



INFORME BREVE

Presencia de serotipos de *Campylobacter jejuni* O:19 en la cadena avícola Argentina

Eugenia Rossler^a, Estefanía M. Fuhr^b, Guillermina Lorenzón^b,
Analía Romero-Scharpen^a, Ayelén P. Berisvil^a, Jesica E. Blajman^a, Diego M. Astesana^a,
Jorge A. Zimmermann^a, Marcia L. Fusari^b, Marcelo L. Signorini^{b,c,*}, Lorena P. Soto^{a,b},
Laureano S. Frizzo^{a,b} y María V. Zbrun^{a,b}

^a Laboratorio de Análisis de Alimentos, Instituto de Ciencias Veterinarias (ICiVet Litoral), Universidad Nacional del Litoral, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (UNL/CONICET), Esperanza, Santa Fe, Argentina

^b Departamento de Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Esperanza, Santa Fe, Argentina

^c Consejo Nacional de investigaciones Científicas y Técnicas, Instituto de Tecnología Agrícola EEA Rafaela, Rafaela, Santa Fe, Argentina

Recibido el 30 de agosto de 2016; aceptado el 6 de diciembre de 2016

PALABRAS CLAVE

Campylobacter
termotolerante;
Serotipo O:19;
Guillain-Barré;
Pollos

Resumen Las especies termotolerantes de *Campylobacter* han tomado gran relevancia en los últimos años debido a que son los principales agentes zoonóticos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos. Adicionalmente, *Campylobacter jejuni* serotipo O:19 ha sido relacionado con el desarrollo del síndrome posdiarreico de Guillain-Barré. El objetivo de este trabajo fue determinar la proporción de cepas de *C. jejuni* que se corresponden con el serotipo O:19 dentro de las aisladas en diferentes etapas de 3 cadenas de producción de carne aviar en la provincia de Santa Fe.

Se observó que el 18% del total de cepas de *C. jejuni* recuperadas (10/55) pertenecían al serotipo O:19; estas se aislaron en 4 de las 5 etapas de producción de carne aviar elegidas a los fines de este estudio. Este hallazgo da cuenta de un riesgo importante para la salud pública de los consumidores y debería ser considerado en los estudios epidemiológicos de *Campylobacter*, para implementar en forma urgente medidas de control sobre este microorganismo.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: marcelo.signorini@gmail.com (M.L. Signorini).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.12.002>

0325-7541/© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Thermotolerant
Campylobacter;
O:19 serotype;
Guillain-Barre;
Poultry

Campylobacter jejuni O:19 serotype in Argentine poultry meat supply chain

Abstract Thermotolerant species of *Campylobacter* have been focus of attention in the last years because they are the major agent causing zoonotic foodborne diseases. In addition, *Campylobacter jejuni* O:19 serotype was associated with Guillain Barré syndrome. The aim of this study was to determine the proportion of *C. jejuni* O:19 serotype isolated at different stages of three poultry meat supply chain in Santa Fe, Argentina. The analysis showed that 18% of isolated *C. jejuni* belong to serotype O:19. It was also determined that the presence of these strains is given in almost all production stages. These results reflect a significant risk to public health of consumers. Epidemiological studies of *Campylobacter* should be considered to establish a risk manager policy.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Desde el punto de vista de la salud pública, las especies termotolerantes de *Campylobacter* han tomado gran importancia como patógenos zoonóticos causantes de infecciones entéricas en seres humanos (campilobacteriosis)^{1,3}. Las principales especies patogénicas dentro de este género son *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*¹⁴.

A nivel internacional, la incidencia de la campilobacteriosis humana ha ido en aumento hasta convertirse en la zoonosis de mayor relevancia. Tanto la Unión Europea como los Estados Unidos consideran a *Campylobacter* como el principal agente zoonótico transmitido por alimentos^{1,3}. En Argentina, los estudios acerca de estos patógenos son incipientes; sin embargo, también en nuestro país *Campylobacter* ha sido reportado como uno de los principales agentes zoonóticos de origen alimentario^{4,15}.

La transmisión de *C. jejuni* y *C. coli* al hombre se produce directamente por contacto de la persona con materia fecal de animales, o indirectamente, por el consumo de alimentos de origen animal (principalmente carne aviar) poco cocidos o por la contaminación cruzada con alimentos preparados listos para consumir¹⁴.

La mayoría de los casos de enteritis en humanos causados por *Campylobacter* termotolerantes son leves o autolimitados y no requieren terapia antimicrobiana. Sin embargo, sí se requiere un tratamiento con antibióticos para tratar las infecciones sistémicas por *Campylobacter* en pacientes inmunodeprimidos o en casos de infecciones crónicas⁷. Los agentes antimicrobianos más utilizados para el tratamiento de la campilobacteriosis humana son eritromicina, ciprofloxacina y tetraciclina^{7,14}. No obstante, en los últimos años se ha encontrado una elevada resistencia de *Campylobacter* a estos antimicrobianos, posiblemente debido a su uso en la producción primaria de alimentos y, lo que es más preocupante, a la aparición de cepas multirresistentes en las diferentes etapas de producción^{7,15}.

Además de ser agentes causales de gastroenteritis, las bacterias del género *Campylobacter*, principalmente *C. jejuni*, han sido asociadas al desarrollo de síndromes posdiarreicos graves, fundamentalmente al síndrome de Guillain-Barré (GBS). Este síndrome es un desorden autoinmune del sistema nervioso periférico caracterizado por una parálisis ascendente, debilidad progresiva y carencia de

reflejos, que puede derivar en un compromiso de la musculatura respiratoria y la muerte del paciente⁹.

La relación entre *C. jejuni* y GBS se debe a un mecanismo biológico que involucra un mimetismo molecular y una reacción cruzada de la respuesta inmunitaria. El ser humano genera anticuerpos frente a antígenos de tipo lipopolisacáridos de membrana de *C. jejuni*, los cuales exhiben reactividad cruzada con gangliósidos presentes en el tejido nervioso periférico, principalmente con el gangliósido GM1, asociado al nervio motor. Esta reacción genera una neuropatía axonal motora y provoca la parálisis ascendente⁹.

Por otra parte, el desarrollo de GBS está mayormente asociado a la infección previa con determinados serotipos de *C. jejuni*. Diferentes estudios en China, Japón y Estados Unidos han encontrado relación entre el serotipo O:19 y el GBS, mientras que en Sudáfrica se relacionó con el serotipo O:41^{5,9}.

Mediante el uso de herramientas de biología molecular es posible distinguir entre cepas de *C. jejuni* serotipo O:19 y no O:19; su diferencia reside en el extremo 3' del gen que codifica la subunidad B de la DNA girasa (*gyrB*)⁸.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de los serotipos O:19 y no O:19 de *C. jejuni* en aislamientos de pollos de engorde en la cadena cárnica aviar, para aportar elementos al estudio epidemiológico de este patógeno en Argentina.

Se trabajó con una colección de aislamientos de *C. jejuni* (n = 55) obtenidos durante el año 2012 a partir de muestras tomadas en diferentes puntos de la cadena de producción aviar (granja de reproductores, granja de engorde, frigorífico y punto de venta final). Los muestreos y los análisis microbiológicos fueron realizados en el Laboratorio de Análisis de Alimentos del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (Lab. AA., DSPV, FCV-UNL).

Se muestrearon 3 cadenas de producción de carne aviar presentes en la zona centro-sur santafesina. En cada una de ellas se tomaron muestras en diferentes puntos. En todos los puntos, los animales muestreados fueron elegidos al azar dentro del mismo lote. Inicialmente se muestrearon gallinas reproductoras mediante hisopados cloacales. El segundo punto muestreado fue en la etapa de engorde de

pollos nacidos de los huevos provenientes del lote de gallinas reproductoras muestreadas. El mismo lote de pollos fue muestreado en granja en 2 oportunidades, a los 7 días y a los 45 días de vida. Posteriormente, se identificó en el frigorífico el lote de animales muestreados con anterioridad en la etapa de granja y se tomaron muestras de lavados de canales. Por último, en el punto de venta final se tomaron muestras de lavados de carcasas de los productos distribuidos por el frigorífico.

El número de aislamientos obtenidos en cada etapa y los identificados como *C. jejuni* (aislamientos/*C. jejuni*) fueron los siguientes: gallinas reproductoras (28/13), pollos de 7 días (16/8), pollos de 45 días (39/17), canales en frigorífico (33/13) y canales en punto de venta (5/4).

