

Arcobacter butzleri, un agente zoonótico en leche bovina

► Diana Inés Hualpa Salinas^{1a}, Rosa Janneth Simaluiza Masabanda^{2a*}, William Rodrigo Sauca Poma^{3a}, Heriberto Fernández Jaramillo^{4b}

¹ Magíster, Ingeniera en Industrias Agropecuarias.

² Magíster, Bioquímico Farmacéutico.

³ Bioquímico Farmacéutico.

⁴ Ph.D., Licenciado en Tecnología Médica.

^a Universidad Técnica Particular de Loja, Departamento Ciencias de la Salud, Ecuador.

^b Instituto de Microbiología Clínica. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

* Autor para correspondencia.

Resumen

Para la búsqueda de especies de *Arcobacter* fueron estudiadas 50 muestras de leche bovina obtenidas de los centros de acopio de la empresa láctea ECOLAC, de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe, Ecuador, y se aisló un total de ocho cepas de *Arcobacter butzleri* (16%). Esta frecuencia de aislamiento concuerda y está dentro de los rangos descritos en la literatura. Todas las cepas aisladas fueron sensibles a gentamicina. Se encontró alta frecuencia de resistencia a tetraciclina (6/8 cepas) y a ciprofloxacina (4/8 cepas). Se verificó la ocurrencia de multirresistencia en tres de las ocho cepas aisladas.

Palabras clave: *Arcobacter*; Zoonosis; Leche

Arcobacter butzleri, a zoonotic agent in bovine milk

Abstract

A total of 50 samples of bovine milk obtained from bulk tanks milk of the collection centers belonging to the company ECOLAC, of the provinces of Loja and Zamora Chinchipe, Ecuador, were studied for *Arcobacter* species diagnosis, being isolated 8 strains of *Arcobacter butzleri* (16%). This frequency of isolation agrees and falls within the ranges described in the literature. All the isolated strains were susceptible to gentamicin. High resistance levels to tetracycline and ciprofloxacin were found with 6/8 and 4/8 resistant strains respectively. Multi-resistance was found in three of the eight isolated strains.

Keywords: *Arcobacter*; Zoonosis; Milk

Arcobacter butzleri, um agente zoonótico em leite bovino

Resumo

Foram estudadas, para a pesquisa de espécies de *Arcobacter*, 50 amostras de leite bovino, obtidas dos centros de coleta da empresa de laticínios ECOLAC, das províncias de Loja e Zamora Chinchipe, Equador, sendo isoladas em total 8 cepas de *Arcobacter butzleri* (16%). Esta frequência de isolamento concorda e está dentro dos níveis descritos na literatura. Todas as cepas isoladas foram sensíveis à gentamicina. Foi encontrada alta frequência de resistência à tetraciclina (6/8 cepas) e à ciprofloxacina (4/8 cepas), sendo verificada a ocorrência de multirresistência em três das oito cepas isoladas.

Palavras-chave: *Arcobacter*; Zoonoses; Leite

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Introducción

Los primeros aislamientos de especies del género *Arcobacter* fueron realizados a partir de fetos bovinos y porcinos en 1977 y 1978 pero fueron descritos, inicialmente como *Vibrio/Spirillum*. Más tarde se les denominó “*aerotolerant Campylobacter-like microorganisms*” para, finalmente, ser incluidos en 1991 dentro del género *Arcobacter*, perteneciente a la familia *Campylobacteraceae* (1).

Desde entonces, el género *Arcobacter* ha experimentado una gran expansión y actualmente comprende 27 especies. Once de ellas han sido aisladas de muestras ambientales, siete de mariscos y moluscos y nueve de animales (aves y mamíferos) y de alimentos de origen animal (1). De entre las últimas nueve especies, solo *Arcobacter butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* y *A. thereius* han sido reconocidas como especies zoonóticas emergentes y a la vez, como patógenos de transmisión alimentaria capaces de producir diarrea y otros procesos infecciosos en el ser humano. También han sido asociadas a abortos, mastitis y diarrea en animales domésticos (1-4).

A. butzleri es la especie de este género más frecuentemente aislada, tanto de muestras clínicas como ambientales, de animales y de alimentos de origen animal, lo que demuestra su alto nivel de adaptación a diferentes nichos (5). En los últimos años su frecuencia de aislamiento desde casos clínicos ha ido en aumento y ha llegado a ser considerado como un riesgo para la salud humana (2).

