

Estudio de eficacia de Ox-Virin frente a *Campylobacter jejuni*

M. SOMOLINOS*

OX-CTA, Edificio OX, PT Walqa, Ctra. Zaragoza Km 566, 22197 Cuarte (Huesca), España.

*Corresponding author email: msomolinos@oxcta.com

RESUMEN

Las bacterias son los patógenos microbianos responsables de la mayor parte de las toxiinfecciones de origen alimentario en la UE. La campilobacteriosis se debe principalmente al consumo de alimentos contaminados con *Campylobacter jejuni*. En los últimos años esta bacteria es una de las más frecuentemente implicadas en toxiinfecciones alimentarias en la UE, siendo la carne de ave su principal vehículo transmisor.

Se está llevando a cabo un gran esfuerzo investigador con objeto de establecer protocolos de trabajo eficaces que garanticen una correcta gestión de la bioseguridad a lo largo de toda la cadena alimentaria. Estos programas de trabajo deben incluir el uso de productos desinfectantes eficaces frente a *Campylobacter jejuni*.

El presente trabajo tiene como principal objetivo el estudio de la eficacia del biocida OX-VIRIN, desinfectante de élite, 100% biodegradable y que no genera residuos tóxicos, sobre el microorganismo *Campylobacter jejuni*.

La evaluación de la resistencia de *Campylobacter jejuni* NCTC 11351 en fase estacionaria de crecimiento a OX-VIRIN se llevó a cabo en un medio rico en materia orgánica (3% de albúmina sérica bovina). Una vez realizados los tratamientos con OX-VIRIN se utilizó una solución de tiosulfato sódico al 1% para neutralizar el biocida. El cultivo de este microorganismo se realizó en una cámara de incubación de atmósfera controlada en condiciones de microaerofilia (5% de oxígeno, 10% de dióxido de carbono y 85% de nitrógeno).

Con objeto de caracterizar la resistencia del microorganismo a OX-VIRIN, se estudió la eficacia letal de este producto a concentraciones inferiores a las recomendadas por el fabricante, y se obtuvieron las gráficas de supervivencia. Los resultados obtenidos demostraron que la utilización del producto OX-VIRIN, a concentraciones de entre 0,5 y 5% y durante tiempos de contacto comprendidos entre 0,5 y 30 minutos, resulta eficaz para la inactivación de más de 5 ciclos logarítmicos de la población de *Campylobacter jejuni*.

La gran eficacia biocida mostrada por OX-VIRIN frente a *Campylobacter jejuni* pone de manifiesto que la utilización de este producto mediante protocolos de trabajo específicos puede ser de gran utilidad para garantizar la seguridad de los productos a lo largo de toda la cadena alimentaria.

Palabras clave: OX-VIRIN; *Campylobacter*; eficacia; bioseguridad.

ABSTRACT

Bacteria are the microbial pathogens responsible of most foodborne diseases in the EU. Campilobacteriosis is mainly due to consumption of food contaminated with Campylobacter jejuni. In recent years, this bacterium is one of the most frequently implicated in foodborne diseases in the EU and poultry meat is considered the main vehicle of transmission.

A great research effort is being carried out in order to establish effective working protocols that ensure the proper management of biosecurity throughout the food chain. These work programs should include the use of disinfectants effective against Campylobacter jejuni.

The main objective of this research work was the study of the effectiveness of the biocide OX-VIRIN, against the microorganism *Campylobacter jejuni*. OX-VIRIN is an elite disinfectant, 100% biodegradable and not toxic for humans, animals and the environment.

The evaluation of the resistance of *Campylobacter jejuni* NCTC 11351 in stationary growth phase to OX-VIRIN was conducted in a treatment medium rich in organic matter (3% bovine serum albumin). After the treatment with OX-VIRIN, the disinfectant was neutralized using a solution of 1% sodium thiosulfate. The growth of the microorganism was carried out under microaerophilic conditions in an incubation chamber with controlled atmosphere (5% oxygen, 10% carbon dioxide and 85% nitrogen).

To characterize the resistance of *Campylobacter jejuni* to OX-VIRIN, the lethal effect of this product at levels below those recommended by the manufacturer was studied. The survival graphs obtained showed that the use of OX-VIRIN, at concentrations between 0.5 and 5% after 0.5 - 30 minutes of contact time, is effective for the inactivation of more than 5 log cycles of population of *Campylobacter jejuni*.

