PRESENCIA DE *Campylobacter* spp. Y SU RESISTENCIA ANTIMICROBIANA A CIPROFLOXACINA Y ERITROMICINA EN GALLINAS PONEDORAS DE UN ESTABLECIMIENTO DEL DEPARTAMENTO CENTRAL, PARAGUAY.

PRESENCE OF *Campylobacter* spp. AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE TO CIPROFLOXACIN AND ERYTHROMYCIN IN ONE LAYING HENS PRODUCTION ESTABLISHMENT OF THE CENTRAL DEPARTMENT, PARAGUAY.

Cardozo L¹, Castro L², Zarate N¹, Torres C¹, Stavis S¹

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Veterinarias, Departamento de Microbiología e Inmunología.

²Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Veterinarias, Departamento de Patología y Clínica, Laboratorio de Patología Clínica.

RESUMEN. Las bacterias termófilas de *Campylobacter* spp. constituyen los patógenos frecuentemente identificadas en casos de diarrea en humanos. A nivel local no existe evidencia de trabajos publicados sobre las mismas en gallinas ponedoras. El objetivo del estudio fue determinar la presencia de *Campylobacter* spp. y perfil de resistencia de cepas aisladas en gallinas ponedoras, localizadas en la División de Avicultura de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Asunción. Se analizaron 150 muestras de hisopado cloacal de gallinas ponedoras de la línea Hisex Brown. Fueron sometidas a análisis microbiológicos e identificación de especies en base a características morfológicas y bioquímicas. La resistencia antimicrobiana a la Ciprofloxacina y Eritromicina fue realizada utilizando método de tiras con gradiente de antibióticos por difusión en agar. Del total de muestras 22, fueron positivas a *Campylobacter* spp, especie jejuni, representando una presencia del 15%. Los resultados de resistencia antimicrobiana demostraron que las cepas de *Campylobacter jejuni* presentaron 95% de resistencia a la Ciprofloxacina, no observándose resistencia a la Eritromicina. Se observó una baja presencia de *Campylobacter* spp. en gallinas ponedoras sin embargo, la alta resistencia observada a la Ciprofloxacina, debería servir de base para el manejo de los antimicrobianos en la cadena productiva avícola.

Palabras clave: antimicrobianos, aislamiento microbiológico, *Campylobacter* spp., gallinas ponedoras, Paraguay.

ABSTRACT. The thermophilic bacteria of *Campylobacter* spp. It Constitutes pathogens frequently identified in cases of diarrhea in humans. A locally non-existent evidence of published works of *Campylobacter* spp. In laying hens. The objective of this investigation was to determine the presence of *Campylobacter* spp. And resistance profile of strains isolated from laying hens, located in the poultry division of the Faculty of Veterinary Sciences of the National University of Asunción. A total of 150 cloacal swab specimens were collected from laying hens of the Hisex Brown line. The samples were submitted to microbiological analysis and species identification based on morphological and biochemical characteristics. The antimicrobial resistance to Ciprofloxacin and Erythromycin, was performed using antibiotic gradient strips method by agar diffusion. Of the 22 samples were positive to *Campylobacter* spp, jejuni species, representing a presence of 15%. Results of antimicrobial resistance demonstrated that strains of *Campylobacter jejuni* showed 95% resistance to Ciprofloxacin. No resistance to Erythromycin was observed. A low prevalence of *Campylobacter* spp. In laying hens However, the high resistance observed to Ciprofloxacin should serve as a basis for the correct antimicrobial activity in the poultry production chain.

