

DETECCIÓN ESPECÍFICA DE *Arcobacter butzleri* en CARNE DE POLLO MEDIANTE UNA TÉCNICA DE PCR

DETECTION OF *Arcobacter butzleri* in POULTRY MEAT BY A SPECIES-SPECIFIC PCR TECHNIQUE

D. Pentimalli², R. Martín de Santos¹ e I. González Alonso¹

¹Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid; ²Dpto. di Sanità Pubblica. Facoltà di Agraria. Università degli studi di Parma, Italia

Resumen

En este trabajo se describe el desarrollo de una técnica de PCR para la detección específica de *Arcobacter butzleri* en carne fresca de pollo empleando cebadores específicos de especie diseñados en gen 16S ARN ribosómico. Los cebadores seleccionados amplifican un fragmento de 195 pb en *A. butzleri*, sin producir señal de amplificación en otras especies de *Arcobacter*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, ni en otros microorganismos presentes en los alimentos. La técnica de PCR se ha aplicado al análisis de 42 muestras comerciales de carne fresca de pollo adquiridas en diversos comercios minoristas. Tras un pre-enriquecimiento selectivo durante 18 h a 30°C, *A. butzleri* se detectó en un 85,7% de las muestras analizadas. Se observó una total concordancia entre los resultados obtenidos por PCR y el método convencional de recuento en placas de agar selectivo.

Palabras clave: *Arcobacter butzleri*, carne de pollo, PCR

Summary

A PCR technique was developed for the specific detection of *Arcobacter butzleri* in fresh chicken meat using species-specific primers designed on the 16S ribosomal ARN gene. The selected primers amplify a 195 bp fragment from *A. butzleri* whereas no PCR product is generated for other *Arcobacter*, *Campylobacter*, *Helicobacter* species, and other food bacteria. The PCR technique was used to screen 42 retail-purchased chicken samples for the presence of *A. butzleri*. Following a selective enrichment for 18 h at 30°C, *A. butzleri* was detected in 85.7% of the analyzed samples, showing a total concordance between the PCR results and the conventional selective plating method.

Key words: *Arcobacter butzleri*, chicken meat, PCR

Introducción

El creciente aumento en el número de aislamientos de *Arcobacter* spp. procedentes de alimentos de origen animal, agua y heces de individuos con gastroenteritis, ha potenciado la importancia de estos microorganismos como posibles agentes patógenos de transmisión al hombre por vía alimentaria (Vandenberg *et.al*, 2004). La mayoría de los aislamientos corresponden a *A. butzleri*, seguidos de *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*, y la recientemente descrita especie *A. cibarius* (Wesley, 1996; Ho *et.al*. 2006; Houf y Stephan, 2007).

La identificación de *Arcobacter* spp. por métodos convencionales se encuentra limitada debido a los exigentes requerimientos nutritivos de estas bacterias y a su baja actividad metabólica. Además, debido a que los arcobacters comparten numerosas características morfológicas y bioquímicas con especies del género filogenéticamente próximo *Campylobacter*, es frecuente que se produzca una identificación errónea de las cepas de *Arcobacter* y, por tanto, una subestimación de su incidencia real en los alimentos. (Prouzet-Mauléon *et.al*. 2006).

Las técnicas de de análisis del ADN y, concretamente, las basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), son herramientas cada vez más extendidas en el análisis microbiológico de los alimentos (Hill, 1996) ya que ofrecen una enorme rapidez, sensibilidad y especificidad. Por ello, el objetivo de este trabajo de investigación ha consistido en el desarrollo de una técnica de PCR para la detección e identificación de *Arcobacter butzleri* en carne fresca de pollo, empleando cebadores específicos de especie diseñados en un fragmento del gen 16S ARN ribosómico.

Material y métodos

En este trabajo se diseñaron los cebadores *Arcobutz-FW* y *Arcobutz-RV* para la amplificación de un fragmento específico de 195 pb en el gen 16S ARNr de *A. butzleri* (*Arcobutz-FW*: 5'-AGTTGTTGTGAGGCTCCAC-3; *Arcobutz-RV*: 5'-GCAGACACTAATCTATCTCTA-3'). Además, se empleó como control positivo de amplificación la pareja de cebadores *Bact-FW/Bact-RV*, diseñados para amplificar en bacterias un fragmento conservado de 290 pb en este mismo gen (*Bact-FW*: 5'-CAGCAGCCGCGTAATA-3; *Bact-RV*: 5'-TGGACTACCAGGGTATCTAA-3).