The high biocidal effectiveness demonstrated by OX-VIRIN against *Campylobacter jejuni* reveals that the use of this product by specific working protocols could be very useful to ensure the safety of products throughout the food chain.

INTRODUCCIÓN

Campylobacter es una de las bacterias más frecuentemente implicadas en toxiinfecciones alimentarias en la UE (EFSA, 2008). La campilobacteriosis en humanos está causada principalmente por cepas de *Campylobacter* termotolerantes (EFSA, 2008). La dosis infectiva de estas bacterias es generalmente baja y las especies más comúnmente asociadas a las infecciones en humanos son *C. jejuni*, seguida de *C. coli* y *C. lari* (ICMSF, 1996; EFSA, 2008). Estos microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo su principal reservorio el tracto gastrointestinal de los animales de sangre caliente (Oyarzábal et al., 1995). *Campylobacter* spp. se ha detectado ampliamente en animales de abasto (aves, ganado vacuno, porcino, ovino), mascotas (incluyendo perros y gatos), aves salvajes y fuentes naturales de agua (EFSA, 2008). Sin embargo, los animales raramente muestran signos clínicos a causa de la infección por esta bacteria.

La importancia de *Campylobacter* spp. radica fundamentalmente en su extraordinaria capacidad para contaminar rápidamente los alimentos, incluyendo la carne, la leche y los productos lácteos, los productos de la pesca y los vegetales crudos. El consumo de carne de ave se ha señalado como el principal factor de riesgo de la transmisión de la enfermedad al hombre (Jorgensen et al., 2002; ACMSF, 2005; EFSA, 2008), aunque cabe destacar que la contaminación cruzada puede jugar un papel esencial en la difusión de esta bacteria. La carne cruda de pollo puede contener niveles muy altos de contaminación ($>10^7$ UFC por canal) (Jorgensen et al., 2002), propiciando una contaminación cruzada durante la manipulación de alimentos en las cocinas de restaurantes y hogares. Es muy común que *Campylobacter* se disemine por las cocinas durante la preparación de los alimentos. Los datos demuestran que el recuento de *Campylobacter* en las carcasas de los pollos permanece invariable durante más de 7 días a temperaturas de refrigeración (Jorgensen et al., 2002). Se ha demostrado también que esta bacteria es capaz de sobrevivir durante más de 4 meses en el agua a bajas temperaturas (Hazeleger et al., 1998), en las plantas de procesado de alimentos (Cools et al., 2005) y en el ambiente (Park, 2002).

Dado que *Campylobacter* no es capaz de multiplicarse en presencia de niveles atmosféricos de oxígeno, es difícil que esta bacteria llegue a multiplicarse en los alimentos. Por ello, para garantizar la seguridad alimentaria es fundamental la gestión eficaz de la bioseguridad con objeto de reducir o evitar la contaminación con este microorganismo en las granjas y en las plantas de procesado de los alimentos. La diseminación de este microorganismo a nivel de granjas es muy rápida, y fundamentalmente debida a la transmisión horizontal (García et al., 2005), por lo tanto, las medidas de bioseguridad son esenciales para llevar a cabo un control eficaz.

Teniendo todo esto en cuenta, con objeto de diseñar programas eficaces para la gestión de la bioseguridad a lo largo de toda la cadena alimentaria, es necesario incluir el uso de desinfectantes eficaces frente a *Campylobacter*.

OX-VIRIN es un desinfectante de amplio espectro que cumple con las siguientes normas de eficacia: UNE EN 1276:1998, UNE EN 1650:1998, UNE EN 1656:2000, UNE EN 1657:2007, UNE EN 13697:2001, UNE-EN 14675:2007 y UNE EN 14476. Este producto es 100% biodegradable y presenta nula toxicidad. Además, presenta una acción rápida y eficaz a dosis bajas incluso a temperaturas de refrigeración.