Keywords: antimicrobials, microbiological isolation, *Campylobacter* spp, laying hens, Paraguay.

doi: 10.18004/compend.cienc.vet.2017.07.02.07-11

Dirección para correspondencia: Prof. Dra. Luz Carolina Cardozo Bogado - Departamento de Microbiología e Inmunología - Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional de Asunción - Casilla de Correo N° 1061 - Ruta Mcal. Estigarribia Km 10,5- Campus Universitario - San Lorenzo- Paraguay

E-Mail: lcardozo@vet.una.py

Recibido: 26 de mayo de 2017 / **Aceptado:** 10 de octubre de 2017

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas al humano por el consumo de alimentos contaminados con patógenos, representan actualmente uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. En este sentido, la Campilobacteriosis producida por especies termotolerantes de *Campylobacter*, en particular *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, son los patógenos frecuentemente identificados en casos de zoonosis bacterianas (1). Los síntomas comúnmente reportados son diarrea, dolor abdominal, escalofríos y fiebre (2). La infección por *Campylobacter spp.* se asocia con el desarrollo del síndrome de Guillain-Barré, consiste en desórdenes neurológicos que afectan el sistema nervioso periférico y el síndrome urémico hemolítico (3,4). En el año 2011, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria reportó un total de 220.209 casos en humanos de campilobacteriosis en la Unión Europea, incrementando de manera significativa en los últimos años (5). En países desarrollados el número de infecciones causadas por especies *Campylobacter* excede incluso a las infecciones producidas por *Salmonella* (6).

Campylobacter spp. son bacterias curvas o en forma de S, pequeñas, Gram negativa, flagelo polar, altamente móviles y extremadamente sensibles, que requieren condiciones de microaerofilia para su crecimiento (7,8). Son reservorios de este patógeno un rango amplio de especies animales, constituyendo las vías de contaminación el consumo de alimentos contaminados, agua y leche (9). Sin embargo, la principal fuente de transmisión al humano, representa el consumo de carne cruda de pollo o semicruda y por contaminación cruzada durante el procesamiento de alimentos (10,11). Las gallinas son consideradas reservorios naturales de este enteropatógeno, pero rara vez muestran signos clínicos de la enfermedad (12). El principal sitio de colonización de *Campylobacter spp.* es la capa mucosa del tracto intestinal inferior que recubre las células epiteliales de las criptas del ciego y la cloaca. En reproductoras comerciales, el *C. jejuni* y *C. coli* fueron aislados de folículos ováricos maduros e inmaduros y en todos los segmentos del tracto reproductivo (13).

Los agentes antimicrobianos se han utilizado por décadas en la producción animal para controlar, prevenir y tratar infecciones y como promotores del crecimiento (14). De esta manera el uso de

antibióticos supone un riesgo para la selección de patógenos resistentes que pueden ser potencialmente transmitidos a lo humanos comprometiendo de esta manera el tratamiento clínico. La gastroenteritis producida por *Campylobacter spp.* es generalmente autolimitada, dispensando la prescripción de antibióticos, pero cuando la terapia antibiótica es necesaria, los macrólidos y las fluoroquinolonas son los antimicrobianos de elección (15).

Varias investigaciones de la prevalencia y resistencia antimicrobiana de *Campylobacter spp.* en diferentes muestras de origen avícola han sido desarrollados en diversos países del mundo. Los valores de prevalencia hallados fueron de 8% en Estados Unidos (16), 38,5% en Argentina (17), 45% en República Checa (1); 35,9% en China (18); 38% en Italia; 63,1% en Irán (19); 16,8% en Brasil (20); 18,9% en Estonia (21) y 41,7% en Ecuador (20).

A nivel local no existen trabajos de la presencia de *Campylobacter spp.* en gallinas ponedoras. En ese sentido, el objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de *Campylobacter spp.* y perfil de resistencia en gallinas ponedoras localizadas en la División de Avicultura de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Asunción.

Materiales y Métodos

Tipo de estudio y tamaño muestral

Se realizó un estudio descriptivo, de corte transversal y con un tamaño de muestra de 150 gallinas ponedoras de la línea genética Hisex Brown de 100 semanas de edad. El tamaño muestral fue calculado aplicando (21) un nivel de confianza del 95%, prevalencia del 8% (16) y error del 5%.

