Determinación de la presencia de *Campylobacter jejuni* por PCR en pollos parrilleros en granjas avícolas de Puerto Rico

Por

Fernando R. Rebollo Carratto

Tesis sometida en cumplimiento parcial
de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

Ciencia y Tecnología de los Alimentos

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2007

Aprobado por:

_____	_____
José R. Latorre, PhD Presidente del Comité Graduado	Fecha
_____	_____
Edna T. Negrón, PhD Miembro de Comité Graduado y	Fecha
_____	_____
Lynette E. Orellana, PhD Miembro de Comité Graduado	Fecha
_____	_____
Edna T. Negrón PhD Coordinadora del Programa Ciencia y Tecnología de los Alimentos.	Fecha
_____	_____
Teodoro Ruiz, PhD. Representante de Escuela Graduada.	Fecha

Abstract

The presence of *Campylobacter jejuni* was studied in broiler chickens in poultry houses in south central Puerto Rico, during April and May of 2005. The sample was fresh feces collected from the chicken bed in different points of the poultry house. Part of the samples were transported to the Laboratory of Microbiology in the Department of Biology at the University of Puerto Rico, Mayaguez Campus (UPRM) and the other part was sent to Laboratory of Poultry Science at Auburn University for genetic studies. The samples isolated at UPRM in mCCDA (modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar) and CCA (Campy cemex Agar) plates showed the presence of *Campylobacter* confirmed by phase microscopy observation. The samples sent to Auburn University after recuperation were tested with PCR and antibiotic resistance. The PCR result confirmed every sample tested was *Campylobacter jejuni*.

Resumen

Se estudio la presencia de *Campylobacter jejuni* en pollos parrilleros en granjas avícolas en la zona centro sur de Puerto Rico durante los meses de abril y mayo del 2005. La muestra fue materia fecal fresca recolectada desde la camada en diferentes puntos del ranchón. Parte de la muestra se transportó al laboratorio de microbiología del Departamento de Biología de Universidad de Puerto Rico en Mayagüez (UPRM) y otra parte fue enviada al Laboratorio de Ciencias Avícolas de la Universidad de Auburn para estudios genéticos. Las muestras se cultivaron en UPRM en platos de mCCDA (modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar) y CCA (campy cefex agar), demostraron la presencia de *Campylobacter* confirmado por su observación en microscopio de fase. Las muestras enviadas a Auburn tras ser recuperadas se sometieron a pruebas de PCR y resistencia antibiótica. Las pruebas de PCR confirmaron que todas las muestras analizadas eran *Campylobacter jejuni*.

Dedicatoria

A todos los que buscan la verdad y la justicia.

Agradecimientos

Hay a mucha gente que me gustaría verle a los ojos y con un fuerte apretón de mano decirles “muchas gracias”.

Gracias a Omar Oyarzabal, José Latorre, Edna Negron, Scott Miller, Mildred Chaparro, Lynette Orellana, David Figueroa, Héctor Sayas, Héctor Núñez, Manuel Ramírez, Magali Zapata, Ivette Vissepó, Raúl Macchiavelli, Yadira Malave, Nelson Alicea y en especial al “jíbaro” puertorriqueño.

A mi familia: Jeanmarie, Vanina, Freddy, Mateo, Gonzalo, Serrana, Mariano, Lele, Estela, “La China”, Roberto, Haydee, Héctor, Marta, Fela, Jesús, Marta, Héctor Javier,

Tabla de Contenido

Introducción…….…….1

Objetivo……..…2

Revisión de Literatura……..…….…..3

A.- Antecedentes……..…..3

B.- Etiología……..…….5

B.1.- Morfología de la colonia…….…….6

B.2- Propiedades Bioquímicas…….….6

B. 3- Resistencia…….. 7

B. 3.1- Agentes Físicos……...….7

B. 3.2- Agentes Químicos…….…... 8

B. 3.3- Sensibilidad Antibiótica……8

C.- Epidemiología…….9

D.- Transmisión…… 10

E.- Fisiopatogénia……. 11

F.- Incidencia en Aves…….. 12

G.- Incidencia en el Hombre……. 13

H.- Síndrome de Guillan – Barre…….. 13

Materiales y Metodología…….……. 15

Elección de muestreo…… 15

Recolección de muestras……16

Transporte……. 17

Laboratorio…… 17

Aislamiento y almacenamiento en Universidad de Auburn…….……..….. 18

PCR…….…….…. 19

E-test……..……... 21

Resultados y Discusión……..……..……... 22

Resultados de Laboratorio……..…….. 22

PCR…….…….....24

E-test…….…….……...27

Recomendaciones…….……28

Conclusión……..……...……. 29

Bibliografía…….…..…… 30

Anexo 1…….....36

Lista de Tablas

Tabla 1. Información de cada muestra…… 16

Tabla 2. Relación de muestra y aislamiento a mas baja concentración…….…….. 22

Tabla 3. Sondas usadas para el análisis de las cepas……... 24

Tabla 4. Resultados de PCR y E-test……...……..... 27

Tabla 5. Respuestas del cuestionario de bioseguridad……..38

Lista de Figuras.

Figura 1. Mapa de pueblos donde se tomaron muestras…… 15

Figura 2. PCR comparativo entre *C. jejuni y C. coli*……. 25

Figura 3. Resultados de PCR para muestras 1, 2, 3 y 4……..... 26

Introducción

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (E.T.As), y zoonosis por extensión, tienen potencialmente un gran impacto en la economía de una nación cuyo comercio con el exterior y estabilidad dependen directamente de la confiabilidad de los alimentos exentos de enfermedades para la exportación e importación. Las ETAs ilustran la estrecha relación que existe entre la salud pública, el ambiente y el bienestar socioeconómico.

Es de gran importancia estar en control y vigilancia total (desde el punto de vista higiénico – sanitario) de la cadena de producción agrícola desde la granja a la mesa. El estado higiénico de los alimentos está sometido a múltiples influencias en todas las fases de esta cadena de producción, siendo necesario detectar y eliminar posibles deficiencias no sólo mediante el control del producto terminado sino de todo el proceso industrial.

La población en los últimos años ha aumentado las exigencias en cuanto al consumo de alimentos inocuos. Desde hace unos años, la campylobacteriosis causada por el *Campylobacter jejuni* ha sido la más importante de las enfermedades transmitidas por los alimentos asociados con pollos y carne de pollo, siendo esto de gran importancia para la salud pública, ya que según datos de la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades que se transmiten por los alimentos de origen microbiológico son de las afecciones más comunes del hombre en el mundo.

Campylobacter jejuni es considerado como la principal causa bacteriana de enteritis en Estados Unidos siendo característica la diarrea severa (acuosa o sanguinolenta) con picos de fiebre, vómitos, náuseas, aunque es muy raro que ocasione muerte. Esta

patología ocurre aislada, esporádicamente, y aunque no causa grandes epidemias en Estados Unidos (según el Centro de Control de Enfermedades - CDC) afecta a más de un millón de habitantes. *Campylobacter jejuni* afecta con mas frecuencia en los meses de verano que en las demás estaciones en países con climas diferenciados, no siendo el caso de Puerto Rico que presenta una variación aproximadamente de 10 a 20 ºF entre estaciones de verano e invierno, presentando así un clima ideal para que *C. jejuni* esté presente durante los 12 meses del año. Actualmente el Departamento de Salud de Puerto Rico no cuenta con datos precisos sobre la presencia de *Campylobacter* y brotes de campylobacteriosis. El único dato aproximado es un promedio de 30 a 35 casos por año aproximadamente en los últimos 5 anos (según el Departamento de Salud de Puerto Rico).

La avicultura en Puerto Rico es la segunda industria agropecuaria en términos económicos. Los pollos parrilleros producidos y faenados en la isla son sólo para consumo interno y esto significa más del 69 % del total de la carne de pollo consumida, haciendo un promedio de 80.8 libras de carne de pollo consumido per-cápita en el 2005. Sin embargo, del total de carne de pollos parrilleros consumidos, sólo el 34.4 % es producido localmente y el resto se importa como producto congelado (74 %) y productos frescos (26 %) (Departamento de Estadísticas Agrícolas de Puerto Rico).

Objetivos

Determinar la presencia de *Campylobacter jejuni* en pollos parrilleros en granjas avícolas de Puerto Rico e identificarlo a través de Reacción Cadena Polimeraza (PCR).

Revisión de Literatura

Las diarreas infecciosas continúan siendo un gran problema en países desarrollados, ocupando altas tasas de morbilidad (*29*). *Campylobacter jejuni* es la causa más común de enfermedades transmitidas por los alimentos de origen bacteriano, ocupando el primer lugar en la última década. Es la principal enfermedad gastrointestinal que hay en la actualidad en los Estados Unidos y se calcula que afecta sobre un millón de persona todos los años, o un 0.5% de la población general (*15*). Los alimentos asociados con las epidemias de *Campylobacteriosis* son la leche cruda (*2*), agua no potable o sin tratamiento de cloro (*18*), carnes, pollos, huevos (*59*), frutas, verduras y mariscos (*27*). En aguas no potables, el *C. jejuni* siempre se ha hallado en presencia de coliformes fecales (*1*). Los pollos parrilleros vienen de la granja al matadero con una alta colonización de *Campylobacter* y otras bacterias patógenas como *C. perfringens, S. aureus, L. monocitogenes y Salmonella* (*8*).

A.- Antecedentes.

