

# UNIVERSIDAD DE BURGOS

## ESCUELA DE DOCTORADO

### TESIS DOCTORALES

**TÍTULO:** “STUDY ON THE PRESENCE OF *CAMPYLOBACTER* SPP. ALONG THE POULTRY FOOD CHAIN”  
  
(ESTUDIO SOBRE LA PRESENCIA DE *CAMPYLOBACTER* SPP. A LO LARGO DE LA CADENA ALIMENTARIA DE CARNE DE POLLO)

**AUTORA:** GARCÍA SÁNCHEZ, LOURDES

**PROGRAMA DE DOCTORADO:** AVANCES EN CIENCIA Y BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIAS

**FECHA LECTURA:** 19/07/2018

**HORA:** 11:00

**CENTRO LECTURA:** ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR (CAMPUS MILANERA). SALÓN DE GRADOS.

**DIRECTORES:** JORDI ROVIRA CARBALLIDO – BEATRIZ MELERO GIL

**TRIBUNAL:** AURORA FERNÁNDEZ ASTORGA  
ISABEL JAIME MORENO  
ANA MARÍA DIEZ MATÉ  
AVELINO ÁLVAREZ ORDÓÑEZ  
FRANCESCA DE FILIPPIS

#### RESUMEN:

Actualmente, la campilobacteriosis está considerada como un problema de Salud Pública tanto en países desarrollados como en países subdesarrollados, siendo la primera causa de gastroenteritis de origen bacteriano en humanos. En 2016, el número de casos declarados en la Unión Europea fue de 246.307, mostrando un incremento del 6,1 % con respecto al año 2015. Aunque se trata de una enfermedad auto-limitante; puede derivar en complicaciones como el síndrome Guillain-Barré, el síndrome Miller Fisher o manifestaciones extra-gastrointestinales, requiriendo el uso de antibióticos.

El consumo de aves, especialmente de carne de pollo, es considerado como la mayor ruta de infección en humanos. Esta tesis tiene como objetivo profundizar en un mayor conocimiento de la presencia de *Campylobacter* spp. a lo largo de la cadena alimentaria de la carne de pollo, desde la granja hasta el consumidor, haciendo especial mención a los mecanismos implicados en la persistencia, virulencia y resistencia a antibióticos. Por ello, en la presente tesis se ha estudiado cada una de las etapas de la cadena alimentaria de la carne de pollo y su posible relación con la incidencia de campilobacteriosis en el mismo período de tiempo.

En primer lugar, se estudió la presencia de *Campylobacter* en granjas avícolas en dos estaciones, otoño y primavera, con el fin de determinar la prevalencia y la variabilidad genotípica existente, así como los factores de virulencia y resistencia a diferentes antibióticos en las cepas aisladas. Este estudio, se planteó para conocer de forma real cuál era la situación en la producción primaria y que variabilidad de genotipos podían existir. Este dato es útil; ya que posteriormente, los pollos son sacrificados en el matadero y pueden comprometer la seguridad alimentaria a lo

largo de los siguientes pasos de la cadena alimentaria. La prevalencia de *Campylobacter* fue del 42,9 % y 30,8 % en otoño

y primavera respectivamente, siendo *C. jejuni* la especie más abundante. Además; se comprobó que esta especie, era portadora de los genes de virulencia *cadF*, *flaA*, *cdtA*, *cdtB* y *cdtC* a diferencia de *C. coli*. Sin embargo, *C. coli* presentó mayor resistencia a los antibióticos; siendo algunas cepas de esta especie clasificadas como multi-resistentes.

En segundo lugar, se estudió en profundidad la presencia y variabilidad de *Campylobacter* en un matadero avícola. Los resultados mostraron una prevalencia del 48,2 %. Mediante técnicas de tipificación molecular (PFGE) y secuenciación (MLST) se analizaron dichas cepas, que se clasificaron en siete pulsotipos: A (ST 443; ST 443 CC); B (ST 775; ST 52 CC); C (ST 904; ST 607 CC); D (ST 464; ST 464 CC); E, F (ST

1074; ST 460 CC) y G (ST 3769; ST 21 CC). Entre estos, los pulsotipos G (63,1 %) y C (23 %) fueron los mayoritarios, siendo aislados durante 17 y 21 días respectivamente, e independientemente de la granja correspondiente y tanto antes como después de aplicar los protocolos de limpieza y desinfección. Mediante la técnica wgMLST; se determinó que ambas poblaciones eran altamente clonales, lo que sugiere que ambos pulsotipos pueden permanecer en el ambiente del matadero y planta de procesado, más de lo que en un principio se pensaba.

