

## ARTICULOS ORIGINALES

### Concentración Inhibitoria Mínima de cepas de *Campylobacter jejuni* aisladas de una población definida de la provincia de Buenos Aires

Florencia L. Pantozzi 1, Clara López 2, Gabriela I. Giacoboni 1

1- Laboratorio de Diagnostico e Investigaciones Bacteriologicas Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. 2- Catedra de Salud Publica. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires.

#### Introducción

La infección por *Campylobacter* spp. es una de las causas emergentes de diarrea bacteriana a nivel mundial<sup>1</sup>. Más del 90 % de las infecciones son causadas por *Campylobacter jejuni*, las restantes, en su mayoría están representadas por *Campylobacter coli*, siendo *Campylobacter lari* aislado en <1% de los casos. *Campylobacter upsaliensis* y *Campylobacter fetus*, son ocasionalmente aislados en casos clínicos<sup>2</sup>. La diarrea causada por estos microorganismos es generalmente autolimitada con una duración de 2 a 5 días aunque puede persistir por 2 semanas o más. La terapia antimicrobiana no es necesaria, excepto en casos severos y en enfermedad prolongada, así como en pacientes inmunocomprometidos<sup>3,4</sup>. Los macrólidos y las fluorquinolonas son las drogas de elección en el tratamiento empírico para este tipo de gastroenteritis<sup>5,6</sup>. Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado el aislamiento de *Campylobacter* resistentes a estos antimicrobianos<sup>7-10</sup>.

La infección por *Campylobacter* es predominantemente una enfermedad zoonótica dado el comensalismo y la adaptación específica al tracto gastrointestinal de animales domésticos y salvajes. *Campylobacter* coloniza el intestino de muchas especies animales, siendo el consumo de pollo contaminado el mayor riesgo de adquirir la enfermedad. Estudios de tipificación genética han demostrado que algunos aislamientos de infecciones en humanos no son capaces de colonizar pollos y viceversa, algunos aislamientos que colonizan pollos no infectan al humano<sup>11-13</sup>. La implicancia a partir de estos hallazgos demuestra que existirían otras fuentes de infección de importancia en el desarrollo de la enfermedad en humanos y que posiblemente no todas las especies de *Campylobacter* son patógenos para los mismos.

El consumo de leche no pasteurizada y agua contaminada, como el contacto con animales de compañía y bovinos son otros factores de riesgo determinados en estudios de caso control<sup>14-17</sup>.

#### Objetivo

Evaluar la sensibilidad de 48 cepas de *C.jejuni* de origen humano y de animales de compañía aisladas de una población definida de la Provincia de Buenos Aires frente a cinco antimicrobianos.

#### Materiales y métodos

**Muestreo y aislamiento:** Las cepas utilizadas se aislaron de muestras obtenidas de una población con necesidades básicas insatisfechas (NBI) al sur de la ciudad de Buenos Aires, desde abril de 1999 a marzo de 2000. Se muestrearon, en cuatro visitas en las distintas estaciones del año, materia fecal de 22 niños de hasta 6 años de edad con cuadros de diarrea aguda; y de 200 animales con o sin sintomatología: 165 caninos, 30 felinos y 5 aves, que se encontraban en las viviendas en las que residían dichos niños 18.

Los hisopos con materia fecal se colocaron en tubos con medio de transporte Cary Blair sin agar y se enviaron refrigeradas al laboratorio donde se procesaron dentro de las 48 horas. El aislamiento primario se realizó sembrando las muestras en medio selectivo Skirrow modificado: agar Brucella (Becton Dickinson & Co., Sparks, USA), sangre ovina desfibrinada al 5%, 10 µg/ml cefalotina (ICN, Ohio, USA), 5 µg/ml trimetoprima (Sigma, St. Louis, MO, USA), 10 µg/ml vancomicina (Sigma, St. Louis, MO, USA), 2500 UI polimixina B (Sigma, St. Louis, MO, USA). La incubación se realizó a 42°C en una atmósfera de microaerofilia (78% N<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> y 7% H<sub>2</sub>) durante 24 horas.

La identificación presuntiva de las colonias sospechosas, se realizó mediante la coloración de Gram, pruebas de oxidasa y catalasa. La identificación definitiva se hizo mediante las pruebas de hidrólisis del hipurato, hidrólisis del indoxil acetato, sensibilidad al ácido nalidixico y cefalotina, y crecimiento a 26°C, 37°C y 42°C<sup>19</sup>. En los casos dudosos se empleo el sistema API-Campy (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France).

Se aislaron 2 cepas de origen humano, 38 cepas de origen canino, 6 cepas de origen felino y 2 cepas aviares de *Campylobacter jejuni*.

**Test de sensibilidad:** La concentración inhibitoria mínima (CIM) se determinó por el método de dilución en agar según las normas de la CLSI para esta especie<sup>20a</sup>.