Las primeras observaciones (*21*) de bacterias parecidas al *Campylobacter* fueron realizadas en 1886 por el microbiólogo Theodore Escherich a partir de materia fecal de niños y de gatos con diarrea. Aunque no pudo realizar los aislamientos las denominó *Vibrio felinus*. Entre 1909 y 1913 se realizaron los primeros aislamientos de las especies del género *Campylobacter* por microbiólogos veterinarios. En 1918, Mac Fadyean, Stockmann y Smith establecieron la participación de una bacteria microaerofílica en el aborto del ganado bovino y ovino, de morfología similar a las especies del género "Vibrio", por lo que se le denominó *Vibrio fetus*. En 1931, Jones y Little aislaron a partir

de bovinos con patologías intestinales un "vibrion" microaerófilo al que denominaron *Vibrio jejuni*. En 1940 fue confirmada la primera epidemia humana por el consumo de leche sin pasteurizar debido a esta bacteria (*11*). En 1944, Doyle descubrió un "vibrion" aislado de intestino de cerdo y lo denominó *Vibrio coli*. En 1946, Levi sugirió la primera asociación entre estas bacterias curvas y la diarrea en seres humanos, al realizar un estudio en un brote de gastroenteritis en 357 pacientes en Illinois. Por medio de exámenes directos, observó la presencia de formas bacterianas semejantes a "Vibrio" en el 20% de las muestras. En 1957, E. King estudiando las características de estos "Vibrios" aislados de diferentes fuentes, estableció que no todos correspondían a *Vibrio fetus*, determinando dos grupos con características serológicas y bioquímicas diferentes. Mientras algunos eran capaces de crecer a temperaturas de 25 y 37 ºC, otros los hacían a 42 ºC. A estos últimos, se les consideró como "Vibrios" relacionados, sugiriendo que eran agentes de diarrea aguda.

En 1963, Sébald y Veron proponen la creación del género *Campylobacter* para incluir estas bacterias, cuya denominación significa: "*Campylo*" = curvo y "*bacter*" = bacteria. En la década de 1970, *Campylobacter* fue confirmado primariamente por los microbiólogos veterinarios como un organismo que causaba aborto espontáneo en ganado bovino y ovino (*26*). En la década de 1970, Butzler y Skirrow, Bolton y Robertson, Blaser y colaboradores desarrollaron medios selectivos que permitieron aislar estos microorganismos con facilidad y establecer su participación en diferentes cuadros infecciosos en el hombre. En 1972, Dekeyser y Butzler aislaron los microorganismos de las heces de pacientes con enteritis usando una técnica de filtración que permitía el pasaje

de pequeños bastones curvos a través de una membrana pero retenía microorganismos fecales más grandes. Esta técnica se utiliza actualmente para el aislamiento de otras especies del género *Campylobacter*.

En Estados Unidos, desde 1983 a 1997 *C. jejuni* fue implicado en el 4.1 % de todas las enfermedades transmitidas por los alimentos. En contraste, *Salmonella* causaba el 64% de las epidemias. En 1996, *C. jejuni* fue aislado en un 45.6% de los casos de Enfermedades Transmitidas por los Alimentos y *Salmonella* fue aislada en un 29.2% de los casos. Para el 2000, *C. jejuni* fue el principal causante de diarreas en países como Australia, Canadá, Inglaterra, Finlandia, Holanda y Nueva Zelandia (*51, 60*). En el Reino Unido, se reportaron 58,000 casos de Campylobacteriosis humana en 1998 según datos del "Public Health Laboratory Service Communicable Disease Surveillance Center" habiendo un aumento del 16% según cifras del pasado año (*35*). En 1999, el Centro para el Control Enfermedades (*37*) indicó que la incidencia de Campylobacteriosis en humanos era de 17.5 casos por cada 100,000 personas.

B.- Etiología.

Consiste en una bacteria, donde se encuentran más de 14 especies diferentes (*30*), siendo de primer importancia para la salud pública *C. jejuni* (*14*). Existen tres especies de *Campylobacter (C. jejuni, C. laridis y C. coli)* que están asociadas con las epidemias humanas transmitidas por los alimentos, existiendo una relación de aislamiento entre estas especies, por ejemplo, 88.3% *C. jejuni*, 10.7% *C. coli* y 1% *C. laridis* (*35*).

B.1.- Morfología de la colonia:

Campylobacter jejuni es una bacteria Gram (-), curvado, microaerófilica (*23*), de morfología espiralada, tiene movilidad por medio de uniflagelo polar. La colonia puede ser detectada después de 24 horas de incubación en algunos casos, dependiendo de la concentración del organismo en el inóculo, o del efecto de la inhibición de los medios, aunque a veces se necesita incubación hasta de 72 horas. La colonia es plana, traslúcida, gris con tendencia a coalescente, o puede estar un poco levantada, opaca, con un gris amarronado y de bordes discretos. Es considerado un agente fastidioso debido a que no crece con facilidad, necesita enriquecimiento, y la temperatura óptima es de 42 ºC (*26*) y el aislamiento de muestras de alimentos es complicado (*37*). Cualitativamente, para el aislamiento se debe proceder con un medio de enriquecimiento selectivo para poder brindarle las condiciones favorables de crecimiento.

B.2.- Propiedades Bioquímicas: (*14*)

- No fermentan los carbohidratos
- La energía es derivada de la degradación de aminoácidos
- Reducen el selenite
- Oxidaza (+)
- Catalaza (+)
- Indol (–)
- H_2S y TSI (-)
- Crecimiento a 3.5% NaCl (-)
- Crecimiento 1% Glicina (+)

Para diferenciar las tres especies de mayor importancia se puede hacer una prueba bioquímica usando sensibilidad al acido nalidíxico y a la hidrólosis de hippurato.

Bacteria	Acido Nalidíxico	Hidrólisis Hippurato
Campylobacter jejuni	Sensible	Positivo
Campylobacter coli	Sensible	Negativo
Campylobacter laridis	Resistente	Negativo

B.3.- Resistencia

B.3.1.- *Agentes Físicos:*

Campylobacter es fácilmente estresable en condiciones de aerobiosis (*36*), desecación, bajo pH, y almacenamiento prolongado a bajas temperaturas (*49*).

Las condiciones óptimas de crecimiento del *C. jejuni* son por encima de 30 ºC y por debajo de 47 ºC (*34*). A temperaturas por debajo de los 30°C, la bacteria no puede desarrollarse como tal (*36*).

Es extremadamente sensible a la desecación. *C. jejuni* puede sobrevivir a bajas temperaturas por un tiempo determinado, por ejemplo, en agua a 4 ºC puede vivir 4 semanas. En leche puede vivir 3 semanas a 4 ºC y 24 horas a 25 ºC (*27*). A 4 ºC puede vivir hasta 3 semanas; en materia fecal y 5 semanas en orina. En canales de pollos almacenados, puede permanecer por 10 días a una temperatura de – 9 ó –12 ºC y hasta 180 días a – 20 ºC. En medios de almacenamiento con crioprotectores puede llegar a vivir 3 años a – 180 ºC.

En la metodología de irradiación pasteurizadora en alimentos, se necesita solo una dosis de 1.0 Kgy de Cobalto 60 para reducir el *Campylobacter* $1x10^3$ veces por cm^2 (*61*).

Se han hecho estudios en carcasas de pollos parrilleros (*7*) sobre la relación de tiempo y temperatura para reducción de la carga microbiana, a 60 ºC por 10 minutos y a 71 ºC por 1 minuto se minimiza considerablemente.

B.3.2.- ***Agentes Químicos:*** Los experimentos "in vitro" demostraron (*14*) sensibilidad a varios desinfectantes como por ejemplo: hipoclorito de sodio al 5%, formaldehido al 2.5%, fenol orgánico 0.15%, 1:50,000 de amonio cuaternarios y 1.125% glutaraldehido. Es resistente a 3 % de ácido succínico

En el agua de beber para aves adicionada con ácido láctico, acético o fórmico al 5% reduce considerablemente la carga microbiana general y en especial al *C. jejuni* en el tracto gastrointestinal (*13*).

Resiste a concentraciones de sal de 0 a 1.5 %. (*34*). El pH óptimo para el desarrollo de *C. jejuni* es de 6.5 a 7.5, aunque se ha podido ver a pH 4.8 y 8 (*11*).

B.3.3.- ***Sensibilidad Antibiótica:*** *C. jejuni* es sensible a los antibioticos Eritromicina, Doxyciclina, Gentamicina, Kanamycina, Cloranfenicol (*16*). La Furazolidona es la que más efectiva se ha visto hasta el momento. Es resistente a las Tetraciclinas, en ciertas circunstancias a la Penicilina G y actualmente se detectó que es resistente a las Fluorquinolonas (*55*).

C.- Epidemiología.

Campylobacter jejuni tiene distribución geográfica mundial *(9*). Son afectados todos los grupos étnicos, de ambos sexos, no encontrándose portadores habitualmente sanos. Las

especies diarreogénicas (causantes de diarrea) se encuentran habitualmente como comensales en el tracto gastrointestinal de una gran variedad de mamíferos, aves domésticas y salvajes (*21).* El ciego es el principal órgano de colonización.

En países industrializados, *Campylobacter* es el primer agente de diarrea, siendo más frecuente la enfermedad en los meses de verano. En países en vías de desarrollo, el *Campylobacter* es el segundo o tercer agente causador de diarreas, según sea el lugar geográfico, siendo más frecuente en niños de corta edad.