Teniendo en cuenta las ventajas que ofrece el producto OX-VIRIN se planteó la posibilidad de utilizar este desinfectante en programas de gestión de bioseguridad que incluyeran el control de *Campylobacter*. Por ello, el objetivo fundamental de este trabajo fue evaluar la eficacia letal del desinfectante OX-VIRIN sobre *Campylobacter jejuni*, a las concentraciones de trabajo normalmente recomendadas por el fabricante y en un medio de tratamiento rico en materia orgánica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismo

La cepa utilizada en este estudio fue *Campylobacter jejuni* NCTC 11351. La cepa fue suministrada por la National Collection of Type Cultures (Reino Unido) y mantenida en crioviales a -80°C hasta el momento de su uso.

Medios de cultivo

Se utilizó como medio líquido de cultivo el caldo Brucella (Becton, Dickinson and Company, Sparks, EEUU) enriquecido con los agentes reductores sulfato de hierro, metabisulfito de sodio y piruvato de sodio (suplemento BBFBP).

Como medio sólido de propagación y recuperación se utilizó agar tripticasa soja suplementado con un 0,6% de extracto de levadura (Biolife, Italia) y un 0,1% de piruvato de sodio (Panreac, España) (TSAELP).

La preparación de los medios se realizó según las indicaciones del fabricante. Todos los medios, una vez preparados, se esterizaron durante 20 minutos a 121°C en autoclave y se almacenaron en refrigeración ($4 \pm 2^\circ\text{C}$) hasta el momento de su uso.

Obtención de las suspensiones de trabajo

Para realizar este estudio se utilizaron microorganismos en la fase estacionaria de crecimiento. Para obtener las suspensiones se siguió la metodología que se explica a continuación:

Se revitalizó el cultivo congelado realizando una siembra por agotamiento en estría y se inoculó, con una colonia aislada, un bote con 10 ml de caldo estéril, que se incubó 12 horas a 37°C (precultivo). Tras la incubación se sembró un frasco que contenía 50 ml de caldo estéril con 50 μl del precultivo. Este frasco se incubó en agitación a 37°C hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento, tras 24 horas, que se correspondía con una concentración aproximada de 10^9 microorganismos/ml.

Tal y como se recomienda para el cultivo de este microorganismo, todas las incubaciones se llevaron a cabo en atmósfera de microaerofilia (5% oxígeno, 10% dióxido de carbono y 85% nitrógeno) en una cámara de incubación en atmósfera controlada (MACS VA 500 Don Whitley, Otley, United Kingdom).

Evaluación de la resistencia a OX-VIRIN

Los tratamientos biocidas se realizaron en 10 mL de agua estéril con un 3% de albúmina sérica bovina añadida (BSA) (Fluka, Biochemika). Dada la imposibilidad de esterilizar este medio en autoclave, se comprobó mediante recuento en placa que no contenía microorganismos contaminantes

que pudieran enmascarar los resultados de las pruebas de resistencia, y por lo tanto no se consideró necesario esterilizar por filtración o por cualquier otro método adicional.

Para cada tratamiento, se tomaron 2 mL de la suspensión en fase estacionaria de crecimiento de *Campylobacter jejuni*, se centrifugaron en tubos eppendorf a 10.000 g durante tres minutos y se resuspendieron en el medio de tratamiento. A continuación se inocularon los 2 mL en 8 mL del medio de tratamiento, se agitó la mezcla y se tomó una muestra de 100 µl para realizar la estimación del número inicial de microorganismos mediante recuento en placa por siembra en superficie. Seguidamente se añadió la cantidad de desinfectante necesaria para obtener en el tubo universal las diferentes concentraciones de trabajo (5, 2, 1, y 0.5 %). Tras agitar, se extrajeron muestras de 100 µl tras los tiempos de contacto prefijados (0.5, 1, 2, 5, 10, 20 y 30 minutos). Dichas muestras se depositaron directamente en un tubo eppendorf que contenía 900 µl de una solución de tiosulfato de sodio al 1% en agua destilada para la neutralización del desinfectante.

Posteriormente cada muestra se diluyó en MRD (Maximum Recovery Diluent) (Oxoid Basingstoke, Hampshire, England) y se procedió a su siembra en superficie en placas de TSAELP. Los recuentos de supervivientes se llevaron a cabo tras 72 horas de incubación a 37°C en condiciones de microaerofilia.

Estos experimentos se realizaron por cuadruplicado en días independientes de trabajo y siempre utilizando suspensiones microbianas frescas.