Muestras biológicas

Los materiales biológicos correspondieron a 150 muestras de materia fecal recolectadas al azar de tres galpones diferentes durante tres semanas consecutivas utilizando hisopo de algodón estéril. Obtenidas las muestras fueron mantenidas y transportadas a temperatura ambiente en medio CaryBlaird (Britania,USA) y remitidas al Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Asunción.

Aislamiento e identificación de *Campylobacter* spp.

Las muestras fueron sembradas en agar selectivo Skirrow modificado (Oxoid, UK) e incubadas en microaerofilia a 42°C por 48 horas. La identificación se realizó de acuerdo a las características microscópicas y pruebas bioquímicas según el Manual de Procedimiento de WHO Global Salm Surv (22).

Test de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *Campylobacter* spp.

El perfil de resistencia a la Ciprofloxacina y Eritromicina se realizó por el método de tiras con gradiente de antibióticos por difusión en agar para medir la Concentración Inhibitoria Mínima y la interpretación de los puntos de corte se realizó según los criterios establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (23).

Los datos obtenidos fueron transferidos a una hoja de cálculo de Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), para ser procesados estadísticamente. Se determinó la prevalencia dividiendo el total de casos positivos por el número total de muestras (24).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron 150 muestras de materia fecal de gallinas ponedoras. Fueron aisladas en total 22 muestras de *Campylobacter* spp. representando una presencia del 15%. La totalidad de los aislamientos correspondieron a *Campylobacter jejuni*. Los resultados se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Presencia de *Campylobacter* spp. en muestras fecales de gallinas ponedoras de la línea Hissex Brown.

Total de Muestras	Muestras positivas de <i>Campylobacter</i> spp.(%)	Muestras positivas de <i>C. jejuni</i> (%)
150	22 (15)	22 (15)

En investigaciones desarrolladas en diferentes países, los valores de presencia fueron superiores a los descritos en este trabajo, siendo aisladas más de una especie de *Campylobacter*. En Alemania (27), se reportó una prevalencia de 29,3% de *Campylobacter* spp. en gallinas ponedoras criadas

en sistemas convencionales. Del total de los aislamientos el 84,6% fue *C. jejuni* y el 15,3% *C. coli*. En otra investigación desarrollada en pollos y gallinas ponedoras sistemas a piso en Sri Lanka (28), reportaron valores de prevalencia de 50% para *Campylobacter jejuni* y 50% *C. coli*. En el mencionado trabajo fueron realizados muestreos de gallinas ponedoras en tres tiempos de manera a determinar la presencia de *Campylobacter* spp., antes del inicio de la postura (<140 días), durante el primer período de puesta (140 a 360 días) y en la segunda fase de puesta (>360 días). Fueron hallados los menores valores (52%) en gallinas de mayor edad. Esto podría relacionarse con la baja prevalencia reportada en este trabajo (15%), considerando que las gallinas al momento del estudio tenían 700 días de edad. En Atenas (13), se reportó una prevalencia del 35% de *Campylobacter* spp. en gallinas ponedoras mantenidas a jaula, representando el 50% de los aislamientos a *C. jejuni*, 49% a *C. coli* y el 1% a *C. lari*.

Las diferencias encontradas podrían deberse al tipo de muestra, línea genética y edad de las gallinas y método de aislamiento empleado. Destacando además, que en estudios realizados en países de clima templado se ha demostrado asociación entre la inmunidad maternal, inmunidad adquirida, condiciones climáticas, sistemas de manejo y niveles de bioseguridad con la colonización y persistencia de *Campylobacter* spp. (26). En ese sentido, en Irán (19) y en Dinamarca (27) se observaron los mayores aislamientos en los meses calurosos (otoño y verano), estando relacionada esta alta prevalencia con el mayor número de moscas que juegan un papel en la epidemiología del *Campylobacter* spp (28). Considerando lo expuesto, otro factor que podría haber influido en la baja prevalencia encontrada en este trabajo, sería la época del muestreo (primavera y otoño).