Por otro lado, *A. butzleri* ha sido aislado con relativa alta frecuencia de materia fecal de animales sanos, incluyendo bovinos, los cuales pueden ser reservorio y fuente de contaminación de esta bacteria para alimentos de origen animal, como la leche por ejemplo (3) (4) (6).

Diversos estudios han demostrado la presencia de *A. butzleri* en leche con tasas de aislamiento que fluctúan entre el 5,8 y el 46% (3) (6) (7), como también se ha demostrado que su capacidad de supervivencia en leche es de seis días, tanto a 4 como a 10 °C, reforzando la posibilidad de que este alimento pueda ser vehículo de transmisión de *A. butzleri* para el ser humano (8).

Considerando que *A. butzleri* está adquiriendo cada vez más importancia en la salud pública y que el conocimiento a este respecto es reducido en América Latina, el objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia y los niveles de resistencia antimicrobiana de *A. butzleri* aislado de leche bovina en el sur de Ecuador.

Materiales y Métodos

Fueron estudiadas 50 muestras de leche bovina de 100 mL cada una, obtenidas de los centros de acopio de la empresa láctea ECOLAC, de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe, Ecuador. Las muestras fueron transportadas al laboratorio de microbiología

en recipientes estériles y bajo refrigeración hasta su posterior análisis.

Las muestras de leche fueron homogeneizadas en una proporción de 1:10 (9) colocando una alícuota de 12,5 mL de leche en 112,5 mL de *Arcobacter Enrichment Broth* adicionado de suplemento CAT (cefoperazona, anfotericina B, teicoplanina), extracto de levadura al 1% y sangre al 5%, el cual fue incubado a 30 °C durante 72 horas en aerobiosis. Finalizado el período de enriquecimiento, una alícuota de 200 µL de cada caldo fue filtrada por membrana de triacetato de celulosa de 0,45 µm de poro sobre agar sangre enriquecido con 1% de extracto de levadura (método de filtración pasiva) (4) (9). Las placas fueron incubadas por 48 a 72 horas a 30 °C en aerobiosis. Las cepas aisladas fueron identificadas preliminarmente por sus características fenotípicas (bacilos gram negativos, móviles, oxidasa y catalasa positivos) (4). La identificación definitiva fue realizada mediante la prueba de PCR múltiple propuesta por Doudiah *et al* (10) que caracteriza las cinco especies de *Arcobacter* más comúnmente asociadas al ser humano y a mamíferos (*A. butzleri*, *A. cibarius*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* y *A. thereius*).

La sensibilidad a gentamicina, ciprofloxacina, eritromicina, ampicilina y tetraciclina fue determinada por difusión con discos, utilizando el método estandarizado recomendado por el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing-EUCAST* (11), adaptado a las condiciones de crecimiento de *A. butzleri*. Los antibiogramas fueron realizados en agar Mueller-Hinton adicionado de un 5% de sangre equina desfibrinada y 20 mg/L de β-NAD. Antes de ser inoculadas, las placas fueron puestas a secar, abiertas y a 35 °C por 15 min. La turbidez de cada inóculo fue ajustada al tubo 0,5 de la escala de McFarland. Una vez inoculadas y agregados los discos, las placas fueron incubadas a 35-37 °C, en aerobiosis por 24 h para realizar, posteriormente, la lectura de los resultados. Las placas que a las 24 h mostraron escaso desarrollo fueron incubadas por 24 h adicionales, bajo las mismas condiciones. Los halos de inhibición fueron medidos por el anverso de la placa, sin tapa, utilizando un calibre y luz reflejada. Como control fue utilizada la cepa *A. butzleri* UACH 001, de sensibilidad conocida y de uso habitual en nuestros laboratorios.

Para definir sensibilidad o resistencia, fueron homologados para *A. butzleri* los puntos de corte de ciprofloxacina [S ≥26 mm, R <26 mm], eritromicina [S ≥20 mm, R <20 mm] y tetraciclina [S ≥30 mm, R <30 mm] (11) determinados por EUCAST en *Campylobacter jejuni*. Como las tablas actuales de EUCAST no proporcionan puntos de corte para gentamicina ni para ampicilina (11), en estos casos fueron utilizados los puntos de corte sugeridos el año 2019 por este Comité (gentamicina S ≥17 mm, R <17 mm; ampicilina S ≥19 mm, R <14 mm) (12).

Fueron consideradas como multirresistentes, aquellas cepas que presentaron resistencia simultánea al menos a tres de los antimicrobianos ensayados (7).

