; MEVIUS D.C.; HAVELAAR, H.A.** 2006. El agente *Campylobacter* en la producción animal y las estrategias de control para disminuir la incidencia de la campylobacteriosis humana. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 25(2): 581-594.
- **WALDROUP, A. L.; RATHGEBER, B. M.; FORSYTHE R. H.** 1992. Effects of six modifications on the incidence and levels of spoilage and pathogenic organisms on commercially processed postchill broilers. *J. Appl. Poult. Res.* 1:226–234.
- **WASSENAAR, T.; NEWELL, D.G.** 2000. Minireview. Genotyping of *Campylobacter* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1–9

- **WHITE, P.; COLLINS, J.D.; MCGILL, K.; MONAHAN, C.; O'MAHONY, H.** 2001. Distribution and prevalence of airborne microorganisms in three commercial poultry processing plants. *Journal of Food Protection*, 64(3): 388–391.
- **WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2000. The Increasing Incidence of Human Campylobacteriosis. In: Report and Proceeding of a WHO Consultation of expert. Copenhagen, Denmark. 21-25 Noviembre 2000.
- **WILSON, I.G.** 2004. Airborne Campylobacter infection in a poultry worker: case report and review of the literature. *Communicable Disease and Public Health*, 7(4): 349–353

10. ANEXOS

Medios de Cultivos Selectivos y Caldos de enriquecimiento para el aislamiento de *Campylobacter* termotolerantes

1. mCCDA (solución para 500 ml)

Medio de cultivo selectivo para el aislamiento de *Campylobacter*

Caldo nutritivo n°2 (OXOID) 6,5gr; Peptona 2,5gr; Extracto de carne 4,5gr; Carbón activad 2gr; Lasaaminoácido; Desoxycolato de Sodio 0,5gr; Sulfato ferroso 0,125gr; Piruvato de Sodio 0,125gr; Agar 6gr; Agua destilada500ml
pH 7,4

Pool mCCDA

- | | |
|-------------------|----------|
| 1. Cefoperazona | 48mg/3ml |
| 2. Anfotericina B | 15mg/3ml |

2. Caldo Hunt (solución para 1 litro)

Caldo de Enriquecimiento

Caldo nutritivo n°2 (OXOID) 13gr; Extracto de carne 10gr; Peptona 10gr; NaCl 5gr; Extracto de levadura 6gr; Agua 950ml

Antibióticos

- | | |
|----------------|--------|
| • Cefoperazona | 32mg/L |
| • Trimetoprim | 15mg/L |
| • Vancomicina | 10mg/L |

Agar FBR

Sangre	5%
pH	7,5±0,2

FBP (suplemento para crecimiento de *Campylobacter*)

Piruvato de Sodio	0,625gr/10ml
Sulfato Ferroso	0,625gr/10ml
Bisulfato de Sodio	0,625gr/10ml
Agua	10ml

3. Skirrow

Medio selectivo para el aislamiento de *Campylobacter*

Agar columbia OXOID; Sangre de caballo desfibrinada 7%

Pool Skirrow

2. Vancomicina	0,3ml/L
3. Trimetoprim	0,3ml/L
4. Polimixina B	0,4ml/L

4. Pruebas Bioquímicas Para la Identificación de *Campylobacter sp.*

Hidrólisis del Hipurato

-Solución hipurato de sodio 1%

-solución de ninhidrina 3%

Producción de H₂S en medio FBP

Caldo nutritivo	37gr
-----------------	------

Bacto agar 1,2gr
 Agua destilada 992ml
 Suplemento de crecimiento FBP 8ml

Hidrólisis del DNA

Dna 0,3gr/L
 Cloruro de Calcio 0,01M 1ml/L
 NaCl 10gr/L
 Bacto agar 1gr
 Buffer Tris 0,05M 1000ml
 Azul de toluidina "O" al 3% 2,5ml

Biotipificación según Lior

Tabla 6. Esquema de Biotipificación según Lior (Nachamkin y Blasser, 2000)