En primer lugar, se determinó la sensibilidad de la técnica de PCR para detectar *A. butzleri* en carne fresca de pollo inoculada con concentraciones de 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10 ufc/g de *A. butzleri*. La extracción del ADN de las muestras de pollo se realizó empleando el kit *Wizard DNA clean-up system* (Promega). Las reacciones de amplificación por PCR se

realizaron en un volumen total de 25 μ l, con 15 pm de cada cebador y 2 ml de ADN. La PCR se llevó a cabo en un termociclador (Tecne Ltd. Cambridge, Reino Unido), programado para realizar una desnaturalización inicial de 94°C durante 3 min, seguida de 40 (*Arcobutz-FW* y *Arcobutz-RV*) o 20 (*Bact-FW/Bact-RV*) ciclos que comprendían las siguientes etapas: 94°C, 1 min para desnaturalizar; 55°C, 1 min para permitir la unión de los cebadores y 72°C, 1 min para extender la cadena de ADN. La última extensión se prolongó durante 7 min. Los fragmentos resultantes se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%.

La técnica de PCR desarrollada se aplicó al análisis de 42 muestras comerciales de carne fresca de pollo (alitas, muslos y pechugas, incluyendo piel) adquiridas en diversos comercios minoristas. Una vez homogeneizadas en AB (*Arcobacter* Broth, Oxoid), las muestras se analizaron directamente, y tras someterse a un pre-enriquecimiento selectivo en caldo AB suplementado con CAT (Cefoperazona-Anfotericina-Teicoplanina, Oxoid) durante 18 h a 30°C en microaerobiosis. Paralelamente, se efectuó el aislamiento y enumeración de *A. butzleri* a partir de las muestras mediante la incubación aeróbica de las mismas, antes y después del enriquecimiento, en placas de agar selectivo CIN/CAT modificado (Cefsulodina-Irgasan-Novobiocina + CAT, Oxoid), durante 2-3 días a 30°C.

Resultados

Los resultados obtenidos en la técnica de PCR descrita demostraron una adecuada especificidad de los cebadores *Arcobutz-FW/Arcobutz-RV*, ya que amplificaron el fragmento esperado de 195 pb en *A. butzleri* sin producir señal de amplificación en otras especies de *Arcobacter*, *Campylobacter* y *Helicobacter*, ni en otros microorganismos presentes en los alimentos. Los cebadores *Bact-FW/Bact-RV* amplificaron el ADN (290 pb) de todas las bacterias incluidas en el análisis, confirmando su utilidad como control positivo de amplificación (Tabla 1)

Tabla 1: Especificidad de la técnica de PCR desarrollada para la detección de *Arcobacter butzleri*. Se muestran los resultados de la amplificación del gen 16S ARNr con los cebadores de *A. butzleri* (*Arcobutz-FW/RV*) y con el control positivo de bacterias (*Bact-FW/Bact-RV*), al analizar cultivos puros de varias cepas bacterianas

<i>Cepa bacteriana</i>	<i>Arcobutz-FW/ RV</i> (195 pb)	<i>Bact-FW/ RV</i> (290 pb)
<i>Arcobacter butzleri</i> LMG 9910	+	+
<i>Arcobacter butzleri</i> LMG 10828	+	+
<i>Arcobacter cryaerophilus</i> LMG 7537	-	+
<i>Arcobacter cryaerophilus</i> LMG 9863	-	+
<i>Arcobacter skirrowii</i> LMG 8538	-	+
<i>Arcobacter skirrowii</i> LMG 6621	-	+
<i>Arcobacter cibarius</i> CECT 7203	-	+
<i>Arcobacter cibarius</i> LMG 21996	-	+
<i>Arcobacter cibarius</i> LMG 21997	-	+
<i>Campylobacter coli</i> (aislamiento clínico)	-	+
<i>Campylobacter jejuni</i> (aislamiento clínico)	-	+
<i>Campylobacter jejuni</i> LMG 8841	-	+
<i>Campylobacter fetus</i> LMG 6442	-	+
<i>Campylobacter lari</i> LMG 8845	-	+
<i>Helicobacter pullorum</i> LMG 16318	-	+
<i>Helicobacter pylori</i> LMG 18041	-	+
<i>Escherichia coli</i> CECT 515	-	+
<i>Listeria innocua</i> CIP 103575	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i> CECT 559	-	+
<i>Salmonella enteritidis</i> CECT 4300	-	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i> B52	-	+

LMG: Lab. Voor Microbiologie, Gent (Belgium); CECT: Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia (España); CIP: Colección del Instituto Pasteur, París (Francia)

Tras determinar la funcionalidad y especificidad de la técnica de PCR, se determinó su sensibilidad para detectar *A. butzleri* en muestras de referencia de carne fresca de pollo inoculadas experimentalmente con distintas concentraciones de esta bacteria comprendidas entre 10^4 y 10 ufc/g. El límite de detección conseguido fue de aproximadamente 10^3 ufc/g (Figura 1).