De las 22 cepas aisladas de *Campylobacter jejuni* el 95% resultaron resistentes a Ciprofloxacina. No se observó resistencia a la Eritromicina. Se describieron valores diferentes en gallinas ponedoras alojadas en sistemas convencionales, utilizando un panel de 30 antimicrobianos (25), registrando niveles elevados de resistencia al Linezolid (42,4%) seguida de la Ciprofloxacina (43,5%). En relación a la Eritromicina se describió una distribución de 47,4% de cepas sensibles y 51,5% intermedias. En una investigación (29) de resistencia antimicrobiana en gallinas italianas a 14

antibióticos se reportó 100% de resistencia a la Cefalotina, en tanto que 3% resultó resistente a la Eritromicina. En dicha investigación, no fue utilizado la Ciprofloxacina. Sin embargo, en Ecuador (22) en gallinas de traspatio se observó una alta resistencia a la Tetraciclina (94,9%) seguida de la Ciprofloxacina (84,6%), resultado todas las cepas sensibles a la Eritromicina. En tanto, que en gallinas de línea Leghorm (13) se determinó la susceptibilidad antimicrobiana empleando nueve antimicrobianos y no se observó resistencia a la Ciprofloxacina y a la Eritromicina. El mayor porcentaje de resistencia fue a la Tetraciclina con un 14%, destacando que en los últimos años se ha incrementado la resistencia al mencionado antibiótico.

En una revisión desarrollada en países de América del Sur (30), se establecieron los niveles de resistencias a cinco antimicrobianos. Se reportaron resistencia a las Quinolonas, en Argentina y Perú, a la Tetraciclina en Bolivia, a la Ampicilina, Brasil y a la Eritromicina en Chile. La elevada resistencia hallada frente a la Ciprofloxacina, debería ser atendida teniendo en cuenta que las drogas de primera elección para el tratamiento clínico de la Campilobacteriosis en humanos en el país, son la Eritromicina, la Ciprofloxacina y la Tetracilinas (31). Y al ser gallinas ponedoras, en sus últimas etapas de producción el destino de las mismas sería el consumo en forma de carne, lo cual podría ser un riesgo para la salud de los consumidores.

