

Prevalencia de *Campylobacter* y puntos críticos en mataderos avícolas del este de España.

S. SEVILLA-NAVARRO^{1*}, V. CORTÉS¹, C. GARCÍA¹, C. MARÍN² y P. CATALÁ-GREGORI^{1,2}

¹Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana. Calle Nules, 16. 12539. Alquerías del Niño Perdido, Castellón, España. ²Universidad Cardenal Herrera-CEU, Calle Tirant Lo Blanch, 7. 46115. Alfara del Patriarca, Valencia, España

*e-mail: s.sevilla@cecav.es

Campylobacter es la principal causa de infecciones alimentarias en la Unión Europea. Los últimos datos publicados por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria recogen que ha sido responsable de 246.307 casos en humana en el 2016. La principal fuente de infección en la carne de pollo poco cocinada, así como una contaminación cruzada por falta de higiene. Sin embargo y a pesar de la repercusión en salud pública de la bacteria, hasta este último año, su control no estaba sujeto a ningún reglamento. Es por ello que, a partir del 1 de enero de 2018 entró en vigor el Reglamento 2017/1495 que modifica al 2073/2005 y se comenzó a controlar a nivel de matadero. En este contexto, el objetivo del estudio fue establecer la prevalencia de *Campylobacter* en mataderos avícolas, así como determinar los puntos críticos en los cuales la bacteria estaba más presente. Para ello se estudiaron 12 mataderos localizados en el este de España durante los meses de junio, julio y agosto de 2017. Se tomaron 5 muestras de piel de cuello de 5 puntos a lo largo de la cadena de matanza de las aves sacrificadas, al principio y al final de la jornada. El total de muestras analizadas en este estudio fue de 1725. Todas ellas se analizaron siguiendo la ISO/TS 10272-2:2006 para la detección y recuento de *Campylobacter* bajo un sistema acreditado según la ISO 17025. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el porcentaje del total de muestras que superaron el límite de 1000 UFC/g fue del 23.7% (n=409). Por lo que respecta al cumplimiento de la normativa por parte de los mataderos, el 83.3% de los mataderos cumplieron con el criterio establecido para el periodo del 2018-2020. Existen diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes etapas de la cadena de matanza analizadas, siendo tras la evisceración donde se vio una mayor prevalencia (5.8%) y tras la refrigeración la que menor prevalencia (3.8%). En cuanto a los puntos críticos, no se han visto diferencias estadísticamente significativas en el recuento de *Campylobacter* entre el primer y el último lote, pero sí que se han visto diferencias estadísticamente significativas en función de la edad de los animales, el tiempo de enfriado y el número de aves sacrificadas, entre otras. Estudios previos ponen de manifiesto que reducir en 2logs la prevalencia de *Campylobacter* a nivel de campo podría reducir 30 veces la campilobacteriosis humana. Por ello, siguiendo estrategias de control a nivel de campo que reduzcan la prevalencia de *Campylobacter* en los pollos, junto con la optimización de factores técnicos y de higiene a nivel de matadero, se podrían reducir los recuentos de *Campylobacter* en la piel de cuello de pollo y por tanto reducir las infecciones en humana.

Palabras clave: *Campylobacter*; matadero; puntos críticos.

Campylobacter is the main pathogen involved on gastrointestinal diseases in Europe. Last data published by the European Union, showed a total of 246.307 cases of campilobacteriosis in 2016. The main source of infection is undercooked poultry meat and a cross contamination due to a lack of hygiene. Despite the importance of this bacterium on food safety no regulation has controlled it since the early year. For this reason, the 1st of January a new Regulation entered into force for *Campylobacter* control at slaughterhouse. In this context, the aim of this study was to assessed *Campylobacter* prevalence and stablished the critical points on poultry slaughterhouse from Easter Spain. For this reason, 12 slaughterhouses were sampled during 3 consecutive months. A

total of 1725 samples from 5 different points from the slaughtering line were collected. All samples were analysed according to the ISO/TS 10272-2:2006, for *Campylobacter* enumeration. The results obtained from this study showed the percentage of samples that overcome the criteria of 1000 CFU/g was 23.7% (n=409). Regarding compliance with Regulations (CE) 2017/1495 the 83.3% of the slaughterhouses met the criteria established by the regulation for the period between 2018-2020. Significant differences were found between the different stages of the slaughter line, after evisceration was the most prevalent (5,8%) and after cooling the lowest one (3.8%). Regarding critical points, no statistically significant differences has been in the *Campylobacter* counts between the first and the last batch, but there have been statistically significant differences depending on the age of the animals, the time of cooling, the number of birds slaughtered, among others. Previous studies shown that reducing 2 logs of *Campylobacter* prevalence at field level human campylobacteriosis could be reduce 30 times more. Therefore, following control strategies at the field level, together with the optimization of technical and hygiene factors at the slaughterhouse, *Campylobacter* counts in chicken neck skin could be reduced and therefore human's infections too.

Key words: *Campylobacter*, slaughterhouse, critical points.

Introducción

Campylobacter es la principal causa de toxiinfecciones alimentarias en la Unión Europea. Los últimos datos publicados por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria recogen que ha sido responsable de 246.307 casos de infecciones en humana en el 2016, incrementándose en un 6.1% si lo comparamos con los resultados obtenidos en el 2015. Es la responsable de la campilobacteriosis, enfermedad zoonótica transmitida principalmente por el consumo de alimentos de origen animal, como es la carne pollo. Se trata de una bacteria con baja mortalidad (0,03%) pero una alta morbilidad. Las principales especies causantes de esta enfermedad son *C. jejuni* (80-90%), seguido por *C. coli* y *C. lari*. Desde el 2005 es la zoonosis alimentaria más frecuente en el hombre en países desarrollados, aumentando en los últimos años (EFSA, 2017; EFSA, 2015).

Muchos autores son los que han estudiado la prevalencia y epidemiología de la bacteria a nivel de campo, obteniendo una prevalencia casi de 95,2% en pollos al final de su etapa de engorde (Ingresa-Capaccioni et al., 2016). Otros, sin embargo, han reportado canales con ausencia de *Campylobacter* en granja, pero que, sin embargo, han dado resultado de presencia en matadero, sugiriendo una contaminación cruzada en las instalaciones del matadero (Guerin et al., 2010; Kudirkienė et al., 2011). Debido a la falta de conocimiento de la epidemiología de la bacteria, se han implantado diferentes medidas de bioseguridad, estrategias nutricionales complementarias, o estudios inmunológicos, para intentar controlar su prevalencia a nivel de campo, sin embargo, ninguna de estas medidas ha podido controlar la bacteria hasta niveles aceptables (EFSA, 2015).

A pesar de la repercusión en salud pública de la bacteria, hasta este último año, su control no estaba sujeto a ningún reglamento. Es por ello que, a partir del 1 de enero de 2018 entró en vigor el Reglamento 2017/1495 que modifica al 2073/2005 y se comenzó a controlar a nivel de matadero. *Campylobacter* se encuentra presente durante toda la cadena de sacrificio, sin embargo, la presencia de la bacteria es mayor durante las etapas desplumado y eviscerado y menor durante el lavado y la refrigeración (Rejab et al., 2012).

Existen varios estudios que abordan la evaluación de *Campylobacter* mediante la investigación de su presencia o ausencia, tanto en granja como en matadero. Sin embargo, pocos estudios se han centrado en el recuento de esta bacteria en las canales en los mataderos avícolas. En este contexto, el objetivo del estudio fue establecer la prevalencia de *Campylobacter* en mataderos avícolas, así como determinar los puntos críticos en los cuales la bacteria estaba más presente.

Material y métodos

Toma de muestras

Se estudiaron 12 mataderos localizados en el este de España durante los meses de junio, julio y agosto de 2017. Se analizaron 2 lotes diferentes de la cadena de sacrificio (el primero y el último) de los cuales, se tomaron 5 muestras de piel de cuello de 5 puntos a lo largo de la cadena de matanza (Tabla 1). El total de muestras analizadas en este estudio fue de 1725.

Tabla 1. N° de muestras tomadas por matadero y sesión de muestreo tras las fases del faenado (escaldado, desplumado, eviscerado, lavado y refrigeración) y la posición del lote (primero y último).

Punto de muestreo	N.º de muestras	
	Primero	Último
Escaldado	5	5
Desplumado	5	5
Eviscerado	5	5
Lavado	5	5
Refrigeración	5	5
Total muestras analizadas	25	25

Recuento de *Campylobacter*

Todas las muestras se analizaron siguiendo la Norma ISO/TS ISO/TS 10272-2:2006 para la detección y recuento de *Campylobacter* bajo un sistema acreditado según la ISO 17025. Para ello, se pesaron 25 g de piel de cuello y se realizó una dilución 1:10 con BPW (BPW, Scharlau, Barcelona, Spain). A continuación, se homogeneizó en Stomacher a 230 rpm durante 120 s. De esta solución se tomó 1 mL y se realizaron diluciones seriadas. A continuación, 0.1 mL de las diluciones se sembraron en medio mCCDA y se incubaron durante 44h±4h a 41,5°C en condiciones de microaerofilia (5% O₂, 85% N₂, 10% CO₂), (CampyGen, Oxoid). Para la confirmación de placas con colonias sospechosas de *Campylobacter* tras la incubación, se procedió a realizar la prueba de movilidad con el microscopio de campo oscuro, pruebas bioquímicas (oxidasa, catalasa) y siembras a diferentes temperaturas y atmósferas en agar Columbia sangre (Oxoid, Barcelona, Spain).

Puntos críticos

Para realizar el análisis de los puntos críticos, cada sesión de muestreo iba acompañada de un cuestionario donde se recogían varios datos, entre los que destacamos los que se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Variables estudiadas para establecer los puntos críticos asociados a la presencia de *Campylobacter* en matadero.

Variable
Edad de los animales (d)
Tiempo de refrigeración (min)
Tamaño del lote (animales)
Temperatura de escaldado (°C)
Distancia granja-matadero (km)
Posición lote

d: días; min: minutos; °C: grados centígrados; km: kilómetros

Análisis estadístico

El análisis de las muestras se realizó con el paquete estadístico SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA, 2002). Para establecer las diferencias estadísticas entre las diferentes etapas en matadero (escaldado, desplumado, eviscerado, lavado y refrigerado) se empleó ANOVA de un factor para el estudio de las muestras que superaban el límite de 1000 UFC/g. En cuanto al análisis de los puntos críticos se empleó un modelo lineal generalizado (GLM) con una distribución binomial. Los datos se establecieron como 1 si la presencia de *Campylobacter* en las muestras estaban por encima de 1000 UFC/g y 0 si la cantidad de bacteria estaba por debajo del límite establecido. Se consideró diferencia significativa entre las muestras cuando la $p \leq 0.05$.

Resultados y Discusión.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el porcentaje de muestras que superó el límite de 1000UFC/g de *Campylobacter* fue del 23.7% (n=409). Por lo que respecta al cumplimiento de la normativa por parte de los mataderos, el 83.3% de los mataderos cumplieron con el criterio establecido para el periodo del 2018-2020. Existen diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes etapas de la cadena de matanza analizadas, siendo tras la evisceración donde se observó una mayor prevalencia (5.8%) y tras la refrigeración una menor prevalencia (3.8%) (Figura 1).

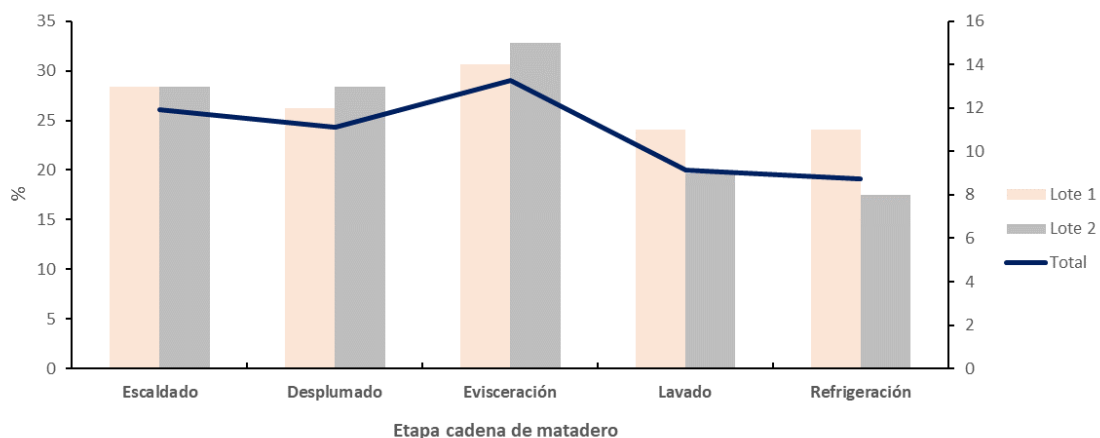


Figura 1. Porcentaje de muestras que superan el recuento de 1000UFC/g por lote en el total del estudio.

En cuanto a puntos críticos, no se han visto diferencias estadísticamente significativas en el recuento de *Campylobacter* entre el primer y el último lote y la distancia entre el matadero y la granja, pero sí que se han visto diferencias estadísticamente significativas en función de la edad de los animales, el tiempo de enfriado, el número de aves sacrificadas por lote y la temperatura de escaldado (Tabla 3).

Tabla 3. Variables donde se observan diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros estudiados.

Variable	Parámetro	n	P-value
Edad de los animales (d)	40-51	276	<0.0001
Tiempo de refrigeración (min)	101-150	550	<0.0001
Tamaño del lote (animales)	4501-6500	211	<0.0001
Temperatura de escaldado (°C)	51.9-54	277	<0.0001

d: días; min: minutos; ° C: grados centígrados; n: número de muestras

El contenido de *Campylobacter* en el paquete gastrointestinal puede llegar a ser de 10^8 ufc/g, por lo que un mal faenado que conlleve a su rotura puede favorecer la contaminación de las canales en matadero (El-Aziz, 2013; Lawes et al., 2012). Guerin et al. (2010) establecieron como puntos críticos de la contaminación de las canales el desplumado y la evisceración, reportaron que tras la etapa de desplumado la prevalencia de *Campylobacter* se incrementaba un 62% y que tras la etapa de evisceración un 15%. También la presencia de *Campylobacter* se ha visto asociada al transporte, la edad de sacrificio, la estación del año, tipo de producción y el tamaño del lote (Lawes et al., 2012).

En este estudio, hemos observado mayor prevalencia de *Campylobacter* en animales que fueron sacrificados a una edad de 40-51 días. Resultados similares fueron obtenidos por Lawes et al. (2012) los cuales mostrando una mayor prevalencia de la bacteria en lotes sacrificados a más de 46 días. Por lo que respecta al tiempo de refrigeración, en este estudio hemos observado mayor número de muestras que superaba el límite refrigerando la canal durante 1-2 h. En un estudio, observaron una prevalencia del 0% en canales de porcino que habían sido refrigeradas durante toda la noche (Pearce et al., 2003), por lo que aumentando los tiempos de refrigeración se podría disminuir la cantidad de bacteria en las canales. Por lo que respecta al tamaño del lote, a diferencia de nuestros resultados, Näther et al. (2009) y Barrios et al. (2006) reportaron una mayor presencia de *Campylobacter* en lotes de 15.000 y 10.000 animales, respectivamente, sin embargo, en este estudio los lotes de mayor tamaño fueron de 8.000 animales. En cuanto a la temperatura de escaldado el rango de 51.9-54°C incrementó el número de muestras que superaban el límite establecido, quizá porque *Campylobacter* es una bacteria termófila y su multiplicación es óptima a altas temperaturas (van Putten et al., 2009). En cuanto a la distancia de la granja a matadero no se vieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a muestras que superaran el límite de 1000 UFC/g, pero sí entre las medias de los recuentos, obteniendo mayores recuentos a menores distancias. Hay estudios que demuestran que tiempos más largos de transporte, puede favorecer la menor presencia de *Campylobacter* al final de la matanza. Esto se puede deber a que, a mayor tiempo en el camión de transporte, los animales excretan mayor cantidad de heces y el paquete gastrointestinal llega vacío a los mataderos (Lawes et al., 2012). Por lo que respecta a la posición del lote (primero y último), no hay diferencias estadísticamente significativas, esto puede sugerir que la presencia de *Campylobacter* en las canales se encuentre asociado al propio origen del lote. Aunque la entrada de animales positivos podría suponer la contaminación del matadero, se ha descrito que únicamente se contaminan los dos lotes siguientes a un lote positivo (Sasaki et al., 2013). Sin embargo, en este estudio no se ha tenido en cuenta el estatus microbiológico del lote anterior al último lote.

Estudios previos ponen de manifiesto que reducir en 2_{\log} s la prevalencia de *Campylobacter* a nivel de campo podría reducir 30 veces la campilobacteriosis humana. Por ello, siguiendo estrategias de control a nivel de campo que reduzcan la prevalencia de *Campylobacter* en los pollos, junto con la optimización de factores técnicos y de higiene a nivel de matadero, se podrían reducir los recuentos de *Campylobacter* en la piel de cuello de pollo y por tanto reducir las infecciones en humana.

Bibliografía

- BARRIOS, P.R., REIERSEN, J., LOWMAN, R., BISAILLON, J.R., MICHEL, P., FRIDRIKSDOTTIR, V., GUNNARSSON, E., STERN, N. et al.** 2006. Risk factors for *Campylobacter* spp. colonization in broiler flocks in Iceland. *Prev Vet Med.* **74**: 264–278.
- EFSA (European Food Safety Authority).** 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 2015;**13**(12):4329.
- EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control).** 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal* 2017;**15**(12):5077, 228 pp.
- EL-AZIZ, D. M.** 2013. Detection of *Salmonella typhimurium* in retail chicken meat and chicken giblets. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **3**(9):678-681.
- NÄTHER, G., ALTER, T., MARTIN, A. and ELLERBROEK, L.** 2009. Analysis of risk factors for *Campylobacter* species infection in broiler flocks. *Poult. Sci.* **88**:1299–1305.
- GUERIN, M. T., SIR, C., SARGEANT, J.M., WADDELL, L., O'CONNOR, A. M., WILLS, R. W., BAILEY, R. H. and J. A. BYRD.** 2010. The change in prevalence of *Campylobacter* on chicken carcasses during processing: a systematic review *Poult. Sci.* **89**:1070-1084.
- INGRESA-CAPACCIONI, S., JIMÉNEZ-TRIGOS, E., MARCO-JIMÉNEZ, F., CATALÁ, P., VEGA, S. and MARIN C.** 2016. *Campylobacter* epidemiology from breeders to their progeny in Eastern Spain. *Poult. Sci.* **95**:676-83.
- ISO 10272-2:2017** Preview Microbiology of the food chain – Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. -- Part 2: Colony-count technique.
- KUDIRKIENĖ, E., BUNEVIČIENĖ, J., BRØNSTED, L., INGMER, H., OLSEN, J. E. and MALAKAUSKAS, M.** 2011. Evidence of broiler meat contamination with post-disinfection strains of *Campylobacter jejuni* from slaughterhouse. *Int. J. Food. Microbiology.* **145**:116-20.
- LAWES, J.R., VIDAL, A., CLIFTON-HADLEY, F.A., SAYERS, R., RODGERS, J., SNOW, L., EVANS, S.J. and POWELL, L.F.** 2012. Investigation of prevalence and risk factors for *Campylobacter* in broiler flocks and slaughter: results from a UK survey *Epidemiol Infect.* **140**:1725-1733.
- PEARCE, R.A., WALLACE, F.M., CALL, E., DUDLEY, R.L., OSER, A., YODER, L., SHERIDAN, J.J., and LUCHANSKY, J.B.** 2003. Prevalence of *Campylobacter* within a Swine Slaughter and Processing Facility. *J Food Prot.* **66**:1550–1556.
- REGLAMENTO (UE) 2017/1495 DE LA COMISIÓN** de 23 de agosto de 2017 que modifica el Reglamento (CE) n° 2073/2005 por lo que refiere a *Campylobacter* en las canales de pollo de engorde. L210/1-6.
- REJAB, S.B., ZESSIN, K.H., FRIES, R., and PATCHANEE, P.** 2012. *Campylobacter* in chicken carcasses and slaughterhouses in Malaysia. *Southeast Asian. J. Trop. Med. Public. Health.* **43**:96-104.
- VAN PUTTEN, J.P., VAN ALPHEN, L.B., WÖSTEN, M.M., and DE ZOETE, M.R.** 2009. Molecular mechanisms of *Campylobacter* infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **337**:197-229.

SASAKI, Y., MARUYAMA, N., ZOU, B., HARUNA, M., KUSUKAWA, M., MURAKAMI, M., ASAI, T., TSUJIYAMA, Y., and YAMADA, Y. 2013. *Campylobacter* Cross-Contamination of Chicken Products at an abattoir zoonoses and public health. *Zoonoses Public Health*. **60**:134-140.