

## CEPAS DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* RESISTENTES A QUINOLONAS AISLADAS DE HUMANOS, GALLINAS Y POLLOS

RODOLFO NOTARIO<sup>1</sup>, NOEMI BORDA<sup>2</sup>, TELMA GAMBANDE<sup>1,3</sup>, JOAQUIN BERMEJO<sup>2</sup>, ADRIANA PONESSA<sup>3</sup>, VIRGINIA TOLEDO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad Abierta Interamericana, Rosario, <sup>2</sup>Hospital Español de Rosario, <sup>3</sup>Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe

**Resumen** Se compararon 8 aislamientos de *Campylobacter jejuni* provenientes de humanos con enfermedad diarreica aguda, con 23 aislamientos de cloaca de gallinas y pollos obtenidos de zonas próximas a la ciudad de Rosario, todos resistentes a la ciprofloxacina. Las muestras se sembraron en agar selectivo y se incubaron en microaerofilia a 42 °C. Las colonias se identificaron con el método tradicional. Los aislamientos se conservaron a -70 °C en caldo cerebro corazón con 17% v/v de glicerina. La clonalidad se determinó por RAPD-PCR, utilizando el primer 1254 (Stern NJ). Se interpretaron los aislamientos como clones distintos cuando diferían en una banda de amplificación. Se obtuvieron 5 clones diferentes. Los patrones I, II y V fueron aislados en criaderos industriales de pollos y en humanos (el II también en un establecimiento de gallinas ponedoras de huevos). En un gallinero familiar se obtuvo el patrón I. El patrón III sólo se obtuvo de humanos. El patrón IV se halló en uno de los criaderos pero no en humanos. Se pudo determinar que 93.5% de las cepas se aislaron tanto de animales como de humanos, por lo que se considera posible que la colonización de criaderos con cepas resistentes a los antimicrobianos pudiera ser el origen de la infección de humanos.

**Palabras clave:** *Campylobacter jejuni*, pollos, gallinas ponedoras, RAPD-PCR

**Abstract** *Quinolone resistant Campylobacter jejuni strains isolated from humans and from poultry.*

Eight quinolone resistant *Campylobacter jejuni* strains isolated from humans with diarrheal disease were compared with 23 isolates from chicken and from laying hens. Samples were cultured on selective agar in microaerophilia, identified by conventional tests, and conserved in 17% glycerol at -70 °C. Clones were determined by RAPD-PCR employing the 1254 primer (Stern NJ). Five patterns were obtained. Patterns I, II, and V were found in both poultry and human isolates. Pattern I was obtained from poultry in a domestic henhouse. Pattern III was only obtained from humans whereas pattern IV was only obtained from poultry. A 93.5% of clones were found in both, humans and poultry. According to these results colonization by quinolone resistant strains could be the origin of this human infection, acquired by ingestion.

**Key words:** *Campylobacter jejuni*, poultry, laying hens, quinolones resistance, RAPD-PCR

*Campylobacter jejuni* es un importante patógeno zoonótico<sup>1</sup>. Es el principal agente causante de enteritis bacteriana en pacientes de nivel social medio en Rosario, llanura pampeana argentina, y responsable de casi todos los casos de diarrea disenteriforme en esa franja social, tanto en niños como en adultos<sup>2</sup>. Se lo ha aislado en mayor cantidad de casos que los debidos a *Salmonella enterica*, especies de *Shigella* y serovariedades enterovirulentas de *Escherichia coli* juntos<sup>2</sup>. En niños menores de 5 años la enfermedad diarreica debida a *C. jejuni* se presentó con mayor gravedad que en adultos; muchos de aquellos debieron hospitalizarse o presentaron cuadros prolongados que requirieron tratamiento antimicrobiano<sup>3</sup>.

En los últimos años se produjo un formidable incremento en la resistencia del *C. jejuni* a fluoroquinolonas, alcanzando 66.7% en 2007 en Rosario<sup>4</sup>. Los aislamientos de materia fecal de pollos de varios criaderos industriales en el área rural circundante presentaron 84% de resistencia a quinolonas fluoradas<sup>4</sup>.

Con el propósito de conocer el origen de la resistencia en los aislamientos humanos de nuestra área geográfica, se compararon estos aislamientos con los provenientes de pollos de las áreas que proveen a la ciudad, mediante su caracterización con técnicas moleculares.

### Materiales y métodos

Se estudiaron muestras fecales humanas y animales colectadas entre el 1 de enero y el 31 de diciembre de 2009.

En ese período concurrieron al Hospital Español de Rosario 230 pacientes con síndrome diarreico agudo. De todos ellos se obtuvieron muestras por defecación espontánea en frasco estéril y se sembraron