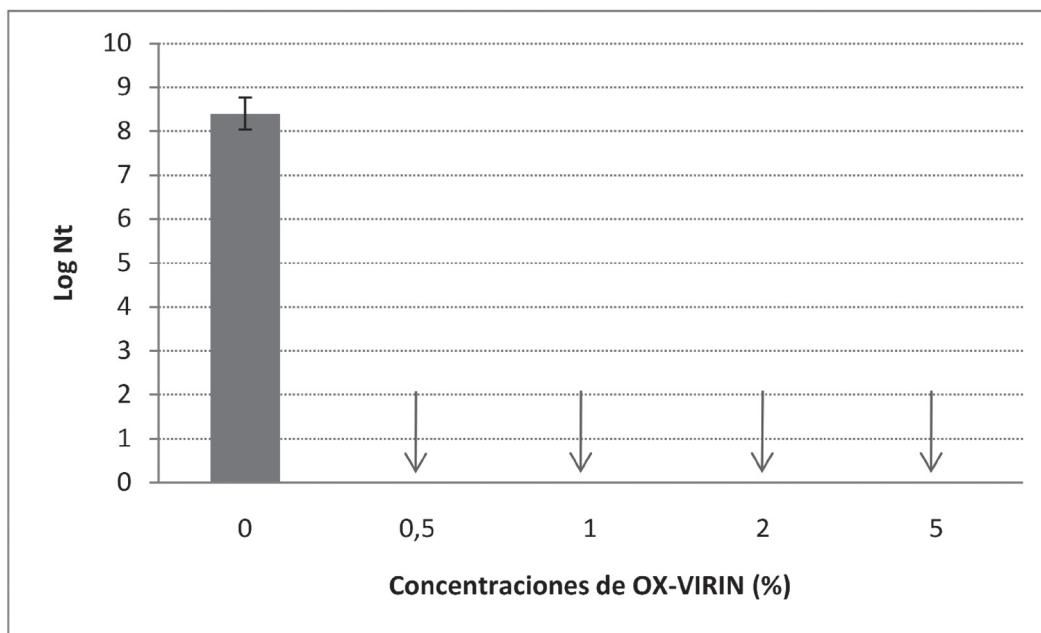
Tal y como se muestra en el apartado de resultados, con objeto de obtener mayor información acerca de la resistencia de *C. jejuni* a este desinfectante, se realizaron determinaciones puntuales de resistencia a concentraciones inferiores a las señaladas anteriormente.

RESULTADOS

Todos los tratamientos llevados a cabo con concentraciones del 0.5% al 5% de OX-VIRIN mostraron ausencia total de supervivientes tras todos los tiempos de exposición estudiados, incluyendo los tiempos más cortos (0.5 o 1 minuto).

La figura 1 muestra el número de supervivientes de *C. jejuni* tras exposiciones de 1 minuto a OX-VIRIN a concentraciones del 0.5, 1, 2 y 5%.

Figura 1. Número de supervivientes de *C. jejuni* tras exposiciones de 1 minuto a OX-VIRIN a concentraciones de 0 (control), 0,5, 1, 2 y 5%. Las flechas rojas indican recuentos de 0 ufc/placa, indicativos de número de supervivientes inferiores a 50 ufc/mL. Los resultados corresponden a cuatro experimentos independientes.



Por otro lado, la figura 2 muestra los resultados correspondientes a las cuatro concentraciones de OX-VIRIN testadas tras la exposición a diferentes tiempos comprendidos entre 0.5 y 30 minutos. Como se puede observar en las gráficas, tiempos de exposición al desinfectante de 0.5 minutos fueron suficientes para garantizar la ausencia total de supervivientes en todos los casos, lo que, dado el recuento inicial y el límite de detección de la técnica de recuento, indica una inactivación, de al menos, 5.7 ciclos logarítmicos en la población de *C. jejuni*.