Los mecanismos por los cuáles *Campylobacter* puede sobrevivir en el ambiente son complejos, ya que se trata de un proceso multifactorial, en el que pueden estar involucrados: la formación de biofilms, la presencia de ciertos genes de virulencia y la resistencia a compuestos antimicrobianos, entre otros. En base a los resultados obtenidos, la secuencia tipo ST 904; ST 607 CC (pulsotipo C) fue la que mostró una capacidad mayor para formar biofilms a diferentes temperaturas, en condiciones de aerobiosis y microaerofilia y en distintas superficies. Además, presentó una mayor resistencia frente a diferentes compuestos antimicrobianos. Este estudio sugiere que la combinación de pequeños cambios en el genoma de la secuencia tipo ST 904 (pulsotipo C), incluidas

mutaciones e inserciones en genes relacionados con la resistencia frente a antimicrobianos, la presencia de genes que codifican el T6SS, así como la presencia de un gran número de genes relacionados con factores de virulencia, podrían explicar su mayor capacidad para formar biofilms. La suma de este conjunto de pequeños cambios, podría explicar la capacidad, para sobrevivir y persistir durante períodos de tiempo más largos, en condiciones ambientales hostiles, como puede ser el ambiente del matadero.

En tercer lugar, se estudió la prevalencia y diversidad de *Campylobacter* en productos de pollo comerciales, tanto envasados (MAP) como sin envasar. En base a los resultados, se obtuvo una prevalencia del 39,4 %; siendo los productos sin envasar los que presentaron mayor porcentaje de *Campylobacter* (45,3 %) frente a los productos envasados (33,6 %). En ambos casos, mediante la técnica de tipificación (PFGE) se obtuvo un gran número de pulsotipos, lo que indica la gran variabilidad genética existente en dichos productos. Aunque la atmósfera modificada puede reducir la prevalencia de microorganismos como *Campylobacter* spp., esta no puede evitar su presencia en productos de pollo envasados. Los resultados sugieren, que algunos pulsotipos podrían persistir en el ambiente de la planta de procesado de la cual proceden o en las carnicerías, o en los productos envasados, durante más tiempo de lo que en un principio se pensaba. Por ello, es necesario instaurar medidas de control más estrictas en los pasos previos de la cadena alimentaria, para evitar la presencia de *Campylobacter* spp., en la carne de pollo, último eslabón de la cadena alimentaria, antes de alcanzar al consumidor y comprometer así la salud pública.

Finalmente, este estudio ha demostrado una relación genotípica entre cepas de la cadena alimentaria de la carne de pollo y cepas aisladas en pacientes con campilobacteriosis. Los resultados muestran que hay 35 clústeres en los que se comparten cepas aisladas en alguna etapa de la cadena alimentaria de pollo y las causantes de la

enfermedad. Así, se ha encontrado, que hay 9 clústeres con cepas compartidas en la granja, 4 en matadero y 22 en productos de pollo. Además, tres clústeres comparten cepas de *Campylobacter* aisladas en dos etapas de la cadena alimentaria y en pacientes. La presente tesis, tiene una especial relevancia epidemiológica ya que el estudio se ha realizado en una misma región geográfica y durante el mismo tiempo relacionando todas las etapas. También, se ha realizado un estudio epidemiológico de la región, determinando que el sexo masculino y pacientes menores de 5 años (pediátricos) son los más afectados. Por último, es de destacar las altas tasas de resistencia a antibióticos encontradas en cepas aisladas durante toda la cadena alimentaria incluidas las de pacientes. *Campylobacter* fue especialmente resistente a ciprofloxacino, ácido nalidíxico y tetraciclinas. Asimismo, se han detectado varias cepas de *C. coli* que se pueden considerar como multi-resistentes.

---

Currently, campylobacteriosis is considered a public health problem in both developed and in developing countries, being the first cause of gastroenteritis of bacterial origin in humans. In 2016, the number of reported cases in the European Union was 246,307, showing an increase of 6.1 % over 2015. Although it is a self-limiting disease can lead to complications such as Guillain-Barré syndrome, Miller Fisher syndrome or extra-gastrointestinal clinical manifestations, requiring the use of antibiotics.

The consumption of poultry, especially chicken meat, is considered the greatest route of infection in humans. This thesis aims to deepen in a greater knowledge of the presence of *Campylobacter* spp. along the chicken food chain, 'from farm to fork', making special mention in the mechanisms involved in persistence, virulence and resistance to antibiotics. Therefore, this thesis has studied each step of the chicken food chain and its possible relationship with the incidence of campylobacteriosis in the same period of time.