Campylobacter jejuni y *C. coli* son causantes importantes de diarreas agudas en viajeros que visitan países de tercer mundo.

En estudios realizados sobre la prevalencia del *C. jejuni* en diferentes especies, arrojó los siguientes resultados: materia fecal de cerdos, 66 a 87%, contenido intestinal de cerdo 61% (*31*), heces de oveja 74%, carcasas de ovejas 25%, pavo eviscerado 94%, pollo eviscerado 80%. Ha sido encontrada en el sistema digestivo de perros, gatos, ganado, cerdos y aves, teniendo gran incidencia en la producción de aborto en algunas especies (*11*). Sin embargo la mayoría son portadores asintomáticos de la bacteria siendo fuentes potenciales de eliminación (*27*). Los animales de producción son importantes en la transmisión horizontal, por ejemplo la incidencia en ganado es entre 2.5 a 100%, 20% en ovinos. Las mascotas domésticas como los perros y los gatos juegan un papel importante en lugares donde se han registrado relaciones entre los pacientes que han sufrido Campylobacteriosis y sus mascotas, donde se pudo aislar *C. jejuni*, siendo el hombre el transmisor al animal (*53)*.

Estudios anteriores han encontrado altos porcentajes de *C. jejuni* en heces de ganado de leche, por lo cual fueron encontradas en porcentaje de 4.5% en leche cruda. Aunque han ocurrido algunos brotes por esta bacteria en alimentos de carne.

El microorganismo puede ser encontrado rutinariamente en plantas de operaciones de matanza y también aislados frecuentemente de productos avícolas en supermercados (*33*). De acuerdo con un estudio hecho en Minnesota (*56*), el 88% de las muestras de pollos en un supermercado local fueron positivas.

Se calcula que sobre el 10% de las personas infectadas son hospitalizadas, aunque la mayoría de los pacientes afectados por Campylobacteriosis leve no visita a un médico (*20*), a diferencia de los que sufren diarreas por más de 5 días y con pérdidas sanguíneas en heces. La patología es de alta morbidez y muy baja mortalidad (estimada en un 0.001%). La bacteriemia es más riesgosa en personas mayores de 65 años (*51*).

D.- Transmisión.

El 90% de los casos de Campylobacteriosis son causados por alimentos (*21*) (carne de ave mal cocida, contaminación cruzada durante la preparación de alimentos, contacto con animales contaminados).

La principal vía de transmisión es feco-oral, siendo el alimento un vehículo y fuente de multiplicación bacteriana. Los insectos juegan un rol fundamental como vehículo de transmisión, siendo un claro ejemplo la mosca doméstica.

Existen dos vías de transmisión del *C. jejuni*: vertical (de madre a hijo) y horizontal (de un animal a otro) siendo esta última la más común.

Hasta el momento es inusual que ocurra contaminación de persona a persona. Hubo un reporte de una infección intrahospitalaria en un hospital pediátrico en Méjico (*1*).

E.- Fisiopatogenia.

Campylobacter es sensible al pH gástrico (*39*), por lo cual se debe ingerir un inóculo con una cantidad de por lo menos 1 x 10^6 por cm^2, para que se produzca una infección. Estas bacterias no poseen fimbrias pero se ha demostrado que el flagelo actúa como adhesinas que le permiten la adherencia a las células epiteliales y a la mucosa intestinal, siendo el paso inicial para la instalación de la enfermedad. Muchas cepas pueden invadir las células epiteliales provocando infiltrados inflamatorios de la lámina propia y abscesos en las criptas, similares a los que producidas por *Shigella*, apareciendo hematíes y leucocitos en las heces dando el nombre de diarreas inflamatorias o exudativas. También pueden atravesar la mucosa intestinal y proliferar en la lámina propia y ganglios, semejante a la infección causada por *Salmonella*.

Síntomas: la enteritis es causada por la invasión de *C. jejuni* dependiendo de la cantidad de *Campylobacter,* de la cepa, stress ambiental, susceptibilidad y estado inmunológico del huésped (*25, 30, 59).* El período de incubación es de 24 a 48 horas, y presenta síntomas como dolor abdominal, dolor de cabeza, diarrea (heces líquidas tipo agua de arroz o con presencia de sangre y moco como una disentería), náuseas, calambres, vómitos, fiebre por 2 a 5 días después de la exposición a la infección. Los síntomas duran entre 1 a 7 días. En casos severos, puede haber sangre en heces parecida a las producidas por colitis ulcerativa, con dolor característico del síndrome de abdomen agudo causado por la apendicitis.

F.- Incidencia en aves.

La incidencia de *Campylobacter jejuni* es mayor en aves criadas en camada en piso que las criadas en jaulas (*57*), ya que las aves criadas en camadas tienen mas contacto con la materia fecal de otras aves y hay mas posibilidades de trasmisión horizontal. En cambio las aves criadas en jaula tiene menos contacto con la heces de otras aves. *Campylobacter jejuni* puede ser hallado en la cavidad toráxico-abdominal, tracto respiratorio, sacos aéreos, y vísceras digestivas, por lo cual es muy importante las excelentes medidas higiénicas durante y después de la matanza (*8*). Generalmente la bacteria se encuentra en gran número en las bolsas cecales entre el illio y el colon del tracto gastrointestinal de los pollos (*43*.).

Signos Clínicos en Aves. Las aves son el mayor reservorio de *C. jejuni* por la temperatura corporal del ave (42 a 44 ºC), siendo portadoras asintomáticas y rara vez se presentan los típicos cuadros clínicos gastroentéricos. Una parvada positiva es cuando se encuentra $1x10^7$ de *Campylobacter* por gramos de materia fecal. Los factores de manejo y ambientales que produzcan estrés o patologías que lleven a inmunodepresión predisponen a las exacerbación de la patogenicidad de *Campylobacter*. Hay un periodo de incubación de 24 horas. Entre 24 a 72 horas posteriores hay disminución en la producción, depresión, diarrea mucosa y sanguinolenta que puede persistir hasta 8 días, pudiendo haber una mortalidad del 32%, dependiendo de la dosis infectiva y del tipo de cepa actuante de *Campylobacter* (*14*).

G.- Incidencia en el hombre.

En personas con su sistema inmunológico comprometido, la Campylobacteriosis ocasiona mayores problemas que pueden causar la muerte de un paciente. (*15*) Esta infección es de alto riesgo para personas inmunocomprometidas, por ejemplo en pacientes con SIDA hay una gran incidencia de bacteriemia (*39*) y hospitalización con graves complicaciones (*51*).

H.- Síndrome de Guillain-Barré (SGB)

Esta es una enfermedad autoinmune (*46, 47*) que produce desmielinización polineuropática aguda, se forman complejos antígeno-anticuerpo, componentes polisacáridos de *Campylobacter* que se depositan en la mielina que cubre los nervios periféricos (3, *26*.), causando una perdida de esta cobertura mielínica dando como resultado una debilidad simétrica, progresiva y rápida de comienzo distal con avance hacia proximal, con depresión del bulbo raquídeo y pérdida de reflejos.

Se calcula que el 1% de la población de Estados Unidos es afectada por el SGB y la incidencia poblacional es de uno en 2,000 (*3*).

Aproximadamente por encima del 40% los 5,000 casos anuales de campylobacteriosis, dejan secuelas de la enfermedad neuro degenerativa Guillan – Barre (*46*), bacteriemia, colecistitis, pancreatitis, hepatitis obstructiva, uveítis (*24*) y artritis reactiva (ReA) (*51*), inducidos por post-infecciones de *C. jejuni*. Esto es muy importante para mujeres en gestación por el efecto teriofetogénico que tienen estas patologías.

El paciente afectado muestra una debilidad progresiva en mas de un miembro. El grado de afección es muy variable desde una debilidad mínima de las piernas con o sin ataxia a una parálisis total de las 4 extremidades, parálisis facial y oftalmoplejia.

El 59% de los casos alcanzan la máxima debilidad a las dos semanas de comenzado el síndrome (*47*), cuya recuperación tarda de 6 semanas a 2 meses (*26*).

Dos de cada tres casos han padecido (1 a 3 semanas antes) de infección del tracto respiratorio o gastro intestinal; y en años recientes el *C. jejuni* ha sido la causa predisponente más común. Se estima que *C. jejuni* tiene una incidencia de un 25 al 41% de los casos en pacientes que padecieron de este síndrome (SGB). Un gran porcentaje (70%) de pacientes estudiados en el Reino Unido presentaron diarrea causada por Campylobacteriosis 12 semanas antes de padecer el Síndrome de Guillan-Barre (*50*).

Materiales y Metodología

Elección de muestreo.

Los ranchones de pollos parrilleros a muestrear fueron elegidos al azar, dentro de un área, cubriendo varios pueblos localizados en el área centro de Puerto Rico (Figura 1).

Figura 1. Mapa de pueblos de Puerto Rico donde se tomaron las muestras.

Se visitaron productores con entre 1 a 10 de ranchones que varían desde ranchones simples o dobles, productores, en los pueblos de Aibonito, Barranquitas, Cidra, Comerío, Corozal y Naranjito (Tabla 1). La finca de cada productor representa a 1 muestra. Se tomaron entre 5 a 7 recolecciones por cada muestra, de diferentes ranchones. El total se visitaron 18 productores recolectando materia fecal solamente de dos ranchones por cada productor. Cada ranchón fue identificado con las letras A y B.

Tabla 1. Información de las 18 muestras. Relacionando el pueblo, edad de la parvada, cantidad de aves, cantidad de ranchones por cada muestra.