CONCLUSIÓN

Este trabajo proporciona información de la presencia y resistencia antimicrobiana de *Campylobacter* spp. en gallinas ponedoras de la línea Hisex Brown. Se demostró baja presencia de *Campylobacter* spp. en gallinas ponedoras (15%). El 100% de los aislamientos correspondieron a *C. jejuni*. A pesar de la baja presencia reportada, se identificó una elevada resistencia a la Ciprofloxacina (95%), situación que debería considerarse por las autoridades encargadas del control del uso de antibióticos en la cadena productiva avícola, teniendo en consideración que el mencionado fármaco es utilizado en el tratamiento de la campilobacteriosis en humanos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bardon J, Kolar M, Cekanova L, Hejnar P, Koukalova D. Prevalence of campylobacter jejuni and its resistance to antibiotics in poultry in the Czech Republic. Zoonoses Public Health. 2009;56(3):111-6.
2. Blaser MJ. Epidemiologic and clinical features of Campylobacter jejuni infections. J Infect Dis [revista en Internet]. 1997;176 Suppl(Suppl 2):103-105.[acceso 26 de marzo de 2017]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9396691>
3. Yuki N. Infectious origins of, and molecular mimicry in, Guillain-Barré and Fisher syndromes. Lancet Infect Dis. 2001;1(1):29-37.
4. Leonard EE, Tompkins LG, Falkow S, Nachamkin I. Comparison of campylobacter jejuni Isolates Implicated in Guillain-Barré Syndrome and Strains That Cause Enteritis by a DNA Microarray. Infect Immun. 2004;72(2):1199-203.
5. Food E, Authority S. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. EFSA J [Internet]. 2016;14(12). [acceso 26 de marzo de 2017]. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2016.4634>
6. Friedman CR. Epidemiology of campylobacter jejuni infections in the United States and other industrialized nations. Campylobacter [Internet]. 2000;II(2000):121-38. [acceso 3 de julio de 2017]. Disponible en: <http://ci.nii.ac.jp/naid/10012188815/>
7. Saiyudthong S, Phusri K, Buates S. Rapid detection of campylobacter jejuni, campylobacter coli, and campylobacter lari in fresh chicken meat and by-products in bangkok, Thailand, Using Modified Multiplex PCR. J Food Prot [revista en Internet]. 2015;78(7):1363-9. [acceso 3 de marzo de 2017]. Disponible en: http://jfoodprotection.org/doi/10.4315/0362-028X.JFP-14-415Tang_2010.pdf.
8. Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM. Global epidemiology of campylobacter infection. Clin Microbiol Rev. 2015;28(3):687-720.
9. Ingesa-Capaccioni S, González-Bodí S, Jiménez-Trigos E, Marco-Jiménez F, Catalá P, Vega S, et al. Comparison of different sampling types across the rearing period in broiler flocks for isolation of Campylobacter spp. Poult Sci [revista en Internet]. 2015;94(4):766-71. [acceso 20 de setiembre de 2016]. Disponible en: <http://ps.oxfordjournals.org/content/94/4/766.full>
10. Bolton D, Meredith H, Walsh D, McDowell D. Poultry Food Safety Control Interventions in the domestic kitchen. J Food Saf. 2014;34(1):34-41.
11. Horrocks SM, Anderson RC, Nisbet DJ, Ricke SC. Incidence and ecology of Campylobacter jejuni and coli in animals. Anaerobe [revista en Internet]. 2009;15(1-2):18-25. [acceso 5 de abril de 2017]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.09.001>
12. Cox NA, Richardson LJ, Buhr RJ, Fedorka-Cray PJ. Campylobacter species occurrence within internal organs and tissues of commercial caged Leghorn laying hens. Poult Sci.[Internet]. 2009;88(11):2449-2456.[acceso 8 de febrero de 2017]. Disponible en: <https://academic.oup.com/ps/article-lookup/doi/10.3382/ps.2009-00195>
13. Marshall BM, Levy SB. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. Clin Microbiol Rev. 2011;24(4):718-33.
14. Fernández H, Pérez-Pérez G. Campylobacter: Fluoroquinolone resistance in Latin-American countries. Arch Med Vet. 2016;48(3):255-9.