El inóculo se preparó en caldo Müeller Hinton (Difco, Maryland, USA) con una densidad ajustada a la escala 0.5 de McFarland y diluida 1:10. La siembra de las cepas se realizó mediante un replicador de Steers, quedando el inóculo final de 104 UFC/ml, en agar Müeller Hinton (Difco, Maryland, USA) con el agregado del 5% de sangre de carnero desfibrinada.

Las placas se incubaron a 42°C en una atmósfera de microaerofilia (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> y 85% N<sub>2</sub>) durante 24 horas. La CIM fue definida como la menor concentración

de antimicrobiano capaz de inhibir el desarrollo bacteriano. Como cepas control se utilizaron *Escherichia coli* 25922, *Staphylococcus aureus* 29213 y *Campylobacter jejuni* 33560. Los antimicrobianos y los respectivos rangos ensayados fueron: ciprofloxacina

(CIP) (ICN, Ohio, USA), 0.06-16 µg/ ml; eritromicina (ERY) (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.12-32 µg/ml; tetraciclina (TET) (Fortbenton Co.Laboratories, Argentina), 0.12-16 µg/ ml; ampicilina (AMP) (ICN, Ohio, USA) 0.25-32 µg/ ml y gentamicina (GEN) (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.12-8 µg/ ml.

Las placas con antimicrobianos fueron preparadas inmediatamente antes de su uso. La interpretación de los resultados se realizó sobre la base de los documentos M 100- S 16 y M 45-P del CLSI<sup>20a,b</sup>. Para CIP se consideraron cepas sensibles las concentraciones ≤ 1 µg/ ml, intermedias 2 µg/ml y resistentes las ≥ 4 µg/ml; para TET se consideraron cepas sensibles las ≤ 4 µg/ ml, intermedias 8 µg/ml y resistentes las ≥ 16 µg/ ml; para AMP se consideraron cepas sensibles las ≤ 8 µg/ml, intermedias 16 µg/ml y resistentes las ≥ 32 µg/ml; para GEN se consideraron cepas sensibles las ≤ 4 µg/ml, intermedias 8 µg/ml y resistentes las ≥ 16 µg/ml y para ERY se consideraron cepas sensibles las ≤ 8 µg/ml, intermedias 16 µg/ml y resistentes las ≥ 32 µg/ml.

### Resultados

Distribución de CIM de *Campylobacter jejuni* de origen humano (n=2), canino (n=38), felino (n=6) y aviar (n=2).

La zona marcada en gris indica el número de aislamientos hallados por encima del punto de corte considerado como sensible.

Para AMP se halló una cepa de origen canino con valor intermedio. Para CIP se hallaron las dos cepas de origen humano, 18 cepas de origen canino y las dos cepas de origen aviar con valores de resistencia. Para TET se hallaron las dos cepas de origen humano, 20 cepas de origen canino y 4 cepas de origen felino con valores de resistencia.

Distribución (n) de CIM (mg/L)

Antimicrobiano	Muestra	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	>16
Ampicilina	Humana				1					1	
	Canina			6	4	1	5	9	12	1	
	Felina					1		1	4		
	Aviar				1			1			
Ciprofloxacina	Humana	11	2	4		3		3	4	3	2
	Canina										8
	Felina	1	1	1							2
	Aviar		1	1							
Tetraciclina	Humana										2
	Canina		5	10	2			1		18	2
	Felina			1	1						
	Aviar						2				
Eritromicina	Humana							2			
	Canina		9	1	2	3	3	17	3		
	Felina					1	2	2	1		
	Aviar										
Gentamicina	Humana					2					
	Canina		6	2	1	16	11	2			
	Felina				1	3	2				
	Aviar					1	1				

## Discusión

Numerosos estudios de análisis de riesgo evidencian que la cohabitación con un animal de compañía es un factor de riesgo significativo para la infección por *Campylobacter* en humanos<sup>14,21-23</sup>. En el año 2001 se ha documentado un caso de transmisión directa de una cepa de *Campylobacter jejuni* entre un humano y un perro conviviendo en el mismo ambiente<sup>24</sup>. Según datos de las últimas dos décadas, la portación de *Campylobacter* en perros sanos esta en el orden del 21 al 75%<sup>25-31</sup>. Coincidiendo con la bibliografía citada, en el estudio epidemiológico utilizado en este trabajo, el 23 % de los caninos fue portador de *Campylobacter jejuni*. Además, hallamos un 20% de felinos y un 40% de aves portadoras de *Campylobacter jejuni*.