Muestra	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
Pueblo	Aib	Bar	Aib	Cor	Nar	Aib	Aib	Aib	Cid
Cantidad de Ranchones	2	2	4	2	2	8	7	5	17
Edad de la parvadas (días)	35	36	35	35	18	34	38	39	32
Cant. de aves (total x 1000)	43	26.6	40	33	28	120	97	93	230
Ranchones Muestreados	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Muestra	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**
Pueblo	Aib	Aib	Aib	Aib	Cor	Bar	Com	Bar	Cor
Canti. de Ranchones	2	2	6	6	4	4	5	8	2
Edad de la parvadas (días)	35	35	32	36	32	38	36	37	38
Cant. de aves (total x 1000)	33	68	98	85	64.5	43	80.5	83	29
Ranchones Muestreados	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Abreviaciones: Aib: Aibonito, Bar: Barranquitas, Cid: Cidra, Com: Comerio, Cor: Corozal, Nar: Naranjito, Cant: Cantidad.

Recolección de Muestras

En los ranchones seleccionados se recolectó materia fecal fresca depositada en la camada procurando seleccionar heces del ciego, siendo este órgano donde hay más colonización de *C. jejuni* (*14*). Con una espátula de madera se tomaron restos de materia fecal depositados en la camada, de diferentes sitios del ranchón (*40)*. Cada resto de la muestra se colocó en un recipiente de plástico estéril. Las muestras se depositaron en 2 tipos diferentes de medios de transporte, bolsas y tubos.

Bolsas: aproximadamente 10 gramos de materia fecal se incluyeron en una bolsa (Ziploc) con 90 cc de caldo bolton (Oxoid CM983) (*10*) con sangre equina lisada (Oxoid Sr48) y antibióticos (Oxoid SR183E) (*27*).

Tubos: aproximadamente de 1 a 2 gramos de materia fecal, se colocó en un tubo de ensayo que contenía 10 cc de Agar Cary-Blair (Oxoid CM0519) y 4 cc de sangre lisada

equina (Oxoid Sr48) (*53*). Estas muestras de tubos fueron enviados al Departamento de Ciencia Avíar de la Universidad de Auburn en Alabama para los estudios de PCR.

Transporte

Desde que se tomó la primera muestra hasta su llegada al laboratorio para el proceso de las mismas había una diferencia de 6 horas. Las bolsas se transportaron a temperatura ambiente en cajas de teflón. Los tubos fueron transportados a temperatura de refrigeración (4 a 10 °C) (*57*). Estos fueron enviados al Departamento de Ciencias Avícolas de Aurburn, 5 tubos por cada muestra, siendo 3 tubos para un ranchón y 2 tubos para el otro ranchón. Los tubos fueron identificados con dos números, el primero el número de la muestra y el segundo el número del control, por ejemplo; de la muestra 1 se enviaron 5 tubos identificados como PR1/1, PR1/2, PR1/3 que representaron a un ranchón específico de la muestra 1 mientras PR1/4 y PR1/5 corresponde al segundo ranchón. Estos tubos se enviaron vía Fedex en caja de teflón con gel refrigerante, y demoraron en llegar entre 3 a 4 días al destino previsto, por lo tanto llegaron a temperatura ambiente

Laboratorio

El mismo día que se tomaron las muestras se procesaron en el laboratorio. La bolsa con la muestra se colocó en el "stomacher" por 60 segundos para la homogenización. Se tomó un 1 ml del homogenizado y se hicieron diluciones en tubos con 9 ml de agua peptonada (Difco) hasta 10^{-5} (*43*). De cada tubo se tomó 0.1 ml y se depositó en plato con "Campy Cefex Agar" (CCA,) (*43*) y Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar (mCCDA, Acumedia, Baltimore Inc.) (*45*), utilizando la técnica de esparcido en plato.

Como control se usó una muestra testigo (Campylobacter jejuni ATCC 33291, Oxoid C1400L) (*36*), y las muestras fueron incubadas en cámaras anaeróbicas con sobres para lograr microaerofilia (Campy Pakplus, BD Lab.) a 42 °C por 48 horas.

Después del tiempo de incubación se tomaron colonias de ambos platos (CCA y mCCDA) y se sembraron en platos de CCA por 48 horas a una temperatura de 42 °C (*45*).

Luego de esto se realizaron pruebas parciales confirmativas: observación en microscopio de fase por típica motilidad (*53*), catalasa (Fischer Scientific Co.), oxidasa (Fischer. Scientific Co.) *(46*) y Api Campy (Biomedic) (*22*).

Asilamiento y almacenamiento de las muestras en Auburn.

Cada muestra se envió en correo de 3 días a temperatura que oscilaban entre los 6 a 8 °C. Al llegar se procesaron inmediatamente en mCCA (*45*) y en mCCDA (Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar, Hutchinson and Bolton 1984) (*28*). La incubación fue a 42 °C por 48 horas en condiciones microaerofilícas (85 % N, 10 % CO_2, 5 % O_2). A las 48 horas se examinaron los platos y se observaron las colonias por medio de microscopio de fase (Optiphot-2, Nikon, Japan) considerando un positivo presuntivo por el aspecto, morfología y motilidad de la bacteria. Todos lo presuntivos positivos se colectaron en tubos individuales con caldo de soya tríptica (TSB, Diftco, Detroit, MI) suplementado con 30% de glicerol y 5% de sangre, luego fueron almacenados a temperatura de – 80 °C.

PCR.

Para el análisis del PCR, se sacaron los tubos almacenados a – 80 °C y con un loop estéril se raspó el interior del tubo congelado y se extrajo una pequeña cantidad de producto congelado (*52*), se deposito en un plato y se le agrego 1 cc de agua peptonada. Esta muestra se puso en un sistema de filtración (*5*) y se transfirió a platos de campy cefex modificado (mCC) (*54*). Estos platos fueron incubados en condiciones microaerofílicas a 42 °C por 24 horas. El ADN bacterial fue extraído usando PrepMan™ Ultra (Applied Biosystems, Foster City, CA). Todo el ADN fue analizado con Multiplex PCR que fue usado para la identificación de *Campylobacter jejuni* y *C. coli* procedentes de muestras de cerdos (*17*) y en carcasas de pollos parrilleros procesados (*45*). Con estos "multiplex PCR" las colonias aisladas reaccionaron con los "primers *CeuE gene"* para *C. coli* (*17*).

Las muestras de ADN fueron también verificadas con un segundo análisis multiplex PCR basadas en tres sets de "primers" de gen apartokinaza (forward primer CC18F, 5'GGT-ATG ATT TCT ACA AAG CGA G-3', "reverse primer" CC519R, 5'-ATA AAA GAC TAT CGT CGC GTG-3'; el gen hipuricaza (forward printer HipO-F, 5'GAC TTC GTG CAG ATA TGG ATG CTT-3'; "primer" revertido HipO, 5'-GCT ATA ACT ATC CGA AGA AGC CAT CA-3') y el gen 16s rDNA (forward primer 16S-F, 5'-GGA GGC AGC AGT AGG GAA TA-3'; primer revertido 16S-R 5'-TGA CGG GCG GTG AGT ACA AG-3'). Los primers de hipuricaza y 16S rDNA fueron publicados por Persson y Olsen en 2005 (*48*). Los análisis de PCR fueron realizados en 25 µl aliquots con 18 µl de un mezcla mis (OmniMix® HS, Cepheid, Sunnyvale, CA), 1 µl de cada primer (10 µM) y

1 µl de el ADN plantilla (~ 50 ng). El análisis fue realizado en PTC-100 "Programable Termal Controller" (MJ Research, Inc.). La desnaturalización del ADN fue realizada a 94 °C por 4 minutos, seguido por 20 ciclos a 94 °C durante 1 minuto, 50 °C por 1 minuto y 72 °C por 1 minuto.

La extensión final fue realizada a 72 °C por 5 minutos. Los "amplicons" fueron detectados por estándar gel electroforesis en 1.5% agarosa (Ultra Pure DNA Grade Azarosa, Bio-Rad Lab, Hercules, CA) en Tri-Borate-EDTA buffer en 70 V por 1 hora. Los geles fueron sumergidos en bromuro de ethidio y fueron visualizadas usando UV transiluminador (Gel-Doc Systems) con un programa computarizado de análisis molecular (Bio-Rad Lab).

Los amplicons de las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* fueron secuenciadas en el Laboratorio de Genética y Secuencia de la Universidad de Alabama usando un Analizador Genético ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). El "amplicon" 1062-bp correspondiente al gen 6S DNA fue también amplificado. En adición el gen 16S seleccionado desde la cepas de *C. jejuni* y *C. coli* fueron secuenciados usando primers descritos por Burnett y otros en el 2002 (*12*). Las secuencias fueron comparadas por similitud usando una búsqueda característica de nucleótido-nucleótido de BLAST (Basic Local Alignment Search, http://ncbi.nih.gov/BLAST/).

Por ultimo se realizo la prueba de E-test.

Esta prueba es un estudio de resistencia antibiótica, denominado también antibiograma. Es un prueba comercial de valor y reconocimiento oficial (*6*) que demuestra la resistencia o susceptibilidad del *C. jejuni* a los antibióticos presentes.

Resultados y Discusión

Resultados de Laboratorio.

Los resultados obtenidos mediante los aislamientos en el laboratorio del Departamento de Biología de UPRM están detallados en la Tabla 2. La dilución más baja que presentó crecimiento de colonia de *Campylobacter* se usó para el contaje.