Resultados

De las 50 muestras de leche estudiadas, ocho (16%) fueron positivas para *Arcobacter*. Todos los aislamientos correspondieron a la especie *A. butzleri*. A las cepas aisladas se les realizó antibiograma y se observó, como se indica en la Tabla I, que todas fueron sensibles a gentamicina. Solo una cepa (cepa N°8) fue sensible a todos los antibióticos ensayados mientras que las siete restantes presentaron diferentes grados de resistencia. Se observó una alta frecuencia de resistencia a tetraciclina (6/8 cepas), seguida por ciprofloxacina con 4/8 cepas y por eritromicina y ampicilina con 3/8 cepas cada una. Tres de las ocho cepas aisladas resultaron ser multirresistentes.

Discusión y Conclusiones

La frecuencia de aislamiento de especies de *Arcobacter* desde leche cruda, reportada en varios países, fluctúa entre el 5,8 y el 46% (3) (6) (7). El 16% de muestras positivas encontradas en este estudio está dentro del rango de los hallazgos hechos por otros autores y coincide con la frecuencia encontrada por Caruso *et al.* en Italia utilizando PCR como herramienta diagnóstica (13). Coincidiendo con los estudios de Caruso *et al.* (13) y

también con los de Parisi *et al.* (7) y de Serraino y Giacometti (14), la única especie aislada fue *A. butzleri* la cual, en general, es la aislada con mayor frecuencia de varios tipos de muestra, incluyendo la leche (3) (5). En América Latina, la única referencia sobre *Arcobacter* en leche se originó en Brasil, donde el 18,8% de las muestras fueron positivas para *Arcobacter*, y se aislaron las especies *A. cryaerophilus* (15,6%) y *A. butzleri* (3,1%) (9). Concordando con Collado y Figueras (3) pensamos que tal vez las diferencias observadas en la literatura con relación a las tasas de aislamiento de *Arcobacter* en leche puedan deberse, no solo a la falta de protocolos estandarizados y universalmente aceptados, sino también a factores del entorno donde se toman las muestras, como son el nivel de higiene en el lugar de producción, la presencia de otras aves e insectos, la calidad del agua utilizada, factores climáticos, la sanidad del rebaño, entre otros.

Como se señala en la Tabla I, siete de las cepas aisladas presentaron resistencia al menos a uno de los antibióticos ensayados mientras que una fue sensible a todos ellos. Ninguna cepa fue resistente a gentamicina, pero un alto número de ellas lo fue para tetraciclina (6/8) y ciprofloxacina (4/8). La presencia de resistencia a eritromicina y ampicilina fue más baja. Adicionalmente, fueron aisladas cepas multirresistentes (3/8). Estos resultados coinciden con los de Parisi *et al.* (7), quienes encontraron en cepas de *A. butzleri* aisladas

Tabla I. Sensibilidad a los antibióticos de ocho cepas de *Arcobacter butzleri* aisladas de leche bovina

CEPA NÚMERO	RESULTADOS DEL ANTIBIOGRAMA					MR
	GM (mm)	CIP (mm)	E (mm)	AM (mm)	TE (mm)	
1	S (30)	S (38)	R (17)	R (9)	R (21)	+
2	S (38)	S (42)	S (25)	R (8)	S (33)	-
3	S (34)	R (7)	R (16)	S (26)	R (25)	+
4	S (30)	R (6)	S (22)	S (23)	R (25)	-
5	S (29)	S (33)	S (23)	R (6)	R (21)	-
6	S (27)	R (6)	R (17)	S (22)	R (23)	+
7	S (30)	R (6)	S (20)	S (20)	R (25)	-
8	S (32)	S (33)	S (36)	S (20)	S (30)	-
UACH 001 (control)	S (22)	S (32)	S (28)	R (12)	R (18)	-
CEPAS R	0/8	4/8	3/8	3/8	6/8	
CEPAS S	8/8	4/8	5/8	5/8	2/8	

S= sensible; R= resistente; MR= multirresistente; GM= gentamicina, CIP= ciprofloxacina; E= eritromicina; AM= ampicilina; TE= tetraciclina.

de leche, una alta frecuencia de genes de resistencia a fluoroquinolonas y tetraciclina, una frecuencia menor de determinantes genéticos de resistencia para eritromicina y ampicilina y la coexistencia de varios de ellos, denotando multiresistencia. Datos similares han sido presentados también por Shah *et al.* (15) en ganado bovino. La existencia de cepas de *Arcobacter* resistentes y multiresistentes en el ganado explica la presencia de este tipo de cepas en leche, de lo que se puede inferir, como ocurre con *Campylobacter*, que esta resistencia pueda ser atribuida al uso de estos antibióticos en medicina veterinaria (14).