Biotipo	<i>C. jejuni</i>				<i>C. coli</i>		<i>C. lari</i>
	I	II	III	IV	I	II	I
Hipurato	+	+	+	+	-	-	-
Test H ₂ S	-	-	+	+	-	-	+
Hidrólisis DNA	-	+	-	+	+	+	-

PFGE

5. Nefelómetro de Mc Farland

Tabla 7. Conversión de tubos para densidad bacteriana usada para determinar solución bacteriana en el "plug"

Tubo	H₂SO₄ 1% (ml)	BaCl₂ 1% (ml)	Densidad de la bacteria corresponde en suspensión a cerca de:
5	9,5	0,5	1,5x10 ⁹ células / ml
6	9,4	0,6	1,8x10 ⁹ células / ml

Reactivos PFGE

6. Solución stock Proteinasa K 20mg/ml

Proteinasa K	20mg
Tris	50µl (1M)
CaCl ₂	10µl
Agua destilada	940µl

7. Buffer TE

Tris	10 ml (1M)/L
EDTA	2ml (0,5M)/L
pH	8

Buffer de lisis celular

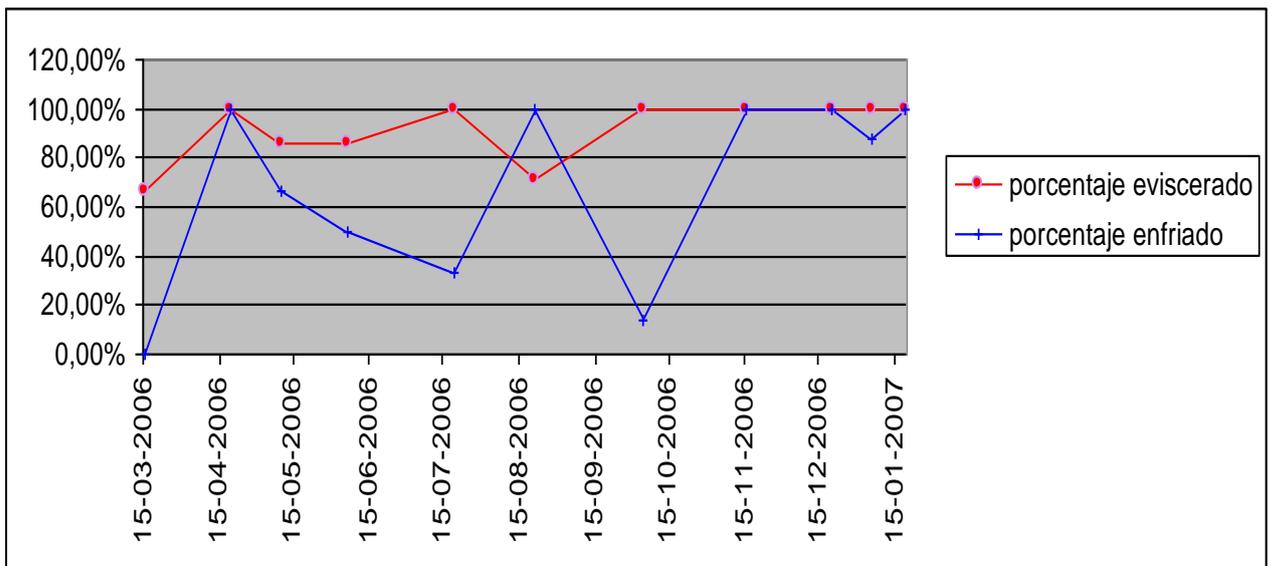
Tris	5ml (1M) /100ml
EDTA	10ml (0,5M) /100ml
Sarkosyl 1%	1 gr
Agua destilada	100ml

8. Agarosa Mega Base (Biorad)

Agarosa 0,5gr
Buffer TE 49,5ml

9. Distribución de Ocurrencias según lotes y fechas de muestreos

Figura N°6. Porcentajes de Ocurrencia de *Campylobacter* termotolerantes en la Planta A según Fechas de Muestras



**Figura N°7. Porcentajes de Ocurrencia de Campylobacter termotolerantes en la Planta
B según Fechas de Muestras**