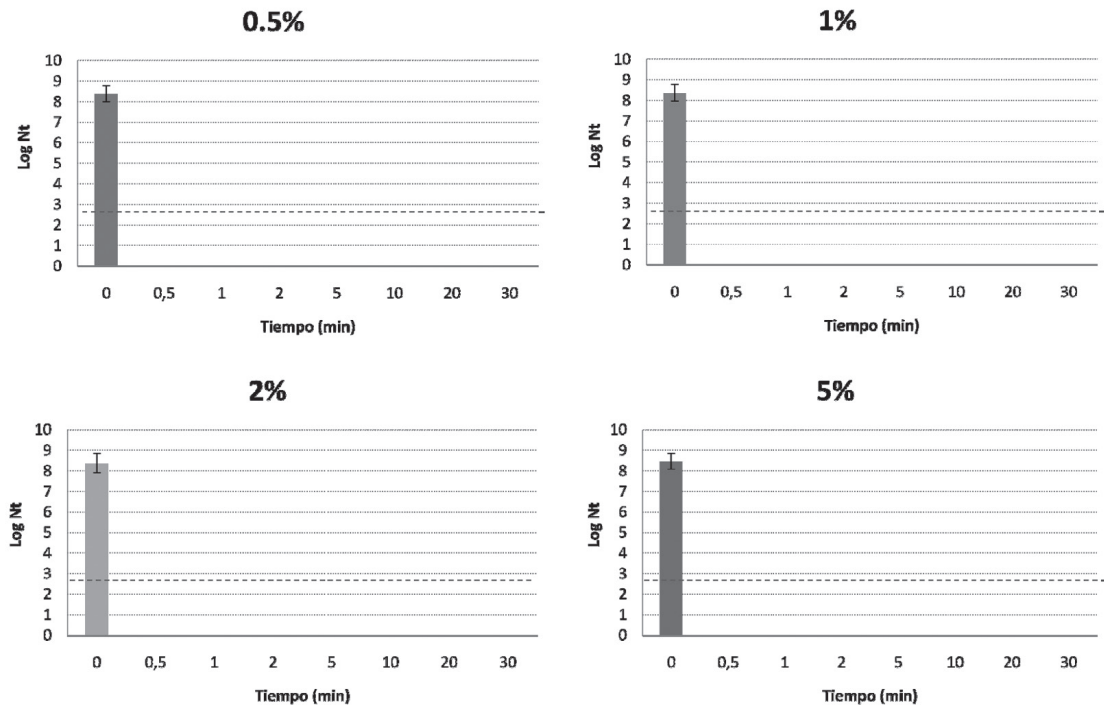
Esta gran eficacia del desinfectante OX-VIRIN sobre *C. jejuni* fue muy probablemente debida a la sensibilidad de este microorganismo al estrés oxidativo. Puesto que en la formulación del producto OX-VIRIN se incluyen como agentes activos compuestos con gran capacidad oxidante como el peróxido de hidrógeno, se podrían estar alterando las envolturas celulares del microorganismo de forma irreversible. Este hecho, podría facilitar el paso del ácido peracético (otro de los compuestos activos que incluye el producto) al interior celular, donde ejercería su acción antimicrobiana.

Estos resultados estarían en concordancia con los presentados por otros autores (Humphrey, 1988; Sagarzazu, 2010) que ponían de manifiesto la extraordinaria sensibilidad de este microorganismo al estrés oxidativo, y por lo tanto al oxígeno y los productos de su reducción. Esta sensibilidad seguramente se debe a que *Campylobacter* spp. carece de muchos sistemas de regulación frente al estrés oxidativo (como *SoxRS* y *OxyRS*) presentes en otras bacterias como *Salmonella* spp. y *E. coli*.

Sin embargo, debido a su condición de microaerófilo, *Campylobacter* spp. debe protegerse de alguna manera del estrés oxidativo y de los productos tóxicos resultantes del metabolismo del oxígeno. La proteína superóxido dismutasa SodB, elimina los aniones superóxido (Purdy, 1999). Este microorganismo posee también una catalasa (KatA) que degrada el peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno (Grant y Park, 1995) y la alquilhidroxidoperoxidasa AhpC, participa en la detoxificación reparando las moléculas que han sido peroxidadas (Baillon et al., 1999).

A pesar de estos sistemas de protección, el desinfectante OX-VIRIN mostró una gran eficacia frente a *Campylobacter*, probablemente debido a la acción sinérgica de sus componentes activos y a la estabilización de los mismos con un núcleo exclusivo.

Figura 2. Recuentos obtenidos tras 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 y 30 min de contacto con concentraciones de OX-VIRIN de 0.5, 1, 2 y 5%. La línea roja discontinua marca el límite de detección mínimo. Los resultados corresponden a cuatro experimentos independientes.