15. Doyle MP. Association of *Campylobacter*-Jejuni with Laying Hens and Eggs. *Appl Environ Microbiol*. 1984;47(3):533–536.
16. Giacoboni G, Puchuri MC, Cerdá R. *Campylobacter* termotolerantes en menudos y carcasas de pollos provenientes de diferentes comercios de la ciudad de La Plata (Argentina). *Analecta Vet* [revista en Internet]. 1999;19(1/2):51–54. [acceso 15 de mayo de 2017]. Disponible en: http://163.10.34.134/bitstream/handle/10915/11102/Documento_completo_.pdf?sequence=1
17. Chen X, Naren GW, Wu CM, Wang Y, Dai L, Xia LN, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates in broilers from China. *Vet Microbiol* [revista en Internet]. 2010;144(1–2):133–9. [acceso 7 de junio de 2017]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.12.035>
18. Zendeabad B, Khayatizadeh J, Alipour A. Prevalence, seasonality and antibiotic susceptibility of *Campylobacter* spp. isolates of retail broiler meat in Iran. *Food Control* [Internet]. 2015;53:41–45. [acceso 20 de diciembre de 2016]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.008>
19. Hungaro HM, Mendonça RCS, Rosa VO, Badaró ACL, Moreira MAS, Chaves JBP. Low contamination of *Campylobacter* spp. on chicken carcasses in Minas Gerais state, Brazil: Molecular characterization and antimicrobial resistance. *Food Control*. 2015;51:15–22.
20. Mäesaar M, Kramarenko T, Meremäe K, Sögel J, Lillenberg M, Häkkinen L, Ivanova M, Kovalenko K, Hörman A, Hänninen ML, Roasto M. Antimicrobial Resistance Profiles of *Campylobacter* spp. Isolated from Broiler Chicken Meat of Estonian, Latvian and Lithuanian Origin at Estonian Retail Level and from Patients with Severe Enteric Infections in Estonia. *Zoonoses Public Health*. 2016;63(2):89–96.
21. Ochoa S, Simaluiza RJ, Toledo Z. Frequency and antimicrobial behaviour of thermophilic *Campylobacter* species isolated from Ecuadorian backyard chickens # Frecuencia y comportamiento frente a antimicrobianos de especies termófilas de *Campylobacter* aisladas de pollos de traspatio en Ecuador. *Arch Med Vet*. [revista en Internet]. 2016;314:311–314. [acceso 5 de marzo de 2017]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48711206.2005>
22. Viñas MR, Farace I. Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv Para América del Sur. *WHO Glob Salm Surv* [Internet]. 2007;34. [acceso 17 de marzo de 2017]. Disponible en: http://bvs.panalimentos.org/local/file/Manual_Campylobacter_31-08-2007.pdf
23. M. P. Weinstein. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow Aerobically? Approved Standard — Ninth Edition. Vol. 32, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard- Ninth Edition. 2012. 18 p.
24. Colles FM, McCarthy ND, Layton R, Maiden MCJ. The prevalence of *Campylobacter* amongst a free-range broiler breeder flock was primarily affected by flock age. *PLoS One* [Internet]. 2011;6(12):e22825. [acceso 5 de julio de 2017]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22174732>
25. Schwaiger K, Schmied EM V, Bauer J. Comparative analysis of antibiotic resistance characteristics of gram-negative bacteria isolated from laying hens and eggs in conventional and organic keeping systems in Bavaria, Germany. *Zoonoses Public Health*. 2008;55(7):331–341.
26. Kalupahana RS, Kottawatta KSA, Kanankege KST, Van Bergen MAP, Abeynayake P, Wagenaar JA. Colonization of *Campylobacter* spp. in broiler chickens and laying hens reared in tropical climates with low-biosecurity housing. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(1):393–395.
27. Bouwknegt M, Van De Giessen AW, Dam-Deisz WDC, Havelaar AH, Nagelkerke NJD, Henken AM. Risk factors for the presence of *Campylobacter* spp. in Dutch broiler flocks. *Prev Vet Med*. 2004;62(1):35–49.
28. Bahrndorff S, Rangstrup-Christensen L, Nordentoft S, Hald B. Foodborne disease prevention and broiler chickens with reduced *Campylobacter* infection. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(3):425–430.
29. Parisi A, Lanzilotta SG, Addante N, Normanno G, Di Modugno G, Dambrosio A, et al. Prevalence, molecular characterization and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter* isolates from cattle, hens, broilers and broiler meat in south-eastern Italy. *Vet Res Commun*. 2007;31(1):113–123.
30. Fernández H. *Campylobacter* and campylobacteriosis: a view from South America. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2011;28(1):121–127.
31. Orrego M, Weiler N, Portillo R, Lird G, Acosta L, Ortiz F, et al. Síndrome diarreico agudo causado por *Campylobacter* spp. en pacientes menores de 11 años y su resistencia antimicrobiana a las drogas de elección para tratamiento 2010-2012, Paraguay. *Pediatría (Asunción)* 2014;41(2):127–30. Available from: http://scielo.iics.una.py/scielo.php?pid=S1683-98032014000200005&script=sci_arttext