Aunque los perros son considerados como un riesgo menor en la transmisión de campilobacteriosis humana, se deberían tener en cuenta en la epidemiología de esta zoonosis. Según un estudio efectuado por Hald y cols. en 2004<sup>32</sup>, la exposición a *Campylobacter upsaliensis* en humanos por intermedio de perros es mayor que la de *Campylobacter jejuni*, debido a que la colonización con esta última especie es menos frecuente y de menor duración que la anterior. De todas maneras, se estima que a nivel mundial, *Campylobacter jejuni* sería el productor del 5 al 10% de diarreas en los países desarrollados y *Campylobacter upsaliensis*, sólo estaría comprometido en un 0.5 al 1 % de las mismas.

Si bien no tenemos datos de genotipificación en las cepas utilizadas en este estudio, fenotípicamente se encontraron patrones de resistencia iguales para los cinco antimicrobianos probados, en las 2 cepas de origen humano y cepas de origen canino, aisladas del mismo hábitat, con valores  $\geq 16$   $\mu\text{g/ml}$  para CIP y TET. Esto sugeriría una transmisión de *Campylobacter jejuni* a través del contacto de los niños con los perros.

Según los resultados obtenidos en nuestro estudio, se observa la emergencia de resistencia de *Campylobacter jejuni* a fluorquinolonas y tetraciclinas, antimicrobianos utilizados más comúnmente en medicina veterinaria; por lo cual sugerimos realizar el monitoreo de los mismos en el control de una zoonosis tan poco estudiada en nuestro medio.

## Bibliografía

1. Tauxe RJ. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. En: Nachamkin I, Blaser MJ, Tompkins LS (eds). *Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends*. 1992, Washington D.C., American Society for Microbiology. Pag. 9 –19.
2. Healing T y cols. Rev Med Microbiol (1992); 3: 159 – 167.
3. Blaser MJ. *Campylobacter* species. En: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (eds) Principles and practice of Infectious Diseases. 1990, New York, Churchill Livingstone. Pag. 1649-1658.
4. Du Pont HL, Ericsson CD. N Engl J Med (1993); 328: 1821–1827.
5. Pichler HET y cols. Am J Med (1987); 82 (suppl) 4A: 329–332.
6. Rademaker CMA y cols. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (1989); 8: 690–694.
7. Endtz HP y cols. J Antimicrob Chemother (1991); 27: 199–208.
8. Rautelin H y cols. Antimicrob Agents Chemother (1991); 35: 2065–2069.
9. Sanchez R y cols. Antimicrob Agents Chemother (1994); 38: 1879–1882.
10. Gaunt PN, Piddock LJV. J. Antimicrob. Chemother (1996); 37: 747–757.
11. Clow K, Park S, Hawtin P, Newell D. The genotypic comparison of *Campylobacter jejuni* strains from humans and poultry. Development of monitoring procedures, rapid detection methods and techniques. En: Aspan A, Mulder E (eds) COST Action 97. Molecular epidemiology of *Campylobacter* and *Salmonella*, vol. 4. 1998, Gare, Luxembourg, Office for Official Publications of the European Communities. Pag. 25-32.
12. Koenraad P y cols. Epidemiol Infect (1995); 115: 485-494.
13. Korolik V y cols. J Clin Microbiol (1995); 3: 1136-1140.
14. Adak GK y cols. *Epidemiol Infect* (1995); 115: 15-22
15. Kapperud G y cols. Am J Epidemiol (2003); 158: 234-242.
16. Rodrigues LC y cols. Epidemiol Infect (2001); 127: 185-193.
17. Studahl A, Andersson Y. Epidemiol Infect (2000); 125: 269-275.
18. Lopez C y cols. Rev sci tech Off Int Epiz (2003); 22: 1013-1020.
19. Vandamme P, De Ley J. Int J Syst Bacteriol (1991); 41: 451-455.
- 20 (a) Clinical and Laboratory Standards Institute(2006). Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline. M45-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- 20 (b) Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. M100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
21. Kapperud G y cols. J Clin Microbiol (1992); 30: 3117-3121.
22. Neimann J y cols. Epidemiol Infect (2003); 130: 353-366.
23. Tenkate TD, Stafford RJ. Epidemiol Infect (2001); 127: 399-404.
24. Wolfs TF y cols. Clin Infect Dis (2001); 32: 97-99.
25. Baker J y cols. Aust Vet J (1999); 77: 662-666.
26. Burnens AP y cols. J Vet Med (1992); 39: 175-180.
27. Gondrosen B y cols. Acta Vet Scand (1985); 26: 81-90.
28. Hald B, Madsen M. J Clin Microbiol (1997); 35: 3351-3352.
29. Olson P, Sandstedt K. Vet Rec (1987); 121: 99-101.

30. Sandberg M y cols. *Prev Vet Med* (2002); 55: 241-253.
31. Torre E, Tello M. *Am J Vet Res* (1993); 54: 260-262.
32. Hald B y cols. *J Clin Microbiol* (2004); 42: 2003-2012.