Teniendo presente que i) *A. butzleri* se encuentra contaminando leche bovina destinada a consumo humano, ii) que tiene capacidad de sobrevivencia en leche (8) y de contaminar alimentos lácteos como diferentes tipos de quesos (9) y iii) que además presenta resistencia a varios antibióticos de uso clínico, se hace necesario realizar estudios de más largo alcance para definir la real magnitud del problema de la resistencia a los antibióticos y de los aspectos epidemiológicos asociados a esta bacteria zoonótica emergente.

Fuentes de financiación

Proyecto PROY_CCSAL_1283

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Correspondencia

Dra. ROSA JANNETH SIMALUIZA-MASABANDA
Universidad Técnica Particular de Loja
Departamento Ciencias de la Salud.
San Cayetano Alto s/n. LOJA, Ecuador
Correo electrónico: rjsimaluizal@utpl.edu.ec

Referencias bibliográficas

- Pérez-Cataluña A, Salas-Massó N, Diéguez AL, Balboa S, Lema A, Romalde JL, *et al.* Revisiting the taxonomy of the genus *Arcobacter*: getting order from the chaos. *Front Microbiol* 2018; 9: 2.077.
- van den Abeele A, Vogelaers D, van Hende J, Houf K. Prevalence of *Arcobacter* species among humans, Belgium, 2008-2013. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 1.731-4.
- Collado L, Figueras M. Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24: 174-92.
- Fernandez H, Villanueva MP, Mansilla I, González M, Latif F. *Arcobacter butzleri* and *A. cryaerophilus* in human, animals and food sources, in southern Chile. *Braz J Microbiol* 2015; 46: 145-7.
- Merga JY, Williams NJ, Miller WG, Leatherbarrow AJ, Bennett M, Hall N, *et al.* Exploring the diversity of *Arcobacter butzleri* from cattle in the UK using MLST and whole genome sequencing. *PLoS One* 2013; 8: e55240.
- Ramees TP, Dhama K, Karthik K, Rathore RS, Kumar A, Saminathan M, *et al.* *Arcobacter*: an emerging foodborne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control – a comprehensive review. *Vet Quart* 2017; 37: 136-61.
- Parisi A, Capozzi L, Bianco A, Caruso M, Latorre L, Costa A, *et al.* Identification of virulence and antibiotic resistance factors in *Arcobacter butzleri* isolated from bovine milk by whole genome sequencing. *Int J Food Safety* 2019; 8: 7.840.
- Giacometti F, Serraino A, Pasquali F, De Cesare A, Bonerba E, Rosmini R. Behavior of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* in ultrahigh-temperature, pasteurized, and raw cow's milk under different temperature conditions. *Foodborne Pathog Dis* 2014; 11: 15–20.
- Pianta C, Thompsen Passos D, Hepp D, de Oliveira SJ. Isolation of *Arcobacter* spp. from the milk of dairy cows in Brazil. *Ciência Rural* 2007; 37: 171-4.
- Doudiah L, De Zutter L, Vandamme P, Houf K. Identification of five human and mammal associated *Arcobacter* species by a novel multiplex-PCR assay. *J Microbiol Methods* 2010; 80: 281-6.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 10.0, 2020. Disponible en: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/. Fecha de acceso: 8 de junio de 2019.
- Société Française de Microbiologie. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2018 V.2.0 Septembre 2018. Disponible en: https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2018/12/CASFMV2_SEPTEMBRE2018.pdf. Fecha de acceso: 8 de junio de 2019.
- Caruso M, Latorre L, Santagada G, Fracalvieri R, Difato LM, Miccolupo A, *et al.* *Arcobacter* spp. in bovine milk: An emerging pathogen with potential zoonotic risk. *Int J Food Safety* 2018; 7: 7.685.
- Serraino A, Giacometti F. Occurrence of *Arcobacter* species in industrial dairy plants. *J Dairy Sci* 2014; 97: 2.061-5.
- Shah AH, Saleha AA, Zunita Z, Murugaiyah M, Aliyu AB, Jafri N. Prevalence, distribution and antibiotic resistance of emergent *Arcobacter* spp. from clinically healthy cattle and goats. *Transbound Emerg Dis* 2013; 60: 9-16.

Recibido: 8 de julio de 2019

Aceptado: 27 de enero de 2020