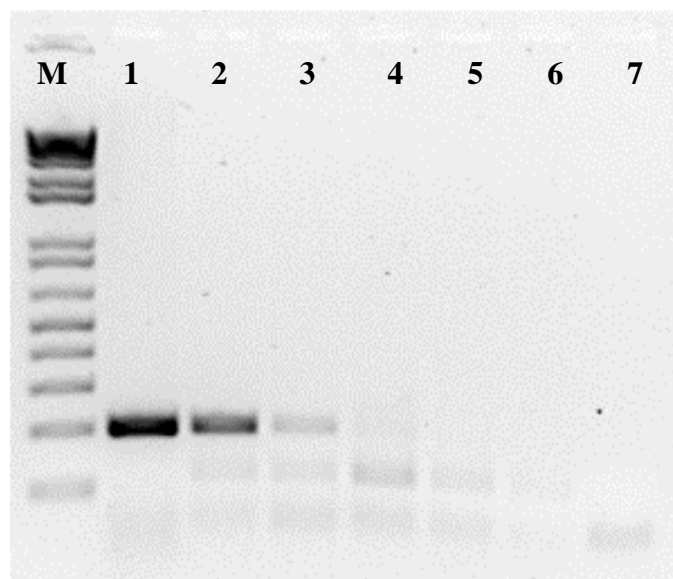


Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR (195 pb) amplificados a partir de muestras de pollo inoculadas experimentalmente con concentraciones de *Arcobacter butzleri* de (2) 10^4 , (3) 10^3 , (4) 10^2 y (5) 10 ufc/g. El resto de muestras corresponden a: (1) Control positivo de *A. butzleri*, (6) muestra de pollo sin inocular y (7) control negativo de la amplificación. M: marcador de peso molecular Kb plus.

La técnica de PCR desarrollada también se utilizó para determinar la presencia de *A. butzleri* en muestras comerciales de carne fresca de pollo. Dado que el número de arcobacters que suelen encontrarse en la carne es generalmente bajo (Corry y Atabay, 2001), para conseguir niveles detectables de *A. butzleri* en las muestras comerciales fue necesario realizar un pre-enriquecimiento de las mismas en un medio líquido selectivo durante 18h a 30°C en condiciones de microaerobiosis. Bajo las condiciones descritas, la técnica de PCR detectó presencia de *A. butzleri* en un 85,7% (36 de 42) de las muestras de pollo analizadas. Se consiguió una total concordancia entre los resultados de la detección por PCR y por el método convencional de siembra en placas de agar selectivo.

Conclusiones

La técnica de PCR desarrollada en el gen mitocondrial 16S ARNr ha permitido la detección específica de *Arcobacter butzleri* en un elevado número de muestras comerciales de carne de pollo. El empleo de esta técnica podría ser de gran utilidad para determinar de forma rápida la prevalencia de este patógeno emergente en los productos cárnicos comercializados y, en consecuencia, contribuir a que las industrias consideren la importancia de su control dentro de los sistemas de gestión de la seguridad alimentaria.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la Dirección General de Universidades de la Comunidad de Madrid (Programa de Vigilancia Sanitaria 0505/AGR/000265) y por la Universidad Complutense de Madrid (Proyecto Santander-Complutense PR34/07-15902).

Bibliografía

- **Corry, JEL y Atabay HI.** . 2001. Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. J. Appl. Microbiol., 90: 96S-114S.
- **Hill, WE.** The polymerase chain reaction: applications for the detection of foodborne pathogens. 1996. Crit. Rev. Food. Sci. Nut. 36:123-173.
- **Ho, TKH, Lipman LJA y Gaastra W.** 2006. *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent!. Vet. Microbiol., 115:1-13.
- **Houf, K y Stephan R.** 2007. Isolation and characterization of the emerging foodborne pathogen *Arcobacter* from human stools. J. Microbiol. Methods, 68: 408-413.
- **Prouzet-Mauléon, V, Labadi L, Bouges N, Ménard A. y Mégraud F.** 2006. *Arcobacter butzleri*: Underestimated enteropathogen. Emerg. Infect. Dis., 12: 307- 309.
- **Vandenberg, O, Dediste A, Houf K, Ibekwem S, Souayah, H, Cadranel, S, Douat, N, Zisis G, Butzler JP y Vandamme, P.** 2004. *Arcobacter* species in humans. Emerg. Infect. Dis., 10:1863-1867.
- **Wesley, IV.** *Helicobacter* and *Arcobacter* species: risks for foods and beverages. 1996. J. Food Prot., 59:1127-1132.