Tabla 2. Relación de muestra y asilamiento de *C. jejuni* a más baja concentración en las 15 fincas muestreados en el laboratorio de UPRM. El número corresponde a la muestra y la letra al ranchón.

Muestra	Prom.	Muestra	Prom.	Muestra	Prom.
1 A	10^{-3}	**6 A**	10^{-2}	**11 A**	10^{-4}
1 B	10^{-1}	**6 B**	Negativo	**11 B**	10^{-5}
2 A	10^{-2}	**7 A**	10^{-3}	**12 A**	10^{-5}
2 B	10^{-3}	**7 B**	Negativo	**12 B**	10^{-3}
3 A	10^{-2}	**8 A**	10^{-4}	**13 A**	10^{-5}
3 B	10^{-1}	**8 B**	10^{-4}	**13 B**	10^{-5}
4 A	10^{-3}	**9 A**	Negativo	**14 A**	10^{-5}
4 B	10^{-3}	**9 B**	10^{-1}	**14 B**	10^{-5}
5 A	10^{-1}	**10 A**	10^{-5}	**15 A**	10^{-2}
5 B	10^{-3}	**10 B**	10^{-5}	**15 B**	10^{-4}

Abreviaciones: Prom. = promedio.

Las muestras con resultado "negativo" significan que no se observó la presencia de unidades formadoras de colonia en los platos. En la tabla faltan los resultados de las muestras 16A, 16B, 17A, 17B, 18A, 18B, 19A y 19B.

Por motivos desconocidos a la investigación ocurrieron errores experimentales que dañaron las muestras 16 a la 19, por lo cual no se tuvieron en cuenta para la discusión de datos.

Como lo demuestra la Tabla 2, en un 100% de las muestras analizadas hubo crecimiento de *Campylobacter.* Mientras que hubo crecimiento de *C. jejuni* en el 90% de los ranchones muestreados. Las muestras reflejaron un alto número de colonias.

En muchos de los platos se vio un crecimiento típico de la colonia deseada de color grisáceo opaco. En algunos casos eran translúcidas y chatas, mientras que en otros crecieron hongos y bacterias (cocos y bacilos) no deseadas.

De todos los platos se extrajeron colonias típicas para la observación en el microscopio de fase. Se pudo ver la morfología espiralada y el movimiento típico flagelar de la bacteria. Las pruebas de oxidaza y catalaza fueron positivas en todas las cepas. La prueba de ApiCampy resultó ser inespecífica porque arrojaba resultados de *Campylobacter spp.* por lo que fue descartada como prueba confirmativa, concordando con la publicación de Huysmans y colaboradores en el 95, donde demuestran la poca eficacia del Api-Campy como prueba confirmativa.

De las muestras analizadas en el laboratorio de Microbiología del Departamento de Ciencias Avíar de la Universidad de Auburn, se logró aislar cepas de las siguientes muestras (tubos): 1/1 al 1/5, 2, 3, 4, 5, 7,8, 10/1 al 10/5, 11/1, 11/3 al 11/5, 12/4, 13/1 al 13/5, 14/1, 14/2, 14/4, 14/5 y 15.

Si analizamos las primeras 5 muestras, de 1 a 5, podemos observar que hay una relación reflejada entre la tabla 2 y los crecimientos en tubos. En los 5 tubos hubo alto crecimiento de *C. jejuni* al igual que en el laboratorio de UPRM. Las muestras 6 y 9 no mostraron crecimiento, lo que puede sugerir que hubo una baja carga de *Campylobacter* en las muestras. En las fincas 6 y 9 fueron las que mejores controles de bioseguridad tenían con

respecto a las demás fincas, lo que puede demostrar la relación directa de se puede mantener un buen estado sanitario de la parvada. La muestra 5, presentó un gran crecimiento a pesar de que fue en pollos de sólo 18 días de edad. La muestra 15 reflejó una clara presencia de *C. jejuni* demostrado en la tabla 2, a diferencia de la negatividad en los tubos. Esta muestra pudo haber sido dañada durante el transporte, ya que la cadena la conservación de la temperatura de los tubos no estaba a nuestro alcance.

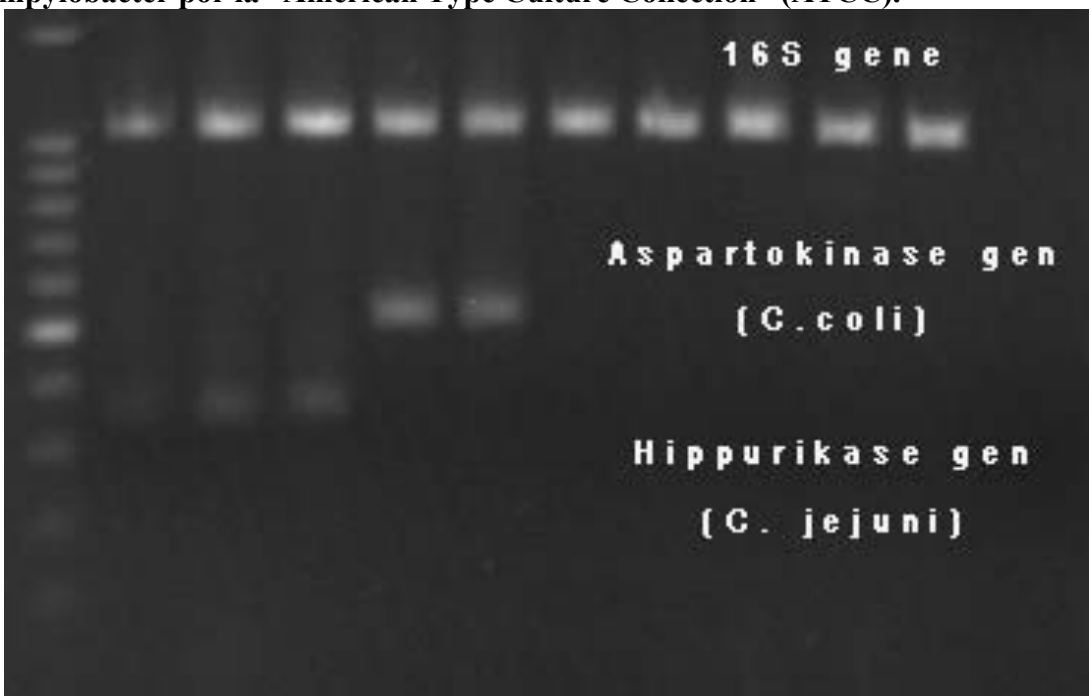
Resultados de PCR

Todas las colonias aisladas fueron confirmadas como *Campylobacter jejuni* con una prueba de PCR múltiple. La Tabla 3 muestra las sondas utilizadas para las pruebas de PCR y sus referentes publicaciones.

Tabla 3. Sondas usadas para el análisis de las cepas. Secuencias de nucleótidos para *Campylobacter jejuni* y *C. coli.*

Product (bp)	Primer (gene)	Sequence (5'-3')	Tm (C)	Reference
500	CC18F	GGTATGATTTCTACAAAGCGAG	51	Linton et al.
	CC519R	ATAAAAGACTATCGTCGCGTG	50	1997
344	HipO-F	GACTTCGTGCAGATATGGATGCTT'	56	Persson and
	HipO-R	GCTATAACTATCCGAAGAAGCCATCA	56	Olsen 2005
1062	16S-F	GGAGGCAGCAGTAGGGAATA	55	Persson and
	16S-R	TGACGGGCGGTGAGTACAAG	56	Olsen 2005

Figura 2. PCR comparativo entre *C. jejuni y C. coli*. Parámetros establecidos para Campylobacter por la "American Type Culture Collection" (ATCC).



La Figura 2 demuestra un PCR comparativo entre *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. Esta figura muestra cepas ATCC (American Type Culture Collection) usadas como control para validar el PCR múltiple.

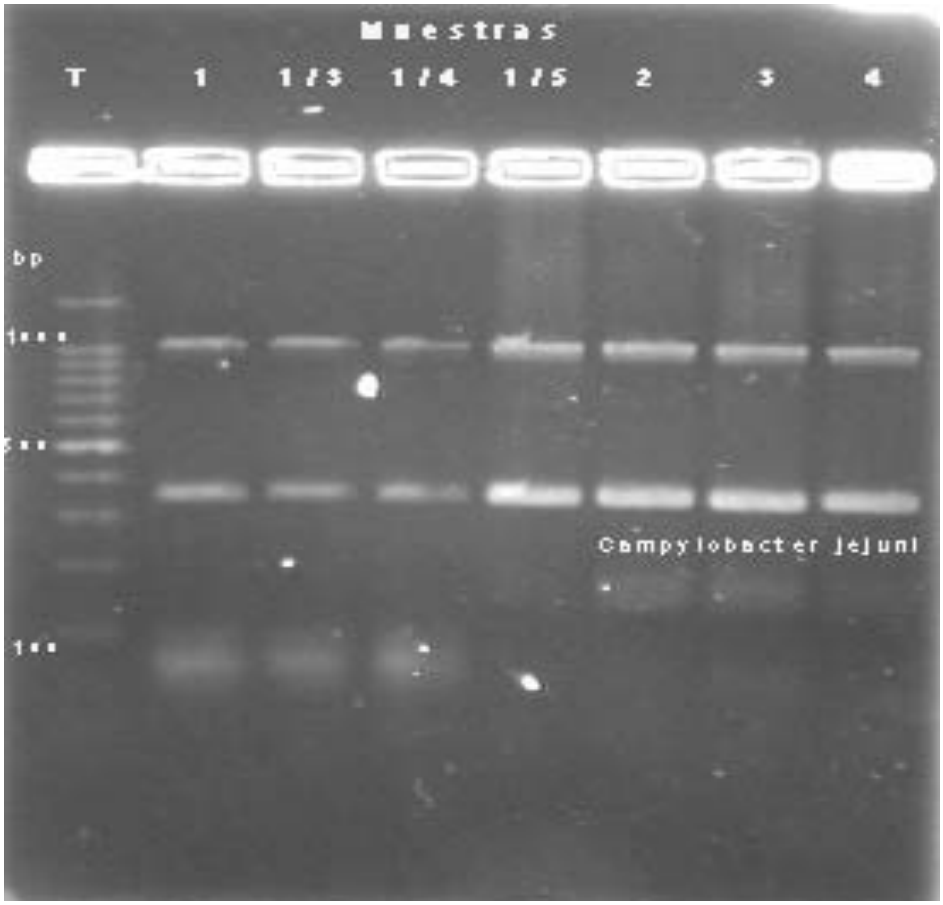
Los resultados del PCR múltiple las colonias aisladas reaccionan reaccionaron con el gen hipuricaza como lo señala la Figura 3.

La Figura 3 muestra una clara identificación del *C. jejuni*. Esto está dado por las manchas blancas entre 300 y 400 bp.

Si fuese *C. coli* tendrían que aparecer manchas blancas entre 500 y 600 bp como se muestra en la Figura 2.

La secuencia de nucleótidos de los “primers” del gen hippuricase se unen a los nucleótidos del *Campylobacter jejuni* para producir la luminosidad blanca en el biofilm negro.

Figura 3. Resultados de PCR para muestras 1, 2, 3 y 4. Reacción de los nucleótidos de *C. jejuni* con los primer del gen hipuricaza.



La tabla 4 muestra los resultados conjuntos de PCR y E-test para cada muestra evaluada. Todas las muestras de *C. jejuni* fueron resistentes a la vancomicina y trimetropina. La muestra 15 fue la única resistente a la ciprofloxacina.

Tabla 4. Resultados de PCR y E-test para las muestras de tubos.

Muestra	PCR				Etest				
ID	Hip	TC	CM	CI	GM	VA	TR	AZ	EM
PR-1/3	+	S	S	S	S	R	R	S	S
PR-1/4	+	I	I	S	I	R	R	S	I
PR-1/1	+	I	S	S	I	R	R	S	S
PR-1/5	+	I	I	S	I	R	R	S	I
PR-2	+	S	S	S	I	R	R	S	S
PR-3	+	I	S	I	I	R	R	I	I
PR-4	+	I	S	S	I	R	R	S	S
PR-5	+	S	S	S	S	R	R	S	I
PR-7	+	I	S	S	S	R	R	I	S
PR-8	+	R	S	S	S	R	R	S	R
PR-10/1	+	R	S	S	S	R	R	S	R
PR-10/2	+	I	R	S	I	R	R	I	R
PR-10/3	+	I	S	S	I	R	R	S	R
PR-10/4	+	I	S	S	S	R	R	S	I
PR-10/5	+	R	S	S	I	R	R	I	I
PR-11/1	+	I	I	S	I	R	R	S	I
PR-11/3	+	I	S	S	I	R	R	I	I
PR-11/4	+	I	I	S	S	R	R	I	R
PR-11/5	+	S	I	S	S	R	R	S	I
PR-12/1	+	I	S	S	I	R	R	S	I
PR-13/1	+	S	S	S	S	R	R	S	S
PR-13/2	+	S	R	S	I	R	R	I	R
PR-13/3	+	I	S	S	I	R	R	S	I
PR-13/4	+	I	S	S	I	R	R	S	S
PR-13/5	+	S	S	S	I	R	R	S	I
PR-14/1	+	I	S	S	I	R	R	S	S
PR-14/2	+	S	S	S	S	R	R	S	S
PR-14/4	+	I	S	S	I	R	R	S	I
PR-14/5	+	I	S	S	I	R	R	S	S
PR-15	+	R	S	R	I	R	R	I	R

Abreviaciones: Hip: *Hippuricase gen*; I: *intermedio*; S: *sensible*; R: *resistente*; TC: *tetraciclina*; CM: *clindamicina*, CI: *ciprofloxazina*; GM: *gentamicina*; VA: *vancomizina*; TR: *trimetropina*; AZ: *azitromicina*; ER: *eritromicina*.

En el anexo 1 se incluye un cuestionario que trata de evaluar las medidas de bioseguridad de cada granja que fue muestreada. La información obtenida fue resumida en la tabla 5. Con los datos del anexo 1 y los datos del laboratorio son insuficientes para analizar la relación entre la presencia de *Campylobacter jejuni* y como las deficiencias de bioseguridad de cada granja avícola afecta la presencia de la bacteria.

Recomendaciones

Para los productores avícolas sería importante implementar progresivamente acciones de bioseguridad en las fincas. Es un trabajo difícil, a largo plazo y costoso al principio. Pero dará réditos económicos en el futuro ya que estará combatiendo a todos los factores sanitarios que pongan en peligro la salud pública.

Poder realizar estudios genéticos comparativos de *C. jejuni* aislado de ambas compañías avícolas de Puerto Rico.

Poder aislar el *C. jejuni* en diferentes épocas del año.

Tratar de aislar *C. jejuni* de una misma parvada, desde la incubadora, la granja y la planta de procesamiento.

Conclusión

Se pudo demostrar la presencia de *Campylobacter jejuni* en un 100% de las granjas avícolas muestreadas. La presencia de la bacteria se sospechaba porque había indicios, por estudios anteriores, de que sí estaba presente y ahora fue confirmado.

Estos estudios realizados anteriormente, pudieron demostrar la presencia de *Campylobacter jejuni* en planta incubadora (62) y planta de procesamiento de aves (63) de la misma compañía

Las condiciones climáticas en otoño e invierno en Puerto Rico no afectan en lo más mínimo el crecimiento del *C. jejuni,* por lo que está prevalente en otoño y podría estar prevalente todo el año aunque no se ha reportado epidemias de campylobacteriosis en aves.

Las condiciones de bioseguridad de la mayoría de las granjas muestreadas demostraron carencias, lo cual refleja un bajo control del *C. jejuni* y de todas las otras posibles enfermedades de transmisión horizontal.

El control de esta bacteria no está en los planes estratégicos a corto plazo por parte de la compañía avícola, ni el gobierno estatal y federal porque hasta ahora no representa un gran problema para la salud pública. Sólo se aplican controles de bioseguridad mínimos y genéricos.

Por el resultado de las otras muestras (6 y 9), el no crecimiento de las muestras que se presentaron negativas tanto en el laboratorio como la de los tubos, no sugiere, que los ranchones están libre de la presencia de *C. jejuni* en la parvada.

Referencias.

1. **Acha, P., and B. Szyfres. 1992**. Zoonosis y Enfermedades Transmitidas Comunes al Hombre y los Animales. Segunda Edición. Organización Panamericana de la Salud, Publicación Científica No. 503: 37 – 40.
2. **Acuff, G. R., C Vanderzant, F. A. Gardner and F. A. Golan. 1982**. Examination of Turkey Eggs, Poults and Brooder House Facilities for *Campylobacter jejuni.* J. of Food Protection. 45: 1279 – 1281.
3. **Allos, B., F. Lippy, A. Carlsen, R. Washburn and M. Blaser. 1998**. *Campylobacter jejuni* Strains from Patients with Guillain-Barré Syndrome. Emerging Infectious Diseases. 4: 263 – 268.
4. **Baggerman, W.I., T. Koster. 1992**. A comparison of enrichment and membrane filtration methods for the isolation of *Campylobacter* from fresh and frozen foods. J. of Food Microbiol. 9: 87-94.
5. **Baggerman, W.I., Vervoort, R., 1987**. Isolation of *Campylobacter jejuni* from frozen food by means of the membrane filtration method. In: Kaiser, B., Falsen, E. (Eds), *Campylobacter* IV. Proceedings of the Fourth International Workshop on Campylobacter Infections. University of Göteborg, Göteborg, pp. 293.
6. **Baker, C. 1991**. The E-Test and *Campylobacter jejuni.* J. of Diagnostic Microbiology and Infectious Disease (CDC). 15: 469-472.
7. **Berrang, M. E., J. A. Dickens and M. T. Musgrove. 2000**. Effects of Hot Water Application After Defeathering on the Levels of *Campylobacter, Coliform Bacteria* and *Escherichia coli* on Broiler Carcasses. J. of Poultry Science. 79: 1689-1693.
8. **Berrang, M. E., D. P.Smith, W. R. Windham and P. W. Feldner. 2004**. Effect of Intestinal Content Contamination on Broiler Carcass *Campylobacter* Counts. J. of Food Protection. 67: 235 – 238.
9. **Blood, D. C., J. A. Henderson y O. M. Radostitis.1987** Medicina Vetrinaria. Sexta Edición. Ed. Interamericana.
10. **Bolton, F.J., Robertson, L., 1982**. A selective medium for isolation *Campylobacter jejuni*/*coli*. J. Clin. Pathol. 35: 462 - 467.

11. **Brewer, Susan. 1993**. Illinois Cooperative Extension Service, University of Illinois at Urbana-Champaign, School of Human Resources and Family Studies EHE-713.

12. **Burnett, T.A., Hornitzky, M.A., Kuhnert, P. and Djordjevic, S.P., 2002**. Speciating *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from poultry and humans using six PCR-based assays. FEMS Microbiol. Lett. 216: 201–209.

13. **Byrd, J. A., B. M. Hargis, D. J. Callwell, R. H. Bailey, K.L Herron, J. L McReinolds, R. L. Brewers, R. C. Anderson, K. M. Bischoff, T. R. Callaway and L. F. Kubena. 2001.** Effect of Acid Lactic Administration in the Drinking Water During Preslaughther Feed Withdrawal on *Salmonella and Campylobacter* Contamination of Broilers. J. of Poultry Science 80:278-283.

14. **Calnek, B. W. 1997**. Diseases of Poultry. Ninth Edition. Iowa State University. 9:237- 243.

15. **Centers for Disease Control and Prevention. 2003**. *Campylobacter* Infection National Center for Infectious Diseases, Division of Bacterial and Mycotic Diseases. www.cdc.gov.

16. **Christiane, G. and Huguette Gilbert.** 2003. Antimicrobial Resistance of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* Strains Isolated from Humans in 1998 to 2001 in Montréal, Canada. J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47:2027-2029.

17. **Cloak, O.M., Fratamico, P.M., 2002**. A multiplex PCR for the differentiation of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from a swine processing facility and characterization of isolates by PFGE and antibiotic resistance profiles. J. Food Prot. 65:266-273.

18. **Daczkowska-Kozon, E. and J. Brzostek-Nowakowska. 2003**. *Campylobacter spp*. in waters of three main Western Pomerania water bodies. Int. J. Hyg. Environ. Health. 435-443.

19. **De Boer, P., Duim, B., Rigter, A., van der Plas, J., Jacobs-Reitsma, W. and Wagenaar, J. A.,** 2000. Computer-assisted analysis and epidemiological value of genotyping methods for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J. Clin. Microbiol. 38:1940-1946.

20. **Eurosurveillance Weekly Report. 2001**. *Campylobacter jejuni* in a platelet concentrate. Vol. 5, Issue 30. www.eurosurvillance.org

21. **Fernandez H., M. I. Farace. 2003**. Manual de Procedimiento, Diagnostico de *Campylobacter* en muestras clinicas y de alimentos. Universidad Austral de Chile e Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de Argentina.

22. **Fernández, H. y Torres, N.2000**. *Campylobacter jejuni y Campylobacter coli* en tres grupos de gallinas de diferente origen geográfico del sur de Chile. *Arch. med. vet.* 32:241-244.

23. **Food & Drug Administration, 1991**. *Campylobacter enteritis* – New Zeland 1990. Morbidity and Mortality Weekly Report. CDC. MMWR 40 (7). www.fda.gov.

24. **Hannu T, Sihto-Kauppi K, Kotaniemi K, Kauppi M.2004**. Acute anterior uveitis in association with an outbreak of *Campylobacter jejuni* infection. Scand J Rheumatology. 33(1):55-7.

25. **Hayes, P. R. 1993**. Microbiología de los Alimentos. Editorial Acribia. Cap. 2: 49-50.

26. **Hernandez Chavarria, F. 2002**. Cultivo de Bacterias Microaerofilas, *Campylobacter*. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Rev. Col. de MQC de Costa Rica. 8: 5-9.

27. **Hunt, J. M., C. Abeita and T. Tran. 2001**. *Campylobacter.* FDA/CFSAN, Bacteriological Analitical Manual (Online). Charpter 7. www.fda.gov.

28. **Hutchinson, D. N., and F. J. Bolton. 1984**. An improved blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from faecal specimens. J. Clin. Pathol. 37:956-95.

29. **I.C.M.S.F. 2003.** Microbiological sampling plans: a tool to explore ICMSF recommendations. www.foodscience.afisc.csiro.au

30. **Jay, J. 2002.** Modern Food Microbiological. Sixth edition. Ed. Aspen.

31. **Jefrey J. S., E. R. Atwill, and A. Hunter. 2001**. Prevalence of *Campylobacter* and *Salmonella* at Squab (Young Pigeon) Processing Plant. J. Poultry Science. 80:151 – 155.

32. **Kalman, M., E. Szöllosi, B. Czermann, M. Zimanyi, S. Szekerex and M. Kalman. 2000.** Milk borne *Campylobacter* Infection in Hungary. J. of Food Protection. 63:1426 – 1429.

33. **Kasrazadeh, M. and C. Genigeorgis. 1987**. Origin and Prevalence of *Campylobacter jejuni* in Ducks and Duck Meat at the Farm and Processing Plant Level. J. of Food Protection. 50:321 – 326.

34. **Kelana L. C. and M. W. Griffiths. 2003**. Growth of Autobioluminiscent *Campylobacter jejuni* in Response to Various Environmental Conditions. J. of Food Protection. 66:1190 – 1197.

35. **Kramer, J., J. A. Frost, F. J. Bolton and D. R. Waring. 2000**. *Campylobacter* Contamination of Raw Meat and Poultry at Retail Sale: Identification of Multiple Types and Comparison with Isolates from Human Infection. J. of Food Protection. 63:1654 – 1659.

36. **Li, Y., H. Yang and B. L. Swem. 2002**. Effect of High-Temperature Inside-Outside Spray on survival of *Campylobacter jejuni* Attached to Prechill Chicken Carcasses. J. of Poultry Science. 81:1371 – 1377.

37. **Line, E. J., and K. G. Pearson. 2003**. Development of Selective Broth Medium for the Detection of Injured *Campylobacter jejuni* by Capacitance Monitoring. J. of food Protection. 66:1752 – 1755.

38. **Line, J. E., N. J. Stern, C. P. Lattuada and S. T. Benson. 2001**. Comparison of Methods for Recovery and Enumeration of *Campylobacter* from freshly Processed Broilers. J. of Food Protection. 64:982 – 986.

39. **Manfredi, R, A. Nanetti, M. Ferri and F. Chiodo.** 1999. Fatal *Campylobacter jejuni* bacteraemia in patients with AIDS. J. of Medical Microbiology. 48:601-603.

40. **Manouchehr, K, and C. Genigeorgis. 1987**. Origin and Prevalence of *Campylobacter jejuni* in Ducks and Duck Meat at the Farm and Processing Plant Level. J. of Food Protection. 50:321-346.

41. **Merck and Co. 1988**. Enfermedades de las Aves de Corral. Tercera Edición. Pag. 1463.

42. **Murray C., W. L. Willis. 1997**. *Campylobacter jejuni* Seasonal Recovery Observations of Retail Market Broilers. J. of Poultry Science. 76:314 – 317.

43. **Musgrove, M T, M E Berrang, J A Byrd, N J Stern and N A Cox. 2001**. Detection of *Campylobacter ssp*. In Ceca and Crops with and Without Enrichment. J. of Poultry Science. 80:825 – 828.

44. **New York State Department of Health. 1993**. *Campylobacteriosis.* The Empire State Publication. www.health.state.ny.us.

45. **Oyarzabal, O.A., Macklin, K.S., Barbaree, J.M., 2005**. Evaluation of agar plates for direct enumeration of *Campylobacter* spp. from poultry carcass rinses. J. of Appl. Environ. Microbiol. 71:3351-3354.

46. **Padungtod, P., R. Hanson, D. Wilson, J. Bell, J. E. Linz and J. B. Kaneene. 2002**. Identification of *Campylobacter jejuni* Isolates from Cloacae and Carcass Swabs of Chickens in Thailand by a 5' Nuclease Fluorogenic Polymerase Chain Reaction Assay. J. of Food Protection. 65:1712 – 1716.

47. **Pascual, S. I. 2003**. Síndrome de Guillan-Barre. www.aeped.es/protocolos/neurologia

48. **Persson, S, Olsen, K.E.P., 2005**. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. J. Med. Microbiol. 54:1043-1047.

49. **Ramson, G. M. and B. E. Rose. 1998**. Isolation, Identification and Enumeration of *Campylobacter jejuni/coli* from meat and poultry products. USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook. www.usda.gov.

50. **Rees, J., S. Soundan, N. Gregson and R. Hughes. 1995**. *Campylobacter jejuni* Infection and Guillain - Barré Syndrome. The New England J. of Medicine. 333:1374 – 1379.

51. **Smith, J. L. 2002**. *Campylobacter jejuni* Infection during Pregnancy: Long-Term Consequences of Associated Bacteriemia, Guillain-Barré Syndrome and Reactive Arthritis. J. of Food Protection. 65:696 – 708.

52. **Steele, T.W., McDermott, S.N., 1983**. The use of membrane-filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faeces. In: Pearson, A.D., Skirrow, M.B., Rowe, B., Davies, J.R., Jones, D.M. (Eds), *Campylobacter* II. Proceedings of the Second International Workshop on *Campylobacter* Infections. Brussels, Belgium. London, Public Health Service, pp. 54.

53. **Stern, N., V. Bannov, E. Svetoch, E. Mitsevich, I. Mitsevich, N. Volozhantsev, V. Gusev and V. Perelygin. 2004**. Distribution and Characterization of *Campylobacter spp*. From Russian Poultry. J. Food Protection. 67:239-245.

54. **Stern, N. J., Wojton, B., Kwiatek. K., 1992**. A differential-selective medium and dry ice-generated atmosphere for recovery of *Campylobacter jejuni*. J. Food Prot. 55:515-517.

55. **Thornton,L. 2004.** FDA Closer To Fluoroquinolone Ban In Poultry. First News. Poultry USA. Vol. 5, Pag. 8.

56. **Trachoo, N.,J. F. Frank and N. J. Stern. 2002**. Survival of *Campylobacter jejuni* in Biofilm Isolated from Chicken Houses. J. of Food Protection. 65:1110 – 1116.

57. **Willis, W. L., C. Murray and C. Talbott. 2002**. *Campylobacter* Isolation Trends of Cage Versus Floor Broiler Chickens: A One-Year Study. J. of Poultry Science. 81:629 – 631.

58. **Winters, D.K., Slavik, M.F., 1995**. Evaluation of a PCR based assay for specific detection of *Campylobacter jejuni* in chicken washes. J. of Mol. and Cell. Probes. 9:307-310.

59. **Wonglumsom, W., A. Vishnubhtla, J. M. Kim and D. Y. C. Fung. 2001**. Enrichment Media for Isolation of *Campylobacter jejuni* from Inoculated Ground Beef and Chicken Skin Under Normal Atmosphere. J. of Food Protection. 64: 630 – 634.

60. **World Health Organization (WHO). 2000**. *Campylobacter.* Fact Sheet N° 255: http://www.who.int/fsf/gldnrls.htm.

61. **Zaho, T., G. O Ezeike, M Doyle, Yen-Con Hung and R. Howel. 2003**. Reduction of *Campylobacter jejuni* on Poultry by Low-Temperature Treatment. J. of food Protection. 66: 652 – 655.

62. **Malave, Y., J. Latorre, E. Negron y M. Chaparro. 2005.** Master Tesis**:** Detección de Campylobacter jejuni en las incubadoras de una planta procesadora de pollos parrilleros de Puerto Rico. 05/2007. www.uprm.edu.

63. **Alicea, N., J. Latorre, L. Orellana y E. Rivera. 2005**. Master Tesis: Tiempo de vida util de pollo fresco almacenado a temperatura de refrigeración. 05/2007 www.uprm.edu.

Anexo 1

Este anexo contiene un cuestionario de bioseguridad realizado a cada finca avícola que se muestreo. El cuestionario trata de evaluar casi todas las principales características relacionadas con la interacción huésped – medio ambiente – enfermedad. El cuestionario incluye evaluación que comprende el manejo de la granja avícola, los controles higiénicos en controles de plagas, ambiente de la finca.

Cuestionario de Bioseguridad de las fincas muestreadas

Finca #:____ Fecha:_____ Temp:_____ Pueblo:_____ # Ranchones:____

Ambiente

1. Enfermedades en el área Si No
2. Densidad de fincas (millas): ____
3. Parvada traspatio Si No
4. Camada Amontonada Si No
5. Vegetación densa Si No
6. Materiales de construcción Si No
7. Alimento derramado Si No
8. Matadero Cerca Si No
9. Galpón cerca de carretera Si No
10. Fincas no avícolas cerca Si _ m.
11. Charca o estanque Si No

Finca

12. Libre acceso a ranchones Si No
13. Libre acceso a la finca Si No
14. Galpón abierto Si No
15. Aves de diferentes edades Si No
16. Empleado vive en la finca Si No
17. Vehiculos cerca de ranch. Si No

Parvada

18. Edad (días):_____
19. Cantidad de aves (x 1000):_____

Aves:

20. Aves muertas Si No
21. A. muertas amontonadas Si No
22. Presencia de mascotas Si No
23. Cual mascota:_____
24. Perros realengos Si No
25. Otra producción Si No

Cual:_____

Plagas

26. Ratas Si No
27. Aves silvestres Si No
28. Insectos Si No

Manejo e higiene.

29. Recogido Total Parcial
30. Periodo de espera parvadas: _____
31. Ropa especifica para empleados Si No
32. Ropa especifica para visitantes Si No
33. Requisitos para calzado Si No
34. Equipo de recogida, misma ropa Si No
35. Equipos Propios Ajenos
36. Desinfección entre parvadas Si No
37. Desinfección de vehículos Si No
38. Lavados de manos Si No
39. Visitas usan redecillas Si No
40. Visitas usan mascarillas Si No
41. Visitas usan botas Si No
42. Pediluvios Si No
43. Agua: Potable Pozo

Condiciones de los ranchones

44. Trampas buenas medias malas
45. Ventilación buenas medias malas
46. Techo buenas medias malas
47. Comederos buenas medias malas
48. Bebederos buenas medias malas

Observaciones:

Tabla 5. Respuestas del cuetionario de bioseguridad, realizado a cada finca visitada.

	Muestras														
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**
Pueblo	Aib	Bar	Aib	Aib	Nar	Aib	Aib	Aib	Cid	Aib	Aib	Aib	Aib	Cor	Bar
Cantidad de aves (x 1000)	43	27	40	33	28	120	97	93	32	33	68	98	85	65	83
Edad (días)	35	36	35	35	18	34	38	39	230	34	35	32	36	32	37
Cantidad de ranchones	2	2	4	2	2	8	7	5	17	2	2	6	6	4	8
Tipo de ranchones	Dob	Sim	Dob	Dob	Dob	DyS	DyS	DyS	Sim	Dob	Sim	Dob	Dob	Dob	Dob
Ambiente															
Enfermedades en el área	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Densidad fincas avícolas (millas):	1	2	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1
Parvada traspatio	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Camada Amontonada	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Vegetación densa	Si	Si	No	Si	Si	No	No	No	Si	Si	No	Si	No	No	Si
Materiales de construcción	No	No	No	No	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	No	Si	No	Si
Alimento derramado	No	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	No	No	No	No	No
Matadero Cerca (2 millas)	Si	No	Si	No	No	Si	Si	No	No	Si	No	No	No	No	Si
Galpón cerca de carretera (45m)	Si	No	Si	Si	Si	No	No	No	Si	Si	No	No	No	No	Si
Fincas no avícolas cerca (mil)	1	1	1	1	1	3	1	1	2	1	2	1	1	1	1
Charca o estanque	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	No	No	No	No	No	No
Finca															
Libre acceso a ranchones	Si	No	No	No	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No	No	No	No	No
Libre acceso a la finca	Si	No	No	No	Si	No	No	No	No	Si	No	No	No	No	No
Galpón abierto	No	No	No	No	Si	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Si
Aves de diferentes edades	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	No	No	No	No
Parvada de diferentes edades	No	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Si	No	No	No	No
Empleado vive en la finca	No	Si	No	No	Si	No	Si	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	No
Vehículos cerca de ranchones	No	Si	No	No	No	No	No	Si	Si	Si	Si	No	No	Si	Si
Aves															
Muertas	Si	Si	No	Si	Si	No	No	No	No	Si	Si	No	No	No	Si
Muertas amontonadas	Si	No	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	No	No	No	No
Presencia de mascotas	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Si	Si	Si	No	Si	No	No
Tipo de mascota	Gpe	No	No	No	No	No	Can	Can	Can	Can	Can	No	Can	No	No
Pres. de perros realengos	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No

Tabla 5. Continuación

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Plagas															
Ratas	Si	Si	No	Si	Si	No	No	No	No	Si	Si	Si	No	No	Si
Aves silvestres	Si	Si	No	Si	No	No	No	No	No	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Insectos	Si	Si	No	Si	Si	No	No	No	No	Si	Si	Si	Si	No	Si
Manejo e higiene.															
Recogido	Tot	Tot	Tot	Tot	Tot	Tot	Tot	Tot	Tot	Tot	Tot	Tot	Tot	Tot	Tot
Espera entre parvadas (días)	18	18	18	18	30	14	13	14	18	17	14	14	15	18	18
Ropa específica empleados	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Ropa específica visitantes	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Requisitos para calzado	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Equipos	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
Desinfección entre parvadas	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Desinfección de vehículos	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Lavados de manos	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Visitas usan redecillas?	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Visitas usan mascarillas?	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Visitas usan botas?	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Pediluvios	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Agua proveniente de	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz
Condiciones de ranchones															
Trampas	Bue	Med	Bue	Med	Mal	Bue	Bue	Bue	Bue	Mal	Med	Med	Med	Med	Med
Ventilación	Bue	Mal	Bue	Mal	Med	Bue	Bue	Bue	Bue	Med	Med	Med	Med	Med	Bue
Techo	Bue	Mal	Bue	Mal	Med	Bue	Bue	Bue	Bue	Mal	Med	Med	Med	Med	Bue
Comederos	Bue	Med	Bue	Med	Med	Bue	Med	Bue	Bue	Med	Med	Med	Med	Med	Med
Bebederos	Bue	Med	Bue	Med	Med	Bue	Bue	Bue	Bue	Med	Med	Med	Med	Med	Med

Abreviaciones: **Bca**: Bovinos de carne, **Por**: porcinos, **Equ**: equinos, **Cap**: caprinos, **Bue**: buena, **Med**: media, **Mal**: mala, **Can**: perro, **Gpe**: gallos de pelea, **Par**: parcial, **Tot**: total, **Poz**: agua de pozo, **Pot**: agua potable, **Pro**: propios, **Aje**: ajenos, **Aib**: Aibonito, **Bar**: Barranquitas, **Com**: Comerio, **Cor**: Corozal, **Cid**: Cidra, **Nar**: Naranjito, **m**: metros, **mil**: millas, **Dob**: doble, **Sim**: simple, **DyS**: dobles y simples, **Bue**: buenas.