Dada la enorme eficacia mostrada por OX-VIRIN en las pruebas anteriormente descritas, se realizaron además ensayos cruzados para descartar posibles artefactos metodológicos que pudieran estar enmascarando los resultados, ya que en ocasiones se ha descrito cómo este microorganismo pierde viabilidad tras ser suspendido en determinados medios de laboratorio. Estos ensayos demostraron que los recuentos de *C. jejuni* en el medio de tratamiento en ausencia de OX-VIRIN (agua destilada con un 3% de BSA) permanecían estables durante 30 minutos (datos no mostrados). Por lo tanto, la pérdida de viabilidad observada en los experimentos previos puede considerarse debida únicamente a la acción del desinfectante.

Con objeto de caracterizar más profundamente la resistencia del microorganismo al desinfectante objeto de estudio, se investigó la eficacia letal de concentraciones entre 0.1 y 0.001% de desinfectante (figura 3), y se obtuvieron las gráficas de supervivencia (figura 4).

Como se puede observar en estas figuras, la exposición de *C. jejuni* durante 1 minuto a concentraciones de OX-VIRIN de hasta 10 veces inferiores a las mínimas recomendadas por el fabricante logran la inactivación, de al menos, 5.8 ciclos logarítmicos de inactivación.

Este hecho garantiza el éxito de la correcta desinfección en condiciones reales de trabajo utilizando los programas de gestión de bioseguridad elaborados específicamente para el control de *C. jejuni* con este desinfectante.

Además, la gráfica de supervivencia en presencia de OX-VIRIN al 0.01% representada en la figura 4 indica que tras 10 minutos de exposición a dicha concentración se produce un descenso de al menos 6.9 ciclos logarítmicos en la población de *C. jejuni*.

Figura 3. Ciclos logarítmicos de inactivación obtenidos con concentraciones de OX-VIRIN entre 0.1 y 0.001%, tras 1 minuto de contacto. Las flechas rojas indican recuentos de 0 ufc/placa (menos de 50 ufc/ml)

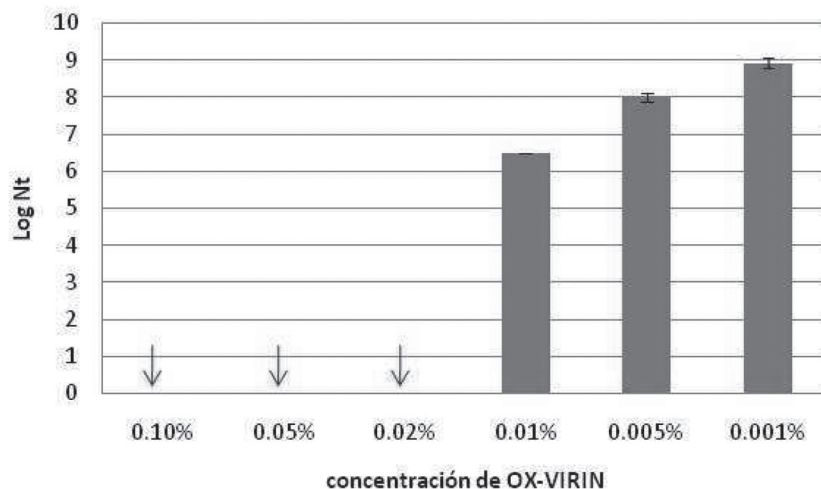
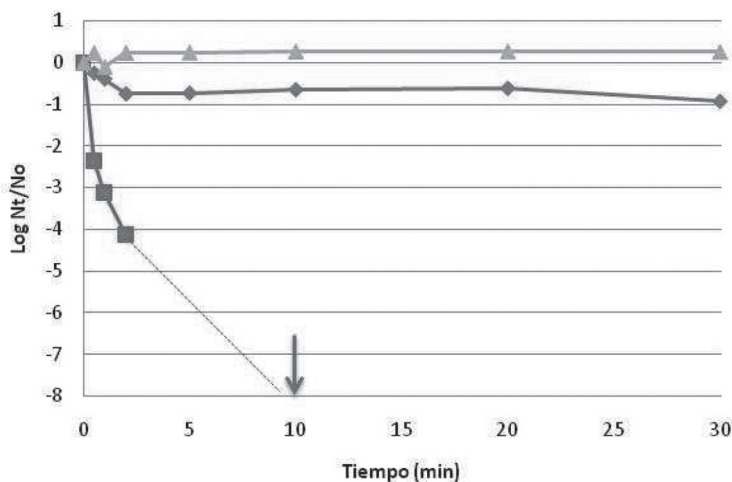