El aislamiento de los microorganismos se realizó mediante el cultivo de las muestras en condiciones de microaerofilia (3-5% de O₂, 2-10% de CO₂, 85% N₂) a 42 °C, primero en caldo Bolton durante 24 h (Oxoid[®], Hampshire, Reino Unido)⁶ y luego en agar Skirrow durante 48 h (Oxoid[®])².

La confirmación presuntiva del género de los microorganismos se realizó mediante métodos fenotípicos: microscopia de contraste de fases y prueba de oxidasa y de catalasa. Posteriormente, se realizó la confirmación por técnicas de biología molecular mediante PCR-multiplex, la cual permitió la identificación de las cepas a nivel de género y especie¹². Las colonias así identificadas fueron conservadas a -80 °C en viales con medio crioprotector de caldo triptona de soya estéril suplementado con glicerol al 17 y 5% de suero equino inactivado¹¹.

Las 55 cepas conservadas a -80 °C se reactivaron en agar sangre Columbia base (Oxoid) suplementado con 5% de sangre equina hemolizada y se incubaron en condiciones de microaerofilia (3-5% de O₂, 2-10% de CO₂, 85% N₂) a 42 °C durante 48 h en jarras de anaerobiosis (Oxoid HP0011)². Para el control de calidad del crecimiento de las cepas se utilizó como control positivo la cepa de *C. jejuni* ATCC 33560.

Para la identificación de cepas de *C. jejuni* O:19 y no O:19 se realizó inicialmente una extracción de ADN genómico a partir de una suspensión de cultivo fresco mediante la utilización de un kit comercial (Wizard Promega[®], Wisconsin, Estados Unidos de América). Se cuantificó la concentración de ADN obtenido (ng/μl) utilizando un lector multimodal de placas (Biotek[®], Vermont, Estados Unidos de América) y se ajustó a una concentración de 20 ng/μl. Posteriormente, se realizaron 2 PCR por muestra utilizando dos pares de cebadores específicos; un par para identificar cepas de *C. jejuni* serotipo O:19 (*Forward* C3647: 5'-CAAGCTATACTGCCTTTG-3' y *Reverse* C3650: 5'-TCAAGATCTTTTAAAATT-3') y otro par para reconocer las cepas no O:19 (*Forward* C3647 y *Reverse* C3652: 5'-TCAAGATCTTTTAAAATC-3'), siguiendo la técnica descrita por Misawa et al.⁸.

Finalmente, para visualizar los productos amplificados se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Gel Red[®] (Genbiotech[®], Buenos Aires, Argentina), utilizando como buffer de corrida TBE 1X (tris/borato/EDTA) a 80V durante 45 min. En el gel de agarosa se sembraron el marcador de peso molecular (PB-L 100 pb Ladder, Embiotech[®], Buenos Aires, Argentina) y los productos de PCR. La visualización de fragmentos amplificados se realizó utilizando un transiluminador de luz UV (Labnet[®], Nueva Jersey, Estados Unidos de América).

El fragmento amplificado esperado era de 435 pb en los 2 casos, ya que la única diferencia está en un solo nucleótido en la secuencia del *primer reverse*. Como controles se utilizaron la cepa de *C. jejuni* ATCC 33560 y una cepa de *Escherichia coli* de la colección de nuestro laboratorio.

Para evaluar si existe asociación entre la frecuencia de aislamiento de cepas de *C. jejuni* pertenecientes al serotipo O:19 con el punto de muestreo dentro de la cadena cárnica aviar, se utilizó el test de la chi al cuadrado o test exacto de Fisher (dependiendo del número de observaciones), con un nivel de significación $p=0,05$.

El análisis de los serotipos reveló que 45 de las 55 cepas de *C. jejuni* que habían sido aisladas (82%) fueron no O:19 y las 10 restantes (18%) fueron serotipo O:19. La figura 1 muestra algunos ejemplos de los resultados de las PCR que permitieron discriminar entre cepas O:19 y cepas no O:19.

Se detectaron aislamientos de *C. jejuni* serotipo O:19 en todos los puntos de muestreo, excepto en el frigorífico. Fueron positivos al serotipo O:19 el 15% de los aislamientos de *C. jejuni* obtenidos en la etapa de gallinas reproductoras y el 13% de los aislamientos de pollos de 7 días, y tanto en pollos de 45 días como en el punto de venta final la proporción de cepas O:19 fue del 33% (respecto del total de aislamientos de cada etapa). No hubo asociación entre la etapa de producción y la presencia de *C. jejuni* serotipo O:19 ($p=0,186$).

Estos resultados demostraron que la proporción de cepas de *C. jejuni* serotipo O:19 en la cadena cárnica aviar es elevada, lo que da cuenta de un riesgo importante para la salud pública, ya que estas cepas podrían llegar al consumidor final a través de la carne de pollo o de otros alimentos relacionados mediante contaminación cruzada.

La presencia de cepas de *C. jejuni* serotipo O:19 en casi la totalidad de los puntos de muestreo puede deberse a la transmisión horizontal de las cepas. Se ha demostrado que *Campylobacter* puede difundirse y permanecer en las diferentes granjas y los diferentes ciclos productivos a través de diversos vectores o fómites, como la cama de crianza de pollos, así como a través del agua de bebida, del alimento o de los roedores y las aves silvestres que habitan en las granjas. Otra posibilidad es el ingreso o el mantenimiento de estos patógenos en las granjas a partir de otro tipo de vectores, como moscas o los cascarudos de la cama (*Alphitobius diaperinus*)¹⁰.

Por otro lado, no hubo aislamientos de *C. jejuni* serotipo O:19 en frigorífico; esto podría deberse a que el número de aislamientos obtenidos a partir de este punto de la cadena cárnica aviar no fue elevado ($n=13$). Sin embargo, no es posible descartar el riesgo de contaminación cruzada durante la faena de las aves. Cada granja supone variaciones en la prevalencia de *C. jejuni* y en los frigoríficos son faenados pollos provenientes de numerosas granjas, por lo que la presencia de esta bacteria suele ser mayor que en cualquier otra etapa de la cadena¹⁰. La existencia en los canales de los pollos de un número elevado de cepas de *C. jejuni*, de las cuales algunas son potencialmente desencadenantes del SGB, incrementa el riesgo de contaminación cruzada durante las diferentes etapas de la faena, lo que a su vez aumenta la proporción de carcasas contaminadas con el patógeno, con el consiguiente riesgo de exposición para el consumidor final¹³. La presencia de un número elevado de aislamientos de *C. jejuni* serotipo O:19, tanto en la etapa de

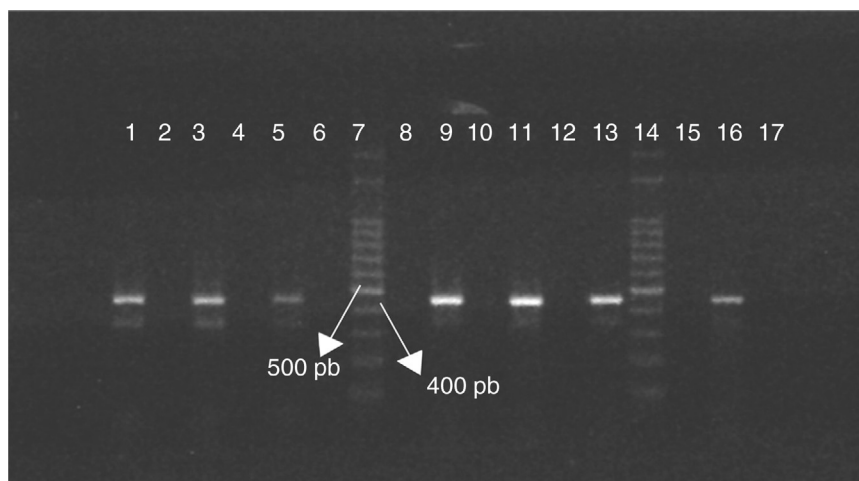


Figura 1 Diferenciación por PCR de cepas de *Campylobacter jejuni* O:19 y no O:19 utilizando primers específicos. Cepas O:19 líneas 1, 3 y 5, y cepas no O:19 líneas 9, 11 y 13. Cepa de referencia *C. jejuni* ATCC 33560 línea 16. Control negativo de reacción línea 17. Marcador de peso molecular línea 7 y 14.

pollos de 45 días como en la etapa de punto de venta final, refuerza esta idea.

A pesar de que existen estudios que respaldan la posible relación de *C. jejuni* serotipo O:19 con el SGB^{5,9}, la información existente no permite asegurar que un microorganismo de este serotipo provoque GBS. Es necesario entonces utilizar y combinar técnicas moleculares modernas con herramientas serológicas para un mejor entendimiento de esta patología. La realización de estudios epidemiológicos más complejos, que incorporen la tipificación de secuencias multilocus, en conjunto con los datos de campo recabados en hospitales y con estudios fenotípicos de este patógeno, permitirá comprender la relación entre el SGB y el microorganismo.

En este estudio fue evidente la presencia de cepas de *C. jejuni* O:19 potencialmente relacionadas con el desarrollo del SGB en la cadena de producción avícola, de modo que existe la posibilidad de que dichas cepas sean transmitidas a los seres humanos a través de alimentos de origen aviar. Esto constituye un riesgo importante para la salud de los consumidores, por lo que se debe destacar la necesidad de realizar estudios epidemiológicos completos de *Campylobacter*, que permitan implementar en forma urgente las medidas de control y prevención más oportunas, teniendo en cuenta las aves que son reconocidas como principales reservorios de este agente a nivel mundial^{1,3}.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Este estudio fue parte de un proyecto PICT financiado por la Agencia Nacional de Promoción científica y tecnológica. Laureano S. Frizzo, Lorena P. Soto, María V. Zbrun y Marcelo L. Signorini son investigadores miembros del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, Argentina). Jessica E. Blajman, Ayelén P. Berisvil, Analía Romero-Scharpen, Eugenia Rossler y Diego M. Astesana, Jorge A. Zimmermann son estudiantes de doctorado de CONICET.

Bibliografía

- Centers for Disease Control. Foodborne. Diseases active surveillance network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2014. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services.
- Corry J, Post D, Colin P, Laisney M. Culture media for the isolation of *Campylobacter*. *Progr Ind Microbiol*. 1995;34:129–62.
- European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA J*. 2015;13:3991.
- Fuentes L. Prevalencia y perfiles de sensibilidad en cepas de *Campylobacter* spp. aisladas de diarreas en Córdoba, Argentina. *Gastroenter*. 2010;12:2–5.
- Heikema A, Islam Z, Horst-Kreft D, Huizinga R, Jacobs B, Wagenaar J, Poly F, Guerry P, van Belkum A, Parker C, Endtz H. *Campylobacter jejuni* capsular genotypes are related to Guillain-Barré syndrome. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21, 852e, 1–9.
- Hutchinson D, Bolton F. Is enrichment culture necessary for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faeces? *J Clin Pathol*. 1983;36:1350–2.
- Máckiwi E, Korsak D, Rzewuska K, Tomczuk K, Rozynek E. Antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from food in Poland. *Food Control*. 2012;23:297–301.

8. Misawa N, Mishu Allos B, Blaser M. Differentiation of *Campylobacter jejuni* serotype O19 strains from non-O19 strains by PCR. *J Clin Microbiol.* 1998;36:3567–73.
9. Nyati K, Nyati R. Role of *Campylobacter jejuni* infection in the pathogenesis of Guillain-Barré syndrome: An update. 2013. *Bio-Med Res Int.* 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/852195>
10. Sahin O, Kassem I, Shen Z, Lin J, Rajashekara G, Zhang Q. *Campylobacter* in poultry: Ecology and potential interventions. *Avian Dis.* 2015;59:185–200.
11. Terzolo H, Lawson G, Angus K, Snodgrass D. Enteric *Campylobacter* infection in gnotobiotic calves and lambs. *Res Vet Sci.* 1987;43:72–7.
12. Vandamme P, van Doorn L, Rashid S, Quint W, Plas J, Chan V, On S. *Campylobacter hyoilei* Alderton et al. 1995 and *Campylobacter coli* Veron and Chatelain 1973 are subjective synonyms. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47:1055–60.
13. Whiley H, van den Akker B, Giglio S, Bentham R. The role of environmental reservoirs in human campylobacteriosis. *Int. J Env Res Public Health.* 2013;10:5886–907.
14. WHO. *Campylobacter*. Fact sheet, No. 255 [consultado 15 Abr 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>.
15. Zbrun M, Olivero C, Romero-Scharpen A, Rossler E, Soto L, Astesana D, Frizzo L. Antimicrobial resistance in thermotolerant *Campylobacter* isolated from different stages of the poultry meat supply chain in Argentina. *Food Control.* 2015; 57:136–41.