

VII JORNADAS DE DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN – FCV-UNL

RESUMEN EXTENDIDO

EVALUACIÓN DEL PERFIL DE VIRULENCIA DE *Campylobacter* TERMOTOLERANTES AISLADOS DE GRANJAS COMERCIALES DE POLLOS PARRILLEROS

Rosler E¹, Zimmermann J A¹, Olivero C R¹, Saluzzo M¹, Frizzo LS^{1,2}, Zbrun M V^{1,2},
Sequeira G J², Antoniazzi L¹, Signorini M L^{2,3}.

¹Laboratorio Análisis de Alimentos, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (ICiVet-CONICET/UNL).

²Departamento de Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (UNL).

³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Rafaela (CONICET-INTA).

* Correspondencia: Rosler E. E-mail: eugrossler21@hotmail.com

Editado por: R. Sobrero, V. Matiller, C. Baravalle.

VIRULENCE PROFILE EVALUATION OF THERMOTOLERANT CAMPYLOBACTER ISOLATES FROM COMMERCIAL BROILER FARMS.

SUMMARY.

The aim of this work was to analyze the presence of genes associated with the virulence of thermotolerant *Campylobacter* (CT) isolated from different sources in commercial broiler farms. For this, we worked with a collection of CT isolates obtained from three commercial broiler farms during 2015. The presence of 10 genes related to CT virulence was examined with a PCR reaction. The results showed a prevalence of 100% for *flaA* and *flhA*; 91% *cadF*, 51% *cdtABC*, 48% *iam*, 46% *racR*, 32% *ciaB* and 11% *virB11*. *C. jejuni* showed higher prevalence of all genes evaluated than *C. coli*, except *iam* and *virB11* which were higher for *C. coli*. The same gene pattern was presented in different sources of isolates. The high prevalence of *flaA* and *flhA*, involved in CT mobility, *cadF* related to *Campylobacter* gut colonization of broiler and *cdtABC* genes involved for the expression of cytotoxin, indicates the importance of these factors in CT virulence. Differences in the prevalence of genes according to the species of CT could demonstrate different mechanisms of pathogenicity, and this is not related to the source of isolates. All the results showed the ability of CT to colonize cells but is not evidence of pathogenesis.

Palabras clave: *Campylobacter* termotolerante; pollos; granja; prevalencia; genes virulencia

Keywords: thermotolerant *Campylobacter*, broiler, farms, prevalence, virulence genes.

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 (Silva et al. 2011). Los mecanismos moleculares implicados en la infección de CT en pollos podrían ser útiles para conocer características epidemiológicas de la enfermedad (Datta et al. 2003). 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) (Wieczorek & Osek 2008, Josefsen et al. 2015); *virB11*, *ciaB*, *iam* (genes responsables de la invasión) (Wieczorek & Osek 2008, Josefsen et al. 2015); *cdtA*, *cdtB* y *cdtC* (genes responsables de la producción de citotoxinas) (Wieczorek & Osek 2008, Josefsen et al. 2015).

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%.

Analizando los resultados 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 de la especie del aislamiento se considera la información de la fuente de origen del mismo 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 aislamientos. Solo una cepa aislada, obtenida a partir de mosca fue positiva a todos los genes de virulencia analizados.

De los resultados obtenidos encontramos que *flaA*, *flhA*, *cadF*, genes relacionados a la expresión de adherencia y colonización de CT fueron encontrados con mayor frecuencia que el resto. La alta prevalencia de *flaA* y *flhA*, 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 (Wieczorek & Osek 2008, Josefsen et al. 2015). 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 (Wieczorek & Osek 2008, Josefsen et al. 2015). 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.

Se pudo 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

(Wieczorek & Osek 2008, Josefsen et al. 2015). 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 (Wieczorek & Osek 2008, Josefsen et al. 2015).

Bibliografía

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. *J Med Microbiol*, 52: 345-348.

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. *J Microbiol methods*, 112: 118-125.

Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P. A., Teixeira, P. (2011). *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Front Microbiol*, 2: 200.

Wieczorek K., Osek J. (2008). Identification of virulence genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates by PCR. *Bull Vet Inst Pulawy*, 52(1): 211-216.