Firstly, the presence of *Campylobacter* in poultry farms was studied in two seasons, autumn and spring, in order to determine the prevalence and the existing genotypic variability, as well as the virulence and resistance factors to different antibiotics in the isolated strains. This study was designed to know, in a real way, what the situation was in primary production and what genotype variability could exist. This data is useful; since later, the chickens are slaughtered in the slaughterhouse and can compromise food safety along the next steps of the food chain. The prevalence of *Campylobacter* was 42.9 % and

30.8 % in autumn and spring respectively, with *C. jejuni* being the most abundant species. Further; it was found the presence of the virulence genes *cadF*, *flaA*, *cdtA*, *cdtB* and *cdtC*

in this specie unlike *C. coli*. However, *C. coli* showed greater resistance to antibiotics; being some strains of this species classified as multi-resistant.

Secondly, the presence and variability of *Campylobacter* in a poultry slaughterhouse was studied in depth. The results showed a prevalence of 48.2 %. Using molecular typing (PFGE) and sequencing (MLST) techniques, these strains were analyzed and classified into seven pulsotypes: A (ST 443; ST 443 CC); B (ST 775; ST 52 CC); C (ST 904; ST 607 CC); D (ST 464; ST 464 CC); E, F (ST 1074; ST 460 CC) and G (ST 3769; ST 21 CC). Among these, pulsotypes G (63.1 %) and C (23 %) were the majority, being isolated for 17 and 21 days respectively, and independently of the corresponding farm and both before and after applying the cleaning and disinfection protocols. Using the wgMLST technique; it was determined that both populations were highly clonal, suggesting that both pulsotypes can remain in the slaughterhouse and processing plant environment, more than previously thought.

The mechanisms by which *Campylobacter* could survive in the environment are complex, since it is a multifactorial process, in which; biofilms formation, the presence of virulence genes and resistance to antimicrobial compounds, among others, may be involved. Based on the results obtained, the sequence type ST 904; ST 607 CC was the one that showed a greater capacity to form biofilms at different temperatures, in aerobic and microaerobic conditions and in different surfaces. In addition, it showed greater resistance to different antimicrobial compounds. This study suggests that the combination of small changes in the genome of the sequence type ST 904, including mutations and insertions in genes related to antimicrobial resistance, the presence of genes encoding the T6SS, as well as the presence of a large number of genes related to virulence factors, could explain their greater capacity to form biofilms. The sum of this set of small changes, could explain the duration, to survive and persist for longer periods of time, in hostile environmental conditions, such as the environment of the slaughterhouse.

Third, the prevalence and diversity of *Campylobacter* in commercial chicken products, both packaged (MAP) and unpacked, was studied. Based on the results, a prevalence of 39.4 % was obtained; unpacked products were those with the highest percentage of *Campylobacter* (45.3 %) compared to packaged products (33.6 %). In both cases, by typing technique (PFGE) a large number of pulsotypes was obtained, which indicates the great genetic variability existing in these products. Although the modified atmosphere can reduce the prevalence of microorganisms such as *Campylobacter* spp., it could not avoid its presence in packaged chicken products. The results suggest that some pulsotypes could persist in the environment of the processing plant from which they come or in the butcher shops, or in packaged products, for longer than initially thought. Therefore, it is necessary to establish stricter control measures in the previous steps of the food chain, to avoid the presence of *Campylobacter* spp., in chicken meat, as the last step in the food chain, before chicken products reaching the consumer and thus compromise public health.

Finally, this study has shown a genotypic relationship between strains of the chicken food chain and strains isolated in patients with campylobacteriosis. The results show that there were 35 clusters with shared isolated strains from both origins . Thus, it has been found that there are 9 clusters with strains shared on the farm, 4 at the slaughterhouse and 22 in chicken products. In addition, three clusters share isolated *Campylobacter* strains in two stages of the food chain and in patients. This thesis has a special epidemiological relevance since the study has been performed in the same geographical region and during the same time, relating all the chicken food chain. Also, an epidemiological study of the region was carried out, determining that the male sex and

patients under 5 years of age (pediatric) are the most affected. Finally, it is important to highlight the high rates of antibiotic resistances found in isolated strains throughout the chicken food chain, including those of patients. Campylobacter was especially resistant to ciprofloxacin, nalidixic acid and tetracyclines. Also, several strains of *C. coli* can be considered as multi-resistant.