Figura 4. Gráficas de supervivencia de *C. jejuni* expuesto a OX-VIRIN al 0.01% (rojo), 0.005% (color azul) y al 0.001% (color verde)



En conclusión, las investigaciones descritas anteriormente ponen de manifiesto que el producto biocida OX-VIRIN, utilizado a concentraciones de entre 0.5 y 5 %, resulta eficaz para la inactivación de más de 5 ciclos logarítmicos de la población de *Campylobacter jejuni* NCTC 11351 en fase estacionaria de crecimiento tras tiempos de exposición de, tan solo, 0.5 minutos.

La gran eficacia biocida de este producto, junto con su facilidad de aplicación, inocuidad y biodegradabilidad, ponen de manifiesto su utilidad en los programas de control de *Campylobacter* a lo largo de toda la cadena alimentaria.

REFERENCIAS

ADVISORY COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD (ACMSF) (2005) Second Report on *Campylobacter*. Food Standards Agency. **FSA/0986/0605**.

BAILLON, M.L.A., VAN VLIET, A.H.M., KETLEY, J.M., CONSTANTINIDOU, C. and PENN, C.W. (1999) An iron-regulated alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) confers aerotolerance and oxidative stress resistance to the microaerophilic pathogen *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology* 181: 4798-4804.

COOLS, I., UYTENDAELE, M., CERPENTIER, J., D'HAESE, E., NELIS, H.J. and DEBEVERE, J. (2005) Persistence of *Campylobacter jejuni* on surfaces in processing environments and on cutting boards. *Letters in Applied Microbiology* 40: 418-423.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2008) The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *The EFSA Journal* (2010) 1496.

GARCÍA, F.J., ABAD, J.C., PÉREZ, D., HURTADO, M.D. and ECHEITA, A. (2005) Importancia de *Campylobacter* en avicultura. *Selecciones Avícolas* Febrero: 85-90.

GRANT, K.A. y PARK, S.F. (1995) Molecular characterisation of *katA* from *Campylobacter jejuni* and generation of a catalase-deficient mutant of *Campylobacter coli* by interspecific allelic exchange. *Microbiology* 141: 1369-1376.

HAZELEGER, W.C., WOUTERS, J.A., ROMBOUITS, F.M. and ABEE, T. (1998) Physiological activity of *Campylobacter jejuni* far below the minimal growth temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3917-3922.

HUMPHREY, T. (1988) Peroxide sensitivity and catalase activity in *Campylobacter jejuni* after injury and during recovery. *Journal of Applied Bacteriology* 64: 337-343.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF) (1996) *Campylobacter*, in: *Microorganisms in Foods 5: Characteristics of Microbial Pathogens* (Roberts, T.A., Baird-Parker, A.C. y Tompkin, R.B., Eds.), pp 45-65, London: Blackie Academic and Professional.

JORGENSEN, F., BAILEY, R., WILLIAMS, S., HENDERSON, P., WAREING, D.R. and BOLTON, F.J. (2002) Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw, whole chicken in relation to sampling methods. *International Journal of Food Microbiology* 76: 151-164.

OYARZÁBAL, O.A., CONNER, D.E. and HOERR, F.J. (1995) Incidence of *Campylobacter* in the intestine of avian species in Alabama. *Avian Diseases* 39: 147-151.

PARK, S.F. (2002) The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. 74: 177-188.

PURDY, D., CAWTHRAW, S., DICKINSON, J.H., NEWELL, D.G. and PARK, S.F. (1999) Generation of a superoxide dismutase (SOD)-deficient mutant of *Campylobacter coli*: evidence for the significance of SOD in *Campylobacter* survival and colonization. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2540-2546.

SAGARZAZU, N. (2010) Estudio del desarrollo de respuestas de adaptación al estrés en microorganismos de interés en los alimentos. Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza.