

## Evaluación del perfil de virulencia de *Campylobacter* termotolerantes aislados de granjas comerciales de pollos parrilleros

Rosler E<sup>1</sup>, Zimmermann J A<sup>1</sup>, Olivero C R<sup>1</sup>, Saluzzo M<sup>1</sup>, Frizzo L S<sup>1,2</sup>, Zbrun M V<sup>1,2</sup>, Sequeira G J<sup>2</sup>, Antoniazzi L<sup>1</sup>, Signorini M L<sup>2,3</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio Análisis de Alimentos, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (ICiVet Litoral-UNL/CONICET). <sup>2</sup>Departamento de Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (UNL). <sup>3</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Rafaela (CONICET-INTA).

*Campylobacter* termotolerante (CT), principalmente *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, es el principal agente zoonótico transmitido por alimentos causal de la campilobacteriosis humana. El tracto gastrointestinal del pollo es el principal reservorio de estos microorganismos. Durante el proceso de faena de los pollos, se produce la contaminación de la carne debido al método utilizado para la evisceración. Es así como *Campylobacter* se transmite al hombre a través del consumo de carne cruda, mal cocida o por contaminación cruzada de los alimentos<sup>3</sup>. Los mecanismos moleculares implicados en la infección de CT en pollos podrían ser útiles para conocer características epidemiológicas de la enfermedad<sup>1</sup>. Es así que se han descrito algunos genes cuya expresión estaría asociada con la virulencia de CT: *flaA*, *flhA*, *cadF* y *racR* (genes responsables de la adherencia y colonización de la mucosa intestinal)<sup>2,4</sup>, *virB11*, *ciaB*, *iam* (genes responsables de la invasión)<sup>2,4</sup>; *cdtA*, *cdtB* y *cdtC* (genes responsables de la producción de citotoxinas)<sup>2,4</sup>.

El objetivo de este trabajo fue analizar la presencia de genes asociados a la virulencia de CT aislados de diferentes fuentes en granjas comerciales de pollos parrilleros.

Para ello se trabajó con una colección de aislamientos de CT obtenidos en muestreos sucesivos en tres granjas comerciales de pollos parrilleros durante el año 2015 (*C. jejuni* n=80 y *C. coli* n=60). Los aislamientos fueron obtenidos a partir de muestras provenientes de: pollos parrilleros (*C. jejuni* n=53 y *C. coli* n=51), aves silvestres (*C. jejuni* n=20 y *C. coli* n=6), cascarudos (*C. jejuni* n=2 y *C. coli* n=2) y larvas (*C. jejuni* n=2) de la cama (*Alphitobius diaperinus*), moscas (*Musca domestica*) (*C. coli* n=1) y botas de los operarios de las granjas (*C. jejuni* n=3).

En todos los aislamientos se examinó la presencia de 10 genes relacionados con la virulencia de CT: *flaA*, *flhA*, *cadF*, *racR*, *virB11*, *ciaB*, *iam*, *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*. Para ello, en primer lugar, se realizó la extracción de ADN genómico a partir de una suspensión de cultivo fresco de cada aislamiento. Luego se realizó una reacción de PCR para determinar la presencia de cada gen utilizando secuencias de primers y condiciones de reacción descritas por varios autores: Konkel *et al.*, 1999 (*cadF*), Hickey *et al.*, 2011 (*cdtA*), Korsak *et al.*, 2004 (*iam*), Muller *et al.*, 2006 (*flhA*), and Bacon *et al.*, 2000 (*virB11*), Datta *et al.*, 2003 (*flaA*, *cdtB*, *cdtC*, *ciaB*, *racR*).

Los resultados demostraron que de los 10 genes analizados, *flaA*, *flhA*, fueron detectados en todos los aislamientos evaluados. El tercer gen más prevalente fue *cadF* (91%). Por otro lado, aproximadamente la mitad de los aislamientos fueron positivos para el cluster *cdt* (*cdtA*, *cdtB* and *cdtC*) (51%). Para *iam* y *racR* las prevalencias fueron del 48% y 46 % respectivamente, la prevalencia de *ciaB* fue de 32% y la de *virB11* 11%.

Teniendo en cuenta las especies de los aislamientos, para *C. jejuni* las prevalencias de los genes analizados fueron: 100% *flaA* y *flhA*, 93% *cadF*, 65% *cdt*, 64% *racR*, 54% *ciaB*, 29% *iam* y 9% *virB11*. Para *C. coli*, en cambio, las prevalencias fueron: 100% *flaA* y *flhA*, 90% *cadF*, 38% *cdt*, 35% *racR*, 8% *ciaB*, 82% *iam* y 17% *virB11*.

Si además se considera la información de la fuente de origen del aislamiento se pudo observar que los aislamientos de *C. jejuni* y *C. coli* provenientes de aves silvestres presentaron el mismo patrón de

genes que los aislamientos de la misma especie obtenidos en pollos. La prevalencia del resto de los genes fue muy variable entre las diferentes fuentes de aislamiento. Solo una cepa aislada, obtenida a partir de mosca fue positiva a todos los genes de virulencia analizados.

De los resultados obtenidos observamos que los genes relacionados a la expresión de adherencia y colonización de CT fueron encontrados con mayor frecuencia que el resto. La alta prevalencia de genes que codifican proteínas involucradas en la movilidad de CT indica el importante rol de los productos de estos genes en la virulencia de CT y revela una relación entre la movilidad y la virulencia<sup>2,4</sup>. El gen *cadF* tuvo una elevada prevalencia en aislamientos provenientes de pollos, lo que podría confirmar la importancia del producto de este gen en la colonización por CT del tracto gastrointestinal de estos animales<sup>2,4</sup>. Este estudio también mostró diferentes niveles de prevalencia de *racR*, gen que juega un rol en la colonización del ciego de los pollos por CT. Por otro lado más de la mitad de los aislamientos presentaron los tres genes del cluster *cdt* los cuales son necesarios para la expresión de la citotoxina activa.

Se pudieron observar también diferencias en la prevalencia de los genes *cdt*, *racR*, *ciaB*, *iam* según la especie del aislamiento. Esto podría demostrar diferencias genéticas que implican mecanismos distintos de colonización, adherencia y patogenicidad entre las especies de *Campylobacter* termotolerantes. Sumado a esto, el hecho de no encontrar diferencias en las prevalencias de los genes en ambas especies de *Campylobacter* termotolerantes aislados de distintas fuentes estaría indicando que la presencia de ciertos genes estaría relacionada con la especie del aislamiento y no de la fuente de origen.

La virulencia de las bacterias está condicionada por la expresión de genes de virulencia, por lo tanto, la presencia de estos genes determina la capacidad de los aislamientos de CT para adherirse e invadir las células<sup>2,4</sup>. Debe destacarse que la presencia de factores de virulencia particulares no es evidencia directa de la patogénesis. Sin embargo, sugiere fuertemente que pueden ser potencialmente capaces de producir la enfermedad<sup>2,4</sup>.

## Bibliografía

- 1- Datta, S., Niwa, H., & Itoh, K. (2003). Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. *Journal of medical microbiology*, 52(4), 345-348.
- 2- Josefsen, M. H., Bhunia, A. K., Engvall, E. O., Fachmann, M. S., & Hoorfar, J. (2015). Monitoring *Campylobacter* in the poultry production chain—From culture to genes and beyond. *Journal of microbiological methods*, 112, 118-125.
- 3- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P. A., & Teixeira, P. (2011). *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Frontiers in microbiology*, 2, 200.
- 4- Wiczorek K., Osek J. (2008). Identification of virulence genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates by PCR. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 52(1), 211-6.