

**DETECCIÓN DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* EN LAS INCUBADORAS DE
UNA PLANTA PROCESADORA DE POLLOS PARRILLEROS DE
PUERTO RICO**

por

Yadira Malavez Acevedo

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el

grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

Ciencia y Tecnología de Alimentos

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2005

Autorizado por:

Edna Negrón, Ph. D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Mildred Chaparro, Ph. D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

José R. Latorre, Ph. D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

José A. Mari Mutt, Ph. D.
Director de Estudios Graduados

Fecha

Edna Negrón, Ph. D.
Coordinadora del Programa de
Ciencia y Tecnología de Alimentos

Fecha

Abstract

A total of 960 chicken eggs from a hatchery in Puerto Rico were analyzed to detect the presence of *Campylobacter jejuni*. A cluster sampling with a binomial distribution was made. Random samples were taken in duplicate from 5 lots. Samples were taken from the inside and outside of eggs to determine if *C. jejuni* can be vertically transmitted. Samples were also taken from transport vehicles and incubators, as possible sources of horizontal transmission. The isolation of *Campylobacter* was made using traditional culture techniques and the identification of the species *jejuni* was made using the API Campy biochemical test. Isolated bacteria were characterized using the antibiotic susceptibility test. *Campylobacter jejuni* was isolated from the interior of two lots of eggs (incidence <1.6 %) and on the surface of one lot (incidence <3.8 %). One sample of the incubators was positive for *C. jejuni*, but the bacterium was not isolated from any truck sample. These results suggest that *C. jejuni* can be vertically transmitted but probably this is not its primary means of transmission of this bacterium. The incubators and the transport truck are not significant sources of horizontal transmission.

Resumen

Se analizaron 960 huevos de gallina fecundos de una planta de incubación de Puerto Rico para detectar la presencia de *Campylobacter jejuni*. Se realizó un muestreo por conglomerados con una distribución binomial. Se tomaron al azar muestras de 5 lotes de huevos, en duplicado. La capacidad de esta bacteria para transmitirse verticalmente fue evaluada tomando muestras del interior y el exterior de los huevos. Además, se tomaron muestras del contenedor de transporte y de las incubadoras, como posibles fuentes de transmisión horizontal. Por medio de cultivo tradicional se aisló a *Campylobacter*, y se identificaron las muestras positivas para *C. jejuni* utilizando la prueba bioquímica API Campy. A las bacterias aisladas se les realizó la prueba de susceptibilidad a antibióticos. Se detectó la presencia de *C. jejuni* en el interior de los huevos de dos de lotes (incidencia <1.6 %), y en la superficie de los huevos de un lote (incidencia <3.8 %). Se encontró una muestra de incubadora contaminada con *C. jejuni* pero no se detectó la bacteria en las muestras tomadas del contenedor de transporte. Los resultados sugieren que *C. jejuni* puede transmitirse verticalmente, pero posiblemente esta no es su principal forma de transmisión. Las incubadoras y el camión de transporte de huevos no son fuentes significativas de contaminación horizontal.

Dedicatoria

A mi querida madre
Mayra Acevedo Ponce

Agradecimientos

Gracias a todas las personas que me ayudaron a realizar esta investigación. Le agradezco a mi comité graduado, al Dr. José R. Latorre, la Dra. Edna Negrón y la Dra. Mildred Chaparro, por su apoyo y sugerencias. Al Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos, al Departamento de Industria Pecuaria y al Dr. Carlos Ortiz (Estación Experimental Agrícola) por haber aportado fondos para realizar este proyecto.

Además, agradezco al Sr. Melvin Santos (gerente de la planta de incubación) por proveer los huevos utilizados en este estudio. Al Sr. Efraín Pérez (Centro Médico de Mayagüez) por sus recomendaciones y por los materiales utilizados en la prueba de susceptibilidad a antibióticos. A la Sra. Ivette Vissepo (secretaria del Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos) por su colaboración en las órdenes de compra.

Por su comprensión, apoyo y motivación agradezco a mi esposo Esbal Jiménez Cabán. Por último, en especial a Dios, por darme fortaleza, salud y por permitirme realizar mis metas.

Tabla de Contenido

Lista de tablas.....	viii
Lista de figuras.....	ix
Introducción.....	1
Revisión de literatura.....	3
A. Descripción general.....	3
B. Aspectos clínicos y epidemiológicos de la enfermedad.....	4
C. Tratamiento para la enfermedad.....	5
D. Transmisión de <i>Campylobacter</i>	8
1. Transmisión horizontal.....	8
2. Transmisión vertical.....	13
Objetivos.....	19
Materiales y métodos.....	20
A. Recolección de las muestras.....	20
B. Procesamiento de las muestras.....	21
C. Análisis bacteriológico.....	22
D. Prueba de susceptibilidad a antibióticos.....	24
E. Modelo estadístico.....	26
Resultados y discusión.....	27
A. Detección de <i>Campylobacter</i> en los huevos de una planta de incubación de una compañía de pollos parrilleros de Puerto Rico..	27
B. Contaje aeróbico en platos.....	31

C. Caracterización de los organismos a través de susceptibilidad a antibióticos.....	33
Conclusión.....	36
Recomendaciones.....	37
Literatura citada.....	38

Lista de Tablas

Tabla 1. Detección de *Campylobacter jejuni* en los lotes de huevos, incubadoras y el camión de transporte de huevos..... 27

Tabla 2. Contaje aeróbico en platos..... 33

Lista de Figuras

Figura 1. Recolección de muestras en la incubadora de huevos.....	21
Figura 2. Ejemplo de las placas de Campy-Cefex positivas a <i>Campylobacter</i> ..	23
Figura 3. Ejemplo de la prueba Api Campy.....	24

Introducción

En Puerto Rico se consume mucha carne de pollo. Según las estadísticas del Departamento de Agricultura de Puerto Rico, el consumo por persona de 101.52, 96.99 libras, para los años 2002 y 2003, respectivamente. Se han hecho muchos estudios para identificar los patógenos asociados al consumo de esta carne que pueden afectar la salud de la población, tales como *Salmonella* spp. y *Campylobacter jejuni* (Bryan y Doyle, 1995). *Campylobacter jejuni* es uno de los patógenos de mayor incidencia en los productos de pollo fresco (Bryan y Doyle, 1995). Esta bacteria causa campilobacteriosis y es la fuente más frecuente de gastroenteritis aguda. En Estados Unidos esta bacteria causa aproximadamente 2.4 millones de casos de gastroenteritis por año (Tauxe, 1992; citado por Hiett et al., 2002).

El Departamento de Salud de Puerto Rico informó que ocurrieron 39, 36 y 35 casos de campilobacteriosis para los años 2001, 2002 y 2003, respectivamente. La cantidad anual de casos pueden estar por debajo de lo reportado porque los síntomas de la enfermedad pueden ser leves y por lo tanto no ser informados al Departamento de Salud (*Center for Disease Control and Prevention*, 1998).

Varios estudios han encontrado a *Campylobacter jejuni* en el tracto reproductor de las gallinas y en la superficie e interior de los huevos, lo que sugiere que los huevos pueden jugar un papel importante en la transmisión

vertical de este patógeno (los parentales infectan los huevos) (Doyle, 1984; Maruyama y Katsube, 1990; Buhr et al., 2002; Sahin et al., 2003).

Las empresas productoras de pollos parrilleros en Puerto Rico reciben huevos de diversas granjas de Estados Unidos y los incuban durante 21 días. Es importante determinar si los huevos recibidos llegan contaminados por transmisión vertical o si se contaminan aquí por transmisión horizontal (en la planta de incubación, en el camión de transporte, o de ave a ave). Se debe identificar el origen de la contaminación porque los huevos producirán pollos parrilleros y su contaminación con bacterias patogénicas representa un peligro potencial a la inocuidad de los alimentos que se consumen en Puerto Rico.

Revisión de Literatura

A. Descripción General

El género *Campylobacter* pertenece a la familia *Campylobacteriaceae*. Estas bacterias son patógenas o comensalistas y se caracterizan por tener una forma curva, en forma de S o espiral. Todas son bacilos gram-negativos, no formadores de esporas, aunque en cultivos viejos expuestos al aire por mucho tiempo pueden mostrar una morfología cocoide. Las especies de este género poseen un flagelo polar en uno o ambos extremos, que les confiere motilidad. Estas bacterias son termófilas y muestran un crecimiento óptimo a los 42 °C, aunque pueden crecer a 37 °C. Son organismos de lento crecimiento y requieren un ambiente microaerófilico para vivir (Griffiths y Park, 1990).

Las especies de *Campylobacter* (*C. coli*, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. fetus*, *C. gracilis*, *C. helveticus*, *C. hyointestinalis*, *C. jejuni*, *C. lari*, *C. mucosalis*, *C. rectus*, *C. showae*, *C. sputorum* y *C. upsaliensis*) han sido asociadas con múltiples enfermedades en animales y humanos. Las dos bacterias de mayor importancia clínica como agentes causales de la campilobacteriosis humana son *C. jejuni* y *C. coli*. (Griffiths y Park, 1990).

B. Aspectos clínicos y epidemiológicos de la infección con *Campylobacter* en humanos

La infección con *Campylobacter jejuni* es la principal causa de gastroenteritis bacteriana en los Estados Unidos y en muchos otros países. Se estima que en los Estados Unidos ocurren anualmente unos 2.4 millones de casos, lo cual excede el número total de casos de diarreas causadas por *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli* O157:H7 (Tauxe, 1992; citado por Hiett et al., 2002; Blaser, 1997; Pasternack, 2002).

La dosis infecciosa requerida para desarrollar la enfermedad es 500 a 800 unidades formadoras de colonia (UFC) (Black et al., 1988, citado por Alterkruse, 1999). En la mayoría de los casos hay un periodo de incubación de 2 a 5 días que podría durar hasta una semana (Blaser, 1997). Los síntomas más comunes son diarrea acuosa y/o con sangre, vómitos, fiebre y dolor abdominal, parecido a los síntomas de la apendicitis aguda. La enfermedad dura cerca de una semana pero pueden tener serias complicaciones, como artritis reactiva (síndrome de Reiter), el síndrome Guillain-Barré, bacteremia, miocarditis, pancreatitis y aborto séptico. Por lo general la campilobacteriosis no causa muerte, sin embargo puede ocurrir en pacientes inmunocomprometidos, infantes y ancianos (Alterkruse et al., 1999, Trachoo, 2003).

Campylobacter puede transmitirse a los humanos a través de alimentos contaminados de origen animal insuficientemente cocidos, agua no potable y por contacto directo con animales, especialmente mascotas. Esta bacteria es parte de la flora gastrointestinal de muchos animales. El 70 % de los casos

esporádicos de campilobacteriosis son causados por la ingesta de carne de pollo contaminada insuficientemente cocida (Blaser, 1997; Ketley, 1997).

Los brotes de campilobacteriosis son poco comunes pero han sido reportados en diferentes partes del mundo, usualmente han sido causados por el consumo de leche sin pasteurizar y de agua no tratada. Ocasionalmente han sido causados por la ingesta de pollo insuficientemente cocido y de otros alimentos contaminados (Lehner et al., 2000; Melby et al., 2000; Park, 2002).

En el estado de Oklahoma ocurrió un brote de campilobacteriosis en el que se afectaron 16 a 20 personas que almorzaron en un restaurante el 15 de agosto de 1996. La causa del brote fue contaminación cruzada entre lechuga y pollo crudo (*Center for Disease Control and Prevention*, 1998). En septiembre del 1998 se reportó un brote en el Centro de Juventud Austriaco, donde 28 de los 38 niños exhibieron síntomas clásicos de campilobacteriosis. La causa del brote fue la ingesta de leche sin pasteurizar distribuida por una vaquería local (Lehner et al., 2000). En una comunidad subártica ocurrió un brote de gastroenteritis causado por *C. jejuni*. La comunidad consumió agua no clorada durante aproximadamente cuatro semanas en el verano de 1998. Se afectaron 330 personas (Melby et al., 2000).

C. Tratamiento para la enfermedad y resistencia a antibióticos

Para los pacientes con campilobacteriosis se recomienda la terapia con antibióticos si tienen fiebre alta, diarrea con sangre, si han tenido más de ocho diarreas al día o en pacientes inmunocomprometidos. La eritromicina es el

antibiótico más utilizado para tratar la campilobacteriosis, porque es muy eficaz y tiene pocos efectos secundarios. También se utilizan otros agentes antimicrobianos como las fluoroquinolonas (ciprofloxacina) y otros macrólidos como la azitromicina (Alterkruse et al., 1999; Trachoo, 2003).

Las fluoroquinolonas han sido usadas ampliamente para el tratamiento de pacientes con gastroenteritis y diarrea de viajero (Picher et al., 1987). La resistencia hacia las fluoroquinolonas desarrollada por *Campylobacter* spp. en animales utilizados para consumo se considera que es un problema de salud pública emergente (Engberg et al., 2001). Algunos estudios indican que el uso de antibióticos en prácticas veterinarias también ha contribuido al desarrollo de resistencia contra fluoroquinolonas por *Campylobacter* spp. (Endtz et al., 1991; citado por Engberg et al., 2001).

Se han realizado varios estudios para determinar el incremento en la cantidad de cepas de *Campylobacter* resistentes a las quinolonas. Pedersen y Wedderkopp (2003) investigaron la resistencia a las fluoroquinolonas por *Campylobacter jejuni* y *C. coli* en 120 granjas de pollos parrilleros de Dinamarca, y encontraron que del año 1998 al 1999 44.9 % de las muestras estaban contaminadas con *Campylobacter* spp., y 7.5 % de las colonias *C. jejuni* y *C. coli* fueron resistentes al ácido nalidíxico.

Nawaz et al., (2003) analizaron hígados de pollo comprados en supermercados de Arkansas para detectar la presencia de *Campylobacter* y determinar su resistencia a ciprofloxacina y al ácido nalidíxico. De 232 muestras

de *Campylobacter*, 60 tenían la bacteria y 21 eran resistentes a fluoroquinolonas.

En Minnesota se analizó la incidencia de cepas de *Campylobacter* resistentes a quinolonas desde el año 1992 al 1998 (Smith et al, 1999). Se encontró que la cantidad de cepas de *Campylobacter jejuni* provenientes de humanos y resistentes a quinolonas aumentó de 1.3 % en el 1992, a 10.2 % en el 1998. Los autores también observaron *C. jejuni* fue resistente a ciprofloxacina en 14 % de 91 productos de pollo obtenidos de supermercados locales. Se estableció una relación entre las cepas resistentes de *C. jejuni* presentes en los productos de pollo y las infecciones adquiridas domésticamente por los residentes de Minnesota.

Gaudreau y Gilbert (2003) analizaron cepas de *C. jejuni* subsp. *jejuni* aisladas de humanos desde el año 1998 al 2001 en Montreal, Canadá, observando un aumento de 10 % a 47 % en el porcentaje de cepas resistentes a ciprofloxacina.

Además de la resistencia de *C. jejuni* hacia las fluoroquinolonas, se ha encontrado que esta bacteria tiene resistencia hacia otros antibióticos. Oza et al., (2003) analizaron la resistencia a antibióticos de *C. jejuni* aislada de 387 pollos parrilleros en Irlanda del Norte. Un total de 238 muestras fueron positivas para *C. jejuni* (90.8 %) y 24 muestras fueron positivas para *C. coli* (9.2 %). La resistencia hacia eritromicina, gentamicina y cloramfenicol para ambas especies fue menor de 1 %, pero presentaron resistencia al ácido nalidíxico, tetraciclina y

ampicilina, en un 10.1 %, 13.0 % y 33.2 %, respectivamente para *Campylobacter jejuni* y en un 4.2 %, 8.3 % y 29.9 %, respectivamente para *Campylobacter coli*.

Aydin et al., (2001) aislaron a *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* de 40 gansos domésticos en Turquía. Todas las cepas analizadas eran susceptibles a nitrofuratoína, ácido nalidíxico, eritromicina, estreptomina, gentamicina, amoxicilina-ácido clavulánico, cloramfenicol, enrofloxacina y eran resistentes a la penicilina G y la cefalotina. Ocho (67.0 %) fueron resistentes a cloxacilina y ampicilina. Tres cepas (25.0 %) fueron resistentes a tetraciclina y una cepa (8.4 %) fue resistente a trimetoprim/sulfametoxazol y a kanamicina.

D. Transmisión de *Campylobacter*

Se han realizado diversos estudios para determinar las rutas y factores que promueven la contaminación de *Campylobacter* en los pollos. Las rutas principales por las cuales *Campylobacter jejuni* puede transmitirse son la transmisión horizontal y la vertical. La transmisión horizontal ocurre cuando la bacteria infecta las aves desde el ambiente que los rodea, mientras que la transmisión vertical implica que los reproductores pesados (padres de los pollos parrilleros) infectan su prole.

1. Transmisión Horizontal

La ruta de transmisión de *Campylobacter* más aceptada por la comunidad científica es la transmisión horizontal, aunque no se sabe con certeza como exactamente *Campylobacter* infecta las parvadas de pollos.

Algunas fuentes potenciales de contaminación son: camada usada, agua no potable en los bebederos, otros animales de granja, animales domésticos, animales silvestres, insectos, equipo de transporte y los empleados. Ninguno de estos factores se ha identificado como la principal fuente de contaminación de las parvadas de pollos (Montrose et al., 1984; Kazwala et al., 1990; Pearsons et al., 1996; Gregory et al., 1997; Craven et al., 2000 y Stern et al., 2001).

Algunos estudios solo han detectado a *Campylobacter* en las muestras tomadas del ambiente luego de que los pollos están contaminados con la bacteria, lo cual sugiere que los pollos en vez de ser contaminados por el ambiente son la fuente de contaminación ambiental (Kazwala et al., 1990; Stern et al., 2001).

Debido a la sensibilidad de *C. jejuni* al oxígeno y a la deshidratación, este microorganismo por lo general no puede crecer en la camada y el alimento (Kazwala et al., 1990; Cox et al., 2001). Algunos investigadores han encontrado que la contaminación del alimento y la camada ocurre luego de que los pollos presentan contaminación (Shane et al., 1984; Gregory et al., 1997). Jones y et al., (1991) indican que el limitado nivel de aislamiento de *C. jejuni* en la camada de los nidos sugiere que la contaminación de ésta era transitoria debido a la presencia de materia fecal. Acuff et al., (1982) encontraron que cuando se limpia cuidadosamente las facilidades y se coloca nueva camada antes de recibir nuevos pavitos se excluyen las fuentes iniciales de contaminación de *C. jejuni* en la camada, agua, alimento y en la gravilla. La limpieza de las facilidades y la remoción de la camada usada son importantes porque Montrose et al., (1984)

demonstraron que al poner gallinas libres de patógenos en contacto con camada infectada con *C. jejuni* éstas adquirieron la infección en cinco días bajo condiciones controladas de laboratorio.

El agua no potable en los bebederos ha sido sugerida como una posible ruta de infección de *C. jejuni* para los pollos parrilleros (Pearson et al., 1996; Gregory et al., 1997); sin embargo, las características fisiológicas de *Campylobacter* no le permiten propagarse en ambientes acuáticos. Se ha señalado que la presencia de esta bacteria en el agua es indicio de contaminación reciente con materia fecal, lo cual ha causado diversos brotes a nivel mundial (Melby et al., 2000; Clark et al., 2003). El agua de los bebederos en las granjas de pollos por lo general se contamina una vez la parvada está infectada con *C. jejuni* (Shane et al., 1984; Kazwala et al., 1990; Jones et al., 1991). Sin embargo, algunos estudios han encontrado una relación directa entre el agua de los bebederos y la contaminación de los pollos con *Campylobacter* (Pearson et al., 1996; Gregory et al., 1997).

Diversos estudios indican que los insectos pueden actuar como una fuente de contaminación de *C. jejuni* debido a su fácil acceso a las granjas de pollos. Shane et al., (1984) demostraron que bajo condiciones de laboratorio las moscas caseras infectadas con *C. jejuni* pueden infectar gallinas libres de patógenos. Hald et al., (1984) encontraron que 4 (8.2 %) de 49 moscas en los alrededores de granjas de pollos parrilleros estaban infectadas con *C. jejuni*. Al analizar 28 muestras de *C. jejuni* aislada de 20 pollos parrilleros, 4 moscas y 4 ovejas, los autores encontraron que 27 de las mismas tenían igual patrón de

Electroforesis en Gel de Campo Pulsado, mientras que sólo una tenía un patrón levemente diferente. Stern et al., (2001) encontraron que el 25 % de los insectos aislados de una granja de pollos contenían *Campylobacter* antes de detectarse la bacteria en los pollos. Sin embargo, otros estudios no han podido detectar la contaminación en los insectos hasta después de que los pollos presentan infección (Gregory et al., 1997). Jones et al., (1991) indican que la contaminación con *Campylobacter* debe ser externa, ya que no pudieron aislar la bacteria luego de desinfectar la superficie externa de los insectos.

Los roedores y algunos animales silvestres, como los mapaches, pueden ser hospederos de *Campylobacter* y contribuir a la transmisión de este microorganismo. Stern et al., (2001) encontraron ratones infectados con *C. jejuni* luego de que las parvadas presentaban contaminación con la bacteria. Otros investigadores no han podido aislar a *C. jejuni* en ratones presentes en las cercanías de las granjas de pollos (Gregory et al., 1997; Jones et al., 1990). Gregory et al. (1997) encontraron un mapache y un conejo infectados con *C. jejuni*; sin embargo, no encontraron correlación con la contaminación de los pollos parrilleros, porque estos animales no tienen fácil acceso a la granja.

Las aves silvestres presentes cerca de las granjas de pollos están comúnmente contaminadas con *C. jejuni* (Gregory et al., 1997; Craven et al., 2000). Stern et al., (2001) encontraron muestras de excreta de aves infectadas con *Campylobacter* en los alrededores de granjas de pollos parrilleros. Craven et al., (2000) encontraron aves silvestres contaminadas con *Campylobacter* en los alrededores de granjas de reproductores, ellos indican que dichas aves son un

peligro potencial para la contaminación con *Campylobacter* porque observaron cómo los estorninos rompían la tela metálica para intentar entrar a la granja.

Algunos científicos han asociado a *Campylobacter* con la presencia de animales en las cercanías de las granjas de pollos. Entre estos animales están las vacas, los cerdos, los perros y los gatos (Gregory et al., 1997; Stern et al., 2001). Stern et al., (2001) encontraron a *Campylobacter* en todas las muestras de heces de animales domésticos colectadas en los alrededores de dos granjas de pollos parrilleros. Las muestras fueron tomadas antes de llegar las parvadas de pollos, por lo que los animales domésticos pudieron actuar como una fuente de contaminación.

C. jejuni se ha aislado de las botas de empleados de granjas, el agua de los pediluvios para botas, cajones y del camión de transporte. Estos factores pueden introducir la bacteria a las parvadas susceptibles durante la entrega de los pollitos (Kazwala et al., 1990). Los cajones donde se colocan los pollos para llevarlos al matadero pueden ser un vehículo de contaminación para las parvadas que durante su desarrollo eran negativas (Stern et al., 2001). Gregory et al., (1997) no detectaron muestras positivas para *Campylobacter* al momento de la entrega de los pollitos parrilleros en los cajones de transporte, en las botas de los empleados, ni en las gomas del camión. Sólo encontraron muestras positivas en las botas de los empleados luego de que la parvada presentó la contaminación.

La literatura citada demuestra que *Campylobacter jejuni* está ampliamente distribuida en el ambiente, en los animales que rodean los pollos parrilleros y en

los reproductores pesados, lo cual indica que la contaminación de los pollos es muy probable. Hasta el momento no se ha señalado un factor único como el responsable de la transmisión de *C. jejuni*, lo cual sugiere que la contaminación con *Campylobacter* se debe a múltiples fuentes (Kazwala et al., 1990; Gregory et al., 1997; Stern et al., 2001; Ramabu et al., 2004).

Se ha comprobado que el mantener buenas prácticas de bioseguridad en la finca ayuda a reducir la contaminación con *Campylobacter*. En un estudio realizado en el Reino Unido (UK) se modificaron las medidas de bioseguridad para intentar reducir la contaminación con *Campylobacter*. Se desinfectaron las granjas antes de ser repobladas y los empleados mantuvieron protocolos estándar de higiene antes de entrar a éstas. A los 42 días, la contaminación con *Campylobacter* se había reducido en un 50 % (Gibbens, 2001). Esto indica que si se mantiene un buen manejo en la finca puede reducirse la cantidad de pollos que llegan al mercado contaminados con *Campylobacter*.

2. Transmisión Vertical

Diversos estudios indican que *Campylobacter jejuni* no puede transmitirse verticalmente y que la ruta de transmisión es solo horizontal. Una de las razones para rechazar la transmisión vertical de *Campylobacter* es que se ha tenido poco éxito aislando la bacteria de huevos de gallinas infectadas. Acuff et al., (1982) no encontraron la bacteria en huevos de pavo ni en pavitos recién nacidos, producto de pavos infectados, en dos plantas de incubación de Texas. Los

autores concluyen que los huevos fecundos y los pavos recién nacidos no contienen a *Campylobacter jejuni* en estado viable.

Baker et al., (1986) analizaron 23 granjas de Estados Unidos para detectar la presencia de *Campylobacter* en huevos para incubar y no pudieron aislar la bacteria de ninguna de las muestras analizadas. Los huevos que presentaban contaminación con materia fecal en el cascarón no presentaron resultados positivos para la presencia de *C. jejuni*. Los autores sugieren que la ausencia de la bacteria en los huevos indica que ésta muere al ser expuesta a temperatura ambiente y a un ambiente seco.

Sahin et al., (2003) analizaron el interior y la superficie de 1000 huevos de una planta de incubación, todos con menos de 10 días de incubación. Como no pudieron aislar la bacteria, los autores concluyen que la transmisión vertical de *Campylobacter* no juega un rol importante en la introducción de la bacteria en las parvadas de pollos.

Herman et al., (2003) analizaron siete plantas de incubación en busca de *C. jejuni*. Se tomaron muestras de las incubadoras, las válvulas de agua, los intestinos y los sacos vitelinos de pollitos muertos o enfermos. No se pudo aislar la bacteria en ninguna de las muestras tomadas de la planta de incubación, por lo que se concluye que las primeras etapas en la producción de los pollos parrilleros son de poca importancia para la contaminación con *C. jejuni*.

Una explicación para la poca recuperación de *C. jejuni* es la susceptibilidad de esta bacteria al oxígeno y a la deshidratación. La baja recuperación en los muestreos realizados en la superficie de los huevos puede

deberse a muerte celular o a la incapacidad de resucitar las células dañadas que se encuentran en un estado viable no cultivable (Cox et al., 2001). Para obtener una mayor sensibilidad en la detección de *Campylobacter*, Hiett et al., (2002) desarrollaron un ensayo de Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR) que consiste de un *primer* específico para la región conservada del gen *flaA* de *Campylobacter*. A través de técnicas de cultivo tradicionales los autores no pudieron detectar la presencia de *Campylobacter* en la superficie de huevos, pero utilizando el ensayo de PCR detectaron a *Campylobacter* en 28 de 40 muestras, aunque no pudieron determinar si el organismo estaba vivo o muerto.

Aunque muchos estudios indican que la transmisión vertical de *C. jejuni* no ocurre, o que es un evento inusual, algunos estudios indican que la bacteria sí puede transmitirse a través de esta ruta. Doyle (1984) aisló a *Campylobacter jejuni* en la corteza externa de 2 cascarones de huevo (de 226 analizados) cuyos parentales excretaban activamente a *Campylobacter*. Sahin et al., (2003) inocularon gallinas con *C. jejuni* y analizaron los huevos recién puestos para corroborar si la bacteria podía transmitirse verticalmente. Los autores encontraron 3 de 65 (4.6%) muestras estaban contaminadas con *C. jejuni*.

Para establecer una relación entre el *Campylobacter* aislado de las parvadas de reproductores pesados y el aislado de la progenie Cox et al., (2002a) compararon en ambas parvadas el patrón de los ribotipos *PstI* y analizaron regiones del DNA de una corta región variable (SVR) del gen *flaA*. Los autores aislaron a *Campylobacter* de los reproductores pesados y de sus respectivas parvadas de pollos parrilleros. Se encontró que las muestras

aisladas tenían igual patrón de ribotipos *PstI* y que las secuencias de DNA *flaA* SVR de *Campylobacter* fueron idénticas, lo cual sugiere que las muestras tenían igual origen clonal. Los investigadores concluyen que las gallinas reproductoras pueden transmitir verticalmente *Campylobacter* a su progenie.

Maruyama y Katsube (1990) analizaron segmentos del tracto reproductor de codornices japonesas infectadas experimentalmente con *C. jejuni*. También analizaron la superficie y el interior de los huevos puestos por las codornices. Los autores aislaron la bacteria del oviducto, útero, magno, istmo, folículos maduros y el hígado. Encontraron contaminación con *C. jejuni* en la superficie externa de 13 de 47 huevos analizados; encontraron también la bacteria en dos huevos que no presentaron contaminación en su exterior, lo cual indica que la contaminación de ambos sucedió en el tracto reproductor de las codornices.

Buhr et al., (2002) intentaron encontrar a *Campylobacter* en segmentos del tracto reproductor de gallinas reproductoras que estaban naturalmente infectadas con *Campylobacter*. Se encontró a *Campylobacter* en las muestras tomadas de la cloaca, vagina, útero, istmo y magno. Según los autores, la presencia de *Campylobacter* en el tracto reproductor de las gallinas sugiere que las bacterias pueden transmitirse verticalmente.

Cox et al., (2002b) encontraron veintiséis de 275 muestras de semen de gallos reproductores contaminados con *Campylobacter*, lo que indica que el semen puede ser un vehículo transmisor de *Campylobacter* para la gallina reproductora y para los huevos.

Shane et al., (1986) prepararon una suspensión de heces contaminada con *C. jejuni* e inocularon huevos con cascarones intactos. Se encontró en la superficie interna de 3 de 70 huevos analizados y en 1 de 70 contenidos de huevos homogenizados. Clark y Bueschkens (1985) expusieron huevos a una suspensión infectada con *C. jejuni* y los sometieron a un diferencial de temperatura para imitar la ovoposición. Se encontró que hasta un 11 % de los pollitos nacidos contenían *C. jejuni* en el tracto gastrointestinal, con igual serotipo que el inoculado.

Sahin et al., (2003) no detectaron penetración de los huevos al exponerlos a una suspensión fecal contaminada con *C. jejuni* y al someterlos a un diferencial de temperatura. Allen y Griffiths (2001) tampoco pudieron detectar la penetración de los cascarones de huevos al exponerlos a un caldo de cultivo inoculado con *C. jejuni*; solo observaron penetración en 2 de 48 huevos que ellos agrietaron. En estos huevos hubo una alta contaminación alrededor de las grietas y la bacteria pudo contaminar las membranas internas del cascarón. Los autores sugieren que la transmisión vertical podría suceder en las gallinas viejas que producen huevos con cascarones más delgados y pueden agrietarse más fácilmente.

Maruyama et al., (1995) encontraron que *C. jejuni* podía sobrevivir hasta 86 días a 4 °C al ser inyectada en la yema de huevos. En un estudio similar, Sahin et al., (2003) encontraron que al inocular a *C. jejuni* en diferentes componentes del huevo la bacteria pudo sobrevivir en la yema durante 14 días y su viabilidad se redujo a partir de ese día. En este estudio se encontró que

Campylobacter solo podía sobrevivir menos de 8 días en la clara de los huevos y que no presentaba crecimiento en la cámara de aire. Estos estudios sugieren que *Campylobacter* puede mantenerse viable dentro del huevo por suficiente tiempo para llevar a cabo la transmisión vertical.

Objetivos

Los objetivos de este estudio son:

1. Evaluar una planta de incubación de pollos en Puerto Rico para detectar la presencia de *Campylobacter jejuni*.
2. Evaluar la superficie de las incubadoras y el contenedor de transporte de huevos, como posibles fuentes de contaminación horizontal.
3. Analizar el interior y el exterior de huevos fecundos para determinar si *C. jejuni* puede transmitirse verticalmente.
4. Determinar la susceptibilidad a antibióticos de las muestras de *C. jejuni* aisladas para generar un perfil de las mismas.

Materiales y Métodos

A. Recolección de las muestras

Los huevos usados fueron producidos en el estado de Georgia, colocados en cajas de cartón con capacidad de 360 huevos y transportados a Puerto Rico en furgones refrigerados (18 °C). Un camión de transporte condujo los huevos desde el puerto hasta la planta de incubación de la empresa productora de pollos parrilleros.

Se tomaron muestras de cinco lotes entregados por el camión. Se seleccionaron aleatoriamente 96 huevos de cada lote, donde un lote representa las cajas provenientes del rancho donde se encuentran los reproductores. Cada caja de huevos contenía 12 cartones con una capacidad de 30 huevos por cartón.

De cada lote se tomaron muestras de 24 cajas. En cada caja, se tomaron 4 huevos cada cuatro cartones. Con 16 huevos de los seleccionados para cada lote se crearon 6 muestras compuestas por lote. Cada muestra compuesta se colocó en una bolsa plástica estéril sellada. Todas las muestras compuestas de un mismo lote se colocaron en una nevera plástica a con dos compresas frías para mantener la temperatura entre 16-20 °C. Cada lote se colocó en neveras diferentes para evitar la contaminación entre éstas durante el transporte al laboratorio. A los 5 lotes se les realizó este análisis en duplicado, en semanas diferentes.

Se tomaron muestras del piso en el área de carga del camión de transporte de huevos y de las incubadoras, para detectar la presencia de *Campylobacter jejuni* y para realizar un contaje aeróbico en platos (APC). Para tomar las muestras del área de las incubadoras y del camión de transporte de los huevos se utilizaron moldes estériles con un área de 10 cm x 10 cm (Figura 1).

Todas las muestras obtenidas fueron transportadas y analizadas en menos de 24 horas.



Figura 1. Recolección de muestras en la incubadora de huevos.

B. Procesamiento de las muestras

A cada muestra compuesta de huevos se le añadieron 200 ml de una solución estéril de Agua Peptona (BPW), para tomar muestras de la superficie de los huevos. Las muestras se colocaron durante 5 minutos en una incubadora con agitación a 25 RPM. Se transfirieron 25 ml del agua peptona a una bolsa estéril y se añadió 100 ml del caldo de enriquecimiento Bolton (Buhr et al.,

2002). Cada 500 ml del medio de enriquecimiento Bolton (Oxoid CM0983) contenía 50 ml de sangre de caballo lisada (Oxoid SR0048) y un frasco del suplemento selectivo Bolton (Oxoid SR0183). Para maximizar la recuperación de *Campylobacter*, las muestras se enriquecieron y se incubaron durante 4 h a 37 °C y luego a 42 °C durante 20 h. En total, las muestras se enriquecieron durante 24 h bajo condiciones microaerofílicas (5 % O₂, 10 % CO₂ y 85 % N₂), producidas por el CappyPack Plus gas-generatin envelope (BBL Microbiology System, Cockeysville, MD, USA). La incubación se llevó a cabo en una incubadora con agitación de 175 RPM bajo condiciones microaerofílicas (Manual Bacteriológico Analítico-BAM).

Los huevos se limpiaron cuidadosamente con una solución desinfectante de etanol al 70%. Los cascarones se abrieron y se echó el contenido de los mismos en un envase estéril para formar una muestra compuesta. Se revolviaron los huevos manualmente, utilizando instrumentos estériles hasta obtener una solución homogénea. Se tomaron 25 ml de la muestra compuesta homogenizada y se añadieron a 200 ml del caldo de enriquecimiento Bolton. Las muestras se incubaron según previamente descrito (Sahin et al, 2003).

C. Análisis Bacteriológico

Para aislar a *Campylobacter jejuni* de las muestras se insertó un asa de inoculación dos veces en el caldo de enriquecimiento Bolton inoculado y se realizó un estriado en las placas de agar Campi-Cefex (Figura 2). Las placas se incubaron durante 48 h a 42 °C, bajo condiciones microaerofílicas (5% O₂, 10%

CO₂ y 85% N₂) y en duplicado (Buhr et al., 2002). Dos colonias de cada placa se transfirieron a placas de agar sangre (*Blood agar base 2*, suplementada con sangre de oveja desfibrinada 5.0 %) para maximizar el crecimiento de la colonia. Las placas se incubaron durante 48 h a 42 °C (BioMérieux). Se realizó una tinción gram a las colonias de cada placa para observar su morfología y luego se llevó a cabo la prueba de oxidasa y catalasa.

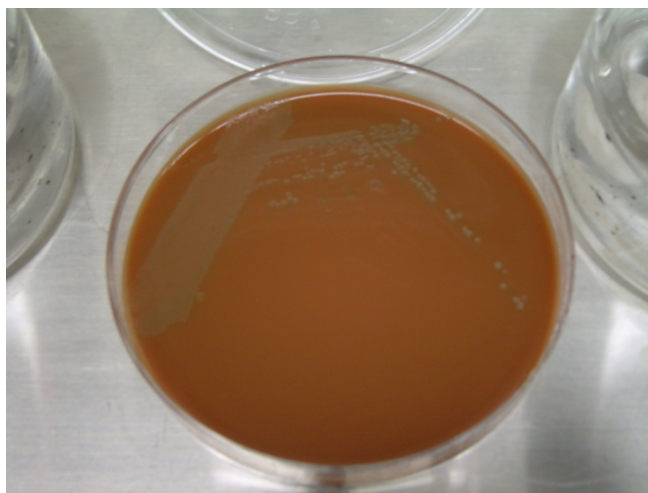


Figura 2. Ejemplo de las placas de Campy-Cefex positivas a *Campylobacter*.

Se confirmó la identidad de *Campylobacter jejuni* mediante el sistema de identificación API Campy (BioMérieux) en duplicado (Figura 3). Para identificar las bacterias se siguieron los procedimientos establecidos por el fabricante para la prueba API Campy (BioMérieux).



Figura 3. Ejemplo de la prueba API Campy

Se realizó un APC de las muestras tomadas del piso del camión, las incubadoras y de la superficie e interior de las muestras compuestas de huevo. Se llevaron a cabo diluciones en serie de las muestras y se cultivaron en el agar de contaje en platos (*aerobic plate count*) a 32 °C durante 48 h.

D. Prueba de Susceptibilidad a Antibióticos

A los cultivos positivos se les realizó una prueba de susceptibilidad a antibióticos para generar datos para futuras investigaciones y para proveer información útil para aplicaciones epidemiológicas y médicas.

Las placas positivas se subcultivaron en placas de agar sangre. A partir de cada cultivo fresco se tomó una muestra de las colonias utilizando un hisopo estéril y se inoculó una botella de solución salina estéril (NaCl 0.85 %) para crear una suspensión 0.5 McFarland. A partir de la suspensión inoculada con *Campylobacter jejuni* se saturó un hisopo y se estrió en placas de agar Mueller

Hinton, suplementada con 5 % de sangre de cordero desfibrinada, en duplicado. Se utilizaron los discos Becton Dickinson (BBL) con los siguientes antibióticos: ácido nalidíxico (30 µg), ampicilina (10 µg), amoxicilin - ácido clavulánico (30 µg), cefalotina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10µg), nitrofuratoína (300 µg), penicilina G (10 µg), tetraciclina (30 µg) y trimetoprim + sulfametoxazol (25 µg). Los antibióticos se seleccionaron a partir de estudios previos que evaluaron la resistencia y susceptibilidad de las cepas de *C. jejuni* (Aarestrup et al., 1997; Alterkruse et al., 1999, Aydin et al., 2001; Engberg et al., 2001; Oza et al., 2003; Pedersen y Wedderkopp, 2003; Trachoo, 2003).

Las placas de Mueller Hinton se incubaron a 37 °C durante 24 h. Se midió el diámetro (mm) de la zona de inhibición con un micrómetro.

Debido a la falta de suficientes estudios acerca de los puntos de cierre (*Breakpoint*) que caracterizan la resistencia o susceptibilidad de *Campylobacter* spp. hacia cada antibiótico, se eligieron los puntos de cierre del Comité Nacional de Estándares Clínicos de Laboratorio (NCCLS) para la familia *Enterobacteriaceae* y *Staphylococcus* spp. Estas bacterias son las más afines a *Campylobacter* spp. (Luber et al., 2003).

E. Modelo Estadístico

En este trabajo se realizó un muestreo por conglomerados con una distribución binomial.

$$y \sim \text{Bin} (C, \pi_2)$$

Para determinar la incidencia de *Campylobacter jejuni* en los lotes de huevos se utilizaron las siguientes variables:

π_1 = Incidencia

C = Cantidad de muestras compuestas

N = Cantidad de huevos en las muestras compuestas

π_2 = P (Detectar muestras compuestas infectadas entre las muestras compuestas analizadas)

Se utilizaron las siguientes ecuaciones para determinar la incidencia de *C. jejuni*, estimada a partir de las muestras compuestas de huevos, con un intervalo de confianza del 95%, (Macchiavelli, R., Com. per.):

$$\hat{\pi}_1 = 1 - (1 - \hat{\pi}_2)^{1/N}$$

$$\left[\ln (1 - \hat{\pi}_1) \pm 1.96 \sqrt{\frac{\hat{\pi}_2}{N^2 C}} \right] \times 100$$

Resultados y Discusión

Detección de *Campylobacter* en los huevos de una planta de incubación de una compañía de pollos parrilleros de Puerto Rico:

Utilizando técnicas tradicionales de cultivo se encontró a *Campylobacter jejuni* en tres de los cinco lotes de huevos provenientes de granjas del estado de Georgia (Tabla 1). La bacteria sólo se detectó en el interior de los huevos provenientes de los lotes 118 y 153. En el lote 138 sólo se encontró *C. jejuni* en el exterior de los huevos.

Tabla 1. Detección de *Campylobacter jejuni* en los lotes de huevos, incubadoras y el camión de transporte de huevos

Muestras	No. de muestras positivas / No. de muestras
Lote 101 (superficie)	0/12
Lote 118 (superficie)	0/12
Lote 138 (superficie)	3/12
Lote 153 (superficie)	0/12
Lote 173 (superficie)	0/12
Lote 101 (interior)	0/12
Lote 118 (interior)	1/12
Lote 138 (interior)	0/12
Lote 153 (interior)	1/12
Lote 173 (interior)	0/12
Incubadoras	1/15
Camión	0/15

La incidencia de *C. jejuni* en los lotes 118 y 153 fue menor de 1.6 % en el interior de los huevos, mientras que el lote 138 presentó una incidencia menor de 3.5 % en la superficie de los huevos.

Otros investigadores han encontrado poca contaminación en la superficie externa de los huevos (Doyle, 1984; Maruyama y Katsube, 1990; Sahin et al., 2003). Doyle (1984) sólo pudo aislar a *C. jejuni* en la superficie de dos de 226 huevos puestos por gallinas infectadas. Sahin et al., (2003) encontraron 3 de 65 muestras positivas en huevos de gallinas infectadas. La poca recuperación de *C. jejuni* en la superficie externa de los huevos se ha atribuido a la poca capacidad que posee *Campylobacter* para tolerar el oxígeno, la deshidratación y el estrés ambiental (Maruyama y Katsube, 1990, Cox et al., 2001).

En el lote 138, contaminado en el cascarón, se observaron restos de camada sobre los huevos. Este lote fue el único que no utilizaba un sistema automatizado para recoger los huevos. La presencia de camada sobre los huevos pudo facilitar la detección de *C. jejuni* en el cascarón, pues otros estudios han asociado camada contaminada con infección con *Campylobacter* (Montrose et al., 1984; Jones et al., 1991).

Cox et al., (2001) demostraron la susceptibilidad de *Campylobacter* a la deshidratación al inocular la bacteria en la superficie de los huevos. Los autores indican que la probabilidad de detectar a este microorganismo por medio de técnicas de cultivo disminuye con el tiempo, pues las muestras pierden humedad y la bacteria es más difícil de cultivar.

Hiett et al., (2002) atribuyen la baja detección de *Campylobacter* en la superficie de los huevos a la poca sensibilidad que presentan las técnicas de cultivo tradicionales y a la posibilidad de que la bacteria se encuentre en un estado viable no cultivable. Los autores demostraron que la técnica de PCR es

más sensible pues detectaron 28 cascarones contaminados que fueron reportados negativos mediante técnicas tradicionales de cultivo.

Debido a que antes de su llegada a las incubadoras los huevos permanecen muchos días a baja temperatura, es posible que la bacteria entre en un estado viable no cultivable o que dichas condiciones las maten, lo que pudo afectar la recuperación del microorganismo (Talibart et al., 2000; Cox et al., 2001; Hiett et al., 2002).

La detección de *Campylobacter jejuni* sólo en el interior de los huevos también fue reportada por Maruyama y Katsube (1990), quienes en un estudio de inoculación detectaron a *C. jejuni* sólo en dos de 54 huevos de codornices. En los huevos contaminados en el interior no se aisló a *Campylobacter* de la superficie.

Una explicación para la baja recuperación de *C. jejuni* en el interior del huevo es la capacidad limitada de *C. jejuni* para penetrar el cascarón (Clark y Bueschkens, 1985; Shane et al., 1986; Allen y Griffiths, 2001) y para sobrevivir en algunos compartimientos del huevo, como la cámara de aire y la clara (Maruyama et al., 1995; Sahin et al., 2003). La baja sobrevivencia de *Campylobacter* en la cámara de aire puede deberse a la sensibilidad de la bacteria al oxígeno ambiental. En la clara, *Campylobacter* puede ser afectada por el pH alto y por la presencia de compuestos bactericidas, tales como lisozimas y conalbúmina (Mayes y Takeballi, 1983; Maruyama et al., 1995; Sahin et al., 2003).

Maruyama et al., (1995) encontraron que *C. jejuni* puede sobrevivir hasta 86 días a 4 °C al ser inyectada en la yema de huevos. Sin embargo, Sahin et al., (2003) informaron que este microorganismo sólo puede vivir hasta 14 días en la yema.

Los huevos analizados en este estudio permanecieron 9 días a 18 °C durante su transportación desde Estados Unidos hasta Puerto Rico. Es posible que las bacterias aisladas en el interior de los huevos se encontraran en la yema, de los huevos infectados, porque es el único compartimiento donde *Campylobacter* puede sobrevivir por un periodo prolongado (Maruyama et al., 1995; Sahin et al., 2003). *Campylobacter* puede infectar el tracto reproductor de las gallinas, la contaminación de la yema puede suceder antes de la deposición de la clara, las membranas internas y el cascarón (Maruyama y Katsube, 1990; Buhr et al., 2002).

No se detectó a *C. jejuni* en ninguna de las muestras tomadas del contenedor de transporte de los huevos. Las cajas donde se almacenan los huevos se mantienen cerradas durante el transporte, lo que presenta una barrera física que probablemente no permite la dispersión de las bacterias a través de aerosoles contaminados. Como no se encontró a *Campylobacter* en el contenedor de transporte pero sí en la superficie de un lote de huevos, parece que la contaminación sucedió a través de las parvadas de reproductores pesados o por medio de manejo en la finca.

Se encontró una muestra positiva en el área de las incubadoras. En el cuarto de incubación se mantiene una temperatura de 37.5 °C y una humedad

relativa 80–83 %, lo que permitiría el crecimiento de *C. jejuni*. Sin embargo este ambiente podría ser hostil para el microorganismo porque se mantiene un flujo constante de aire y no hay una fuente de alimento que le provea nutrientes. Además, cada cuarto de incubación es barrido diariamente para retirar huevos rotos que caen de las bandejas donde se incuban y se desinfecta el piso con un desinfectante de amplio espectro que contiene compuestos de cuaternario de amonio, aldehído, alcohol y derivados de terpenos. Este compuesto se aplica mensualmente por aire para desinfectar cada cuarto de incubación.

Contaje aeróbico en platos

Se realizó un contaje aeróbico en platos para determinar la cantidad de bacterias aeróbicas presentes en la superficie y en el interior de los huevos. La superficie del cascarón no es un ambiente estéril porque al momento de la postura pasa a través de la cloaca, donde se unen el tracto reproductor y el intestino (Mayes y Takeballi, 1983).

El grado de contaminación de los huevos varió entre los lotes analizados, lo cual es de esperarse porque el manejo y las medidas de bioseguridad que se toman en cada finca de reproductores pesados pueden variar. El lote 173 presentó el número mayor de bacterias por mililitro en la superficie de los huevos: 1.78×10^5 ufc/ml. Sin embargo, este lote de huevos no presentó contaminación con *Campylobacter*. Los lotes 101, 138 y 153 presentaron

magnitudes en el APC de 10^4 ufc/ml y el lote 118 presentó la menor contaminación en la superficie de los cascarones.

Algunos de los microorganismos que podrían encontrarse en la superficie de los huevos analizados son *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, *Serratia*, *Bacillus*, *Proteus* y *Klebsiella*. Esta contaminación puede deberse al contacto del huevo con suciedad en los alrededores o al paso del huevo por la cloaca (Mayes y Takeballi, 1983).

No se observó crecimiento bacteriano en las muestras tomadas del interior de los huevos. Esto puede deberse a que los huevos poseen mecanismos para evitar la contaminación. El cascarón es una barrera física contra la penetración bacteriana. Si ocurre la contaminación, el crecimiento bacteriano se reduce debido a la viscosidad de las proteínas del huevo y las propiedades bactericidas de las lisozimas y la conalbumina presentes en la clara (Mayes y Takeballi, 1983). Aunque se ha encontrado que bacterias como *Salmonella* spp. pueden colonizar el huevo por contaminación trans-ovárica o penetrando el cascarón (Mayes y Takeballi, 1983), esto aparentemente no ocurrió en los huevos analizados.

Tabla 2. Contaje aeróbico en platos (APC)

Muestra	Promedio de cantidad de bacterias aeróbicas (CFU/ml)
Lote 101 (interior)	0
Lote 118 (interior)	0
Lote 138 (interior)	0
Lote 153 (interior)	0
Lote 173 (interior)	0
Lote 101 (superficie)	2.35×10^4
Lote 118 (superficie)	6.76×10^3
Lote 138 (superficie)	2.35×10^4
Lote 153 (superficie)	3.72×10^4
Lote 173 (superficie)	1.78×10^5
Incubadoras	1.13×10^5
Camión	5.30×10^7

Caracterización de los organismos aislados a través de su susceptibilidad a antibióticos:

Todas las muestras fueron 100 % susceptibles a amoxicilín/ácido clavulánico (30µg), ciprofloxacina (5µg), cloranfenicol (30µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg) y sulfametoxazol + trimetoprim (25µg). Las bacterias presentaron 80 % de susceptibilidad a nitrofurantonina (300µg) y 20 % de susceptibilidad intermedia, lo cual indica que no hay certeza de si son susceptibles o resistentes. Se observó 100 % de resistencia a penicilina G (10µg) y a cefalotina (30µg). Las muestras presentaron resistencia en un 60 % para ampicilina (10µg) y de 20 % a tetraciclina (30µg) y al ácido nalidíxico (30 µg).

Al igual que en este estudio Aydin et al., (2001) encontraron que las cepas de *Campylobacter jejuni* aisladas de gansos domésticos eran 100 % susceptibles al ácido nalidíxico, eritromicina, gentamicina, amoxicillin + ácido clavulánico y cloranfenicol. Estas cepas también eran 100 % resistentes a penicilina G y a cefalotina, y 25 % resistentes a tetraciclina. En este estudio no reveló resistencia a sulfametoxazol + trimetoprim, aunque Aydin et al., (2001) encontraron un 8.4 % de resistencia hacia este antibiótico.

Van Looveren et al., (2001) encontraron que las cepas de *C. jejuni* aisladas de pollos parrilleros obtenidos de un matadero en Bélgica presentaron resistencia en 6.3 % para eritromicina, 24.6 % para ampicilina, 44.2 % para ácido nalidíxico, 44.2 % para ciprofloxacina y 34.4 % para tetraciclina.

En Irlanda se evaluó la susceptibilidad de *C. jejuni* a antibióticos utilizados en pollos parrilleros (Fallon et al, 2003) y se obtuvo resistencia en 35.9 % a la ampicilina, lo cual es más bajo de la resistencia encontrada en este estudio. En Pakistán se realizó un análisis de susceptibilidad a antibióticos a las cepas de *C. jejuni* aislado de niños que presentaban síntomas de diarrea y disentería (Ali et al, 2003) y se encontró un 88.9 % de resistencia hacia ampicilina en las cepas aisladas. Una explicación para la alta resistencia de *C. jejuni* hacia la ampicilina es que esta bacteria produce la enzima β -lactamasa, que puede hidrolizar el anillo de β -lactam que poseen algunos antibióticos, como la penicilina, la ampicilina y la cefalotina (Lachance et al, 1991). Por esta razón se están utilizando inhibidores de β -lactamasas, como el ácido clavulánico que tiene un efecto sinérgico con antibióticos como penicilina, amoxicilin o ampicilin para

lograr una mejor acción antibacteriana Neu y Fu (1978); estos autores indican que dichas combinaciones son efectivas contra bacterias productoras de β -lactamasas como *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Shigella sonnei*.

Varios investigadores han reportado, como sucedió en este estudio, que *C. jejuni* es totalmente susceptible a antibióticos como gentamicina y cloranfenicol (Aydin et al., 2001; Van Looveren, 2001; Stern et al., 2004). Esta investigación no encontró resistencia a ciprofloxacina y sólo se encontró un 20 % resistencia al ácido nalidíxico, pero varios investigadores han reportado que con el pasar de los años *Campylobacter* se ha tornado resistente a las quinolonas (Smith et al, 1999; Gaudreau y Gilbert, 2003; Lubber, 2003).

Conclusión

Los datos obtenidos en este estudio sugieren que *Campylobacter jejuni* puede de transmitirse verticalmente pero que ésta no es su principal forma de transmisión. La baja incidencia de *C. jejuni* en la superficie e interior de los huevos sugiere que este microorganismo se transmite principalmente por vía horizontal.

El no detectar a *C. jejuni* en la superficie de los huevos no garantiza que el interior de éstos esté libre de este patógeno. Para controlar la contaminación vertical de *Campylobacter jejuni* se deben realizar medidas de intervención en las granjas de los reproductores pesados para prevenir que se contaminen los huevos.

El transporte de los huevos en el camión y la exposición de éstos al ambiente interno del área de las incubadoras no parecen jugar un papel importante en la contaminación horizontal de los huevos. Se deben mantener buenas prácticas de limpieza y desinfección para no permitir que estas áreas se conviertan en fuentes de contaminación para los huevos.

Los resultados de la prueba de susceptibilidad a antibióticos sugieren que las cepas aisladas aún no han desarrollado resistencia a los antibióticos que regularmente se utilizan para tratar la campilobacteriosis, como la eritromicina y la ciprofloxacina. Los antibióticos deben usarse juiciosamente para reducir la probabilidad de que *C. jejuni* desarrolle resistencia en el futuro.

Recomendaciones

Aunque que los resultados sugieren que la principal ruta de transmisión de *Campylobacter jejuni* es horizontal, cabe la posibilidad de que parte de la contaminación de los pollos suceda por transmisión vertical.

Técnicas como el PCR pueden proveer información más precisa acerca del grado de contaminación que tienen los huevos recibidos desde Estados Unidos. Estas técnicas detectan DNA por lo que los resultados no se ven afectados si la bacteria está en un estado viable no cultivable, lo cual las hace mucho más precisas que las técnicas de cultivo tradicionales. Se debe repetir este estudio utilizando PCR para establecer que la transmisión vertical no es la principal ruta de transmisión de *C. jejuni*, porque la técnica de cultivo utilizada en este estudio podría subestimar la verdadera incidencia de *Campylobacter*.

Hay que analizar más muestras de *C. jejuni* para obtener una idea más clara del patrón de susceptibilidad a antibióticos de las cepas de esta bacteria que llegan a la Isla. La cantidad limitada de muestras positivas analizadas puede estimar incorrectamente el verdadero patrón de susceptibilidad a antibióticos de *Campylobacter*.

Deben usarse buenas prácticas de manejo y bioseguridad en la finca para reducir la cantidad de pollos que llegan al mercado contaminados con *C. jejuni*. De esta manera podría reducirse el número de casos anuales de campilobacteriosis.

Literatura Citada

- Acuff, G.R., C. Vanderzant, F.A. Gardner y F.A. Golan. 1982. Examination of turkey eggs, poults and brooder facilities for *Campylobacter jejuni*. Journal of Food Protection. 45: 1279-1281.
- Ali, A.M., A.H. Qureshi, S. Rafi, I.A. Khan y S. Hussain. 2003. Antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* in Rawalpindi and Islambad – A preliminary study. Pakistan Journal Medical Science. 19(4): 272-276.
- Allen, K.J. y M.W. Griffiths. 2001. Use of luminescent *Campylobacter jejuni* ATCC33291 to assess eggshell colonization and penetration in fresh and retail eggs. Journal of Food Protection: 2058-2062.
- Alterkruse S.F., N.J. Stern, P.I. Fields y D.L. Swerdlow. 1999. *Campylobacter jejuni*-An emerging foodborne pathogen. Emerging Infectious Diseases. 5:28-34.
- Aydin, F., H.I. Atabay y M. Akan. 2001. The isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* from domestic geese (*Anser anser*). Journal of Applied Microbiology. 90: 637-642.
- Baker, R.C., M.C.C. Paredes y R.A. Qureshi. 1986. Prevalence of *Campylobacter jejuni* in eggs and poultry meat in New York State. Poultry Science. 66:1766-1770.
- Black, R.E., M.M. Levine, M.L. Clements, T.P. Hughes y M.J. Blaser. 1988. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. Journal of Infectious Diseases. 157: 472-479.
- Blaser, M.J. 1997. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. The Journal of Infectious Diseases. 176 (Supplement 2): S103-S105.
- Bryan, F.L. y M.P. Doyle. 1995. Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* on raw poultry. Journal of Food Protection. 58: 326-344.
- Buhr, R.J., N.A. Cox, N.J. Stern, M.T. Musgrove, J.L. Wilson y K.L. Hiatt. 2002. Recovery of *Campylobacter* from segments of the reproductive tract of broiler breeder hens. Avian Diseases. 46: 919-924.

- Center for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Campylobacter* enteritis associated with cross- contamination of food – Oklahoma 1996. Morbidity and Mortality Weekly Report. 47(7): 129-131.
- Center for Food Safety and Applied Nutrition. U.S. Food and Drug Administration. 1998. Bacteriological Analytical Manual (BAM). 8th edition. Revision A. AOAC International. Division of Microbiology, Gaithersburg, MD.
- Clark, A.C. y D.H. Bueschkens. 1985. Laboratory infection of chicken eggs with *Campylobacter jejuni* by using temperature or pressure differentials. Applied and Environmental Microbiology. 49(6): 1467-1471.
- Clark, C.G., L. Price, R. Ahmed, D.L. Woodward, P.L. Melito, F.G. Rodgers, F. Jamieson, B. Ciebin, A. Li y A. Ellis. 2003. Characterization of waterborne outbreak-associated *Campylobacter jejuni*, Walkerton, Ontario. Emerging Infectious Diseases. 9 (10) 1232-1240.
- Cox, N.A., M.E. Berrang, N.J. Stern y M.T. Musgrove. 2001. Difficulty in recovering inoculated *Campylobacter jejuni* from dry poultry-associated samples. Journal of Food Protection. 64: 252-254.
- Cox, N.A., N.J. Stern, Hiatt, K.L., y Berrang, M. E. 2002a. Identification of a new source of *Campylobacter* contamination in poultry: transmission from breeder hens to broiler chickens. Avian Diseases. 46: 535-541.
- Cox, N.A., N.J. Stern, J.L. Wilson, M.T. Musgrove, R.J. Buhr y K.L. Hiatt. 2002b. Isolation of *Campylobacter* from semen samples of commercial broiler breeder rooster. Avian Diseases. 46: 717-720.
- Craven, S.E., N.J. Stern, E. Line, J.S. Bailey, N.A. Cox y P. Fedorka-Cray. 2000. Determination of the incidence of *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, and *Clostridium perfringens* in wild birds near broiler chicken houses by sampling intestinal droppings. Avian Diseases. 44: 715-720.
- Departamento de Agricultura de Puerto Rico. 2003. Oficina de Estadísticas agrícolas. Consumo de Pollo en Puerto Rico (2003-2004).
- Departamento de Salud de Puerto Rico. 2003. División de Epidemiología. Enfermedades transmisibles de notificación obligatoria (1999-2003).
- Doyle, M.P. 1984. Association of *Campylobacter jejuni* with laying hens and eggs. Applied and Environmental Microbiology. 47(3): 533-536.

- Endtz, H.P., G.J. Rujs, B.W. van Klingeren, W.H. Jansen, T. van der Reyden y R.P. Mouton. 1991. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 27: 199-208.
- Engberg, J., F.M. Aarestrup, D.E. Taylor, P.Gerner-Smidt, I. Nachamkins. 2001. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerging Infectious Diseases*. 7 (1): 24-34.
- Fallon R, O'Sullivan N, Maher M, Carroll C. 2003. Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from broiler chickens isolated at an Irish poultry processing plant. *Letters in Applied Microbiology*. 36 (5): 277-81.
- Gaudreau, G. y H. Gilbert. 2003. Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* strains isolated from humans in 1998 to 2001 in Montreal, Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47(6): 2027-2029.
- Gibbens, J.C., S.J.S. Pascoe, S.J. Evans, R.H. Davies y A.R. Sayers. 2001. A trial of biosecurity as a means to control *Campylobacter* infection of broiler chickens. *Preventive Veterinary Medicine*. 48: 85-99.
- Gregory, E., H. Barnhart, D.W. Dreesen, N.J. Stern y J.L. Corn. 1997. Epidemiological study of *Campylobacter* spp. in broilers: source, time of colonization, and prevalence. *Avian Diseases*. 41: 890-898.
- Griffiths, P.L. y R.W.A. Park. 1990. *Campylobacters* associated with human diarrhoeal disease. *Journal of Applied Bacteriology*. 69: 281-301.
- Hald, B., H. Skovgard, D.D. Bang, K. Pedersen, J. Dybdahl, J.B. Jespersen and M. Madsen. 2004. Flies and *Campylobacter* infection of broiler flocks. *Emerging Infectious Diseases*. 10(8): 1490-1492.
- Herman, L., M. Heynrickx, K. Grijspeerdt, D. Vandekerchove, I. Rollier y L. DeZutter. 2003. Routes for *Campylobacter* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiology and Infection*. 000: 1-12.
- Hiett, K., N.A. Cox y N.J. Stern. 2002. Direct polymerase chain reaction detection of *Campylobacter* spp. in poultry hatchery samples. *Avian Diseases*. 46: 219-223.

- Jones, F.T., R.C. Axtell, D.V. Rives, S.E. Scheideler, F.R. Tarver, R.L. Walker y M.J. Wineland. 1990. A survey of *Campylobacter jejuni* contamination in modern broiler production and processing system. *Journal of Food Protection*. 54: 259-262.
- Kazwala, R.R., J.D. Collins, J. Hannan, R.A.P. Crinion, H. O'Mahony. 1990. Factors responsible for the introduction and spread of *Campylobacter jejuni* infection in commercial poultry production. *Veterinary Record*. 126: 305-306.
- Ketley, J.M. 1997. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology*. 143: 5-21.
- Lachance, N., C. Gaudreau, F. Lamothe y L.A. Lariviere. 1991. Role of the β -lactamase of *Campylobacter jejuni* in resistance to β -lactam agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 35 (5): 813-818.
- Lehner, A., C. Schneck, G. Feierl, P. Pless, A. Deutz, E. Brandl y M. Wagner. 2000. Epidemiologic application of pulsed-field gel electrophoresis to an outbreak of *Campylobacter jejuni* in Austrian youth centre. *Epidemiology and Infection*. 125: 13-16.
- Luber, P., J. Wagner, H. Hahn y E. Bartelt. 2003. Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated in 1991 and 2001-2002 from poultry and humans in Berlin, Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47(12): 3825-3830.
- van Looveren, M., G. Daule, L. de Zutter, J.M. Dimont, C. Lammens, M. Wijdooghe, P. Vandamme, M. Jouret, M. Cornelis y H. Goossens. 2001. Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* strains isolated from food animals in Belgium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48: 235-240.
- Maruyama, S. y Y. Katsube. 1990. Isolation of *Campylobacter jejuni* from the eggs and organs in experimentally infected laying Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). *Japanese Journal of Veterinary Science*. 52(3): 671-674.
- Maruyama, S., Y. Morita y Y. Katsube. 1995. Invasion and viability of *Campylobacter jejuni* in experimentally contaminated Japanese quails' eggs. *Journal of Veterinary Medical Science*. 57(3): 587-590.
- Mayes, F.J. y M.A. Takeballi. 1983. Microbial contamination of the hen's egg. *Journal of Food Protection*. 46: 1092-1098.

- Melby, K.K., J.G. Svendby, T. Eggebo, L.A. Holmen, B.M. Andersen, L. Lind, E. Sjogren y B. Kaijser. 2000. Outbreak of *Campylobacter* infection in subarctic community. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 19: 542-544.
- Montrose, M.S., S.M. Shane y K.S. Harrington. 1984. Role of litter in the transmission of *Campylobacter jejuni*. *Avian Diseases*. 29(2): 392-399.
- Nawaz, M.S., S.A. Khan, A.A. Kahn, R. Nayak, R. Steele, D. Paine and R. Jones. 2003. Molecular characterization of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* spp. Isolated from poultry. *Poultry Science*. 82: 251-258.
- Neu, H.C. y K.P. Fu. 1978. Clavulanic acid, a novel inhibitor of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 14 (5): 650-655.
- Oza, A.N., J.P. McKenna, S.W.J. McDowell, F.D. Menzies y D. Neill. 2003. Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* spp. isolated from broiler chickens in Northern Ireland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52: 220-223.
- Park, S.F. 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. 74: 177-188.
- Pasternack, M.S. 2002. Impact and management of *Campylobacter* in human medicine –US perspective. *International Journal of Infectious Diseases*. 6: 337-343.
- Pearson, A.D., M.H. Greenwood, R.K.A. Feltham, T.D. Healing, J. Donaldson, D.M. Jones y R.R. Colwell. 1996. Microbial ecology of *Campylobacter jejuni* in United Kingdom chicken supply chain: intermittent common source, vertical transmission, and amplification by flock propagation. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (12): 4614-4620.
- Pedersen, K. y A. Wedderkopp. 2003. Resistance to quinolones in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Danish broilers at farm level. *Journal of Applied Microbiology*. 94: 111-119.
- Picher, H.E.T., G. Dirdl, K. Stickler y D. Wolf. 1987. Clinical efficacy of ciprofloxacin compared with placebo in bacterial diarrhea. *American Journal of Medicine*. 82(Suppl. 4A): 329-332.
- Ramabu, S.S., N.S. Boxall, P. Madie y S.G. Fenwick. 2004. Some potential sources for transmission of *Campylobacter jejuni* to broiler chickens. *Letters in Applied Microbiology*. 39: 252-256.

- Sahin, O., P. Kobalka y Q. Zhan. 2003. Detection and survival of *Campylobacter* in chicken eggs. *Journal of Applied Microbiology*. 95: 1070-1079.
- Shane, S.M., M.S. Montrose y K.S. Harrington. 1984. Transmission of *Campylobacter jejuni* by the housefly (*Musca domestica*). *Avian Diseases*. 29(2): 384-391.
- Shane, S.M., D.H. Gifford y Yogasundram. 1986. *Campylobacter jejuni* contamination of eggs. *Veterinary Research Communications*. 10: 487-492.
- Smith, K.E., J.M. Besser, C.W. Hedberg, F.T. Leano, J.B. Bender, J.H. Wicklund, B.P. Johnson, K.A. Moore y M.T. Osterholm. 1999. Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infection in Minnesota, 1992-1998. *The New England Journal of Medicine*. 340: 1525-1532.
- Stern, N.J., P. Fedorka-Cray, J.S. Bailey, N.A. Cox, S.E. Craven, K.L. Hiett, M.T. Musgrove, S. Ladely, D. Cosby y G.C. Mead. 2001. Distribution of *Campylobacter* spp. in selected U.S. poultry production and processing operations. *Journal of Food Protection*. 64: 1705-1710.
- Stern, N.J., V.A. Bannov, E.A. Svetoch, E.V. Mitsevich, N.V. Volozhantsev, V.V. Gusev y V.V. Perelygin. 2004. Distribution and characterization of *Campylobacter* spp. from Russian poultry. *Journal of Food Protection*. 67: 239-245.
- Tauxe, R.V. 1992. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: *Campylobacter jejuni: current status and future trends*, 1st ed. I. Nachamkin, M.J. Blaser y L.S. Thompson, eds. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 9-19.
- Trachoo, N. 2003. *Campylobacter jejuni*: An emerging pathogen. *Journal of Science and Technology*. 25: 141-157.
- Van Looveren, M., G. Daule, L. de Zutter, J.M. Dimont, C. Lammens, M. Wijdooghe, P. Vandamme, M. Jouret. 2001. Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* strains isolated from food animals in Belgium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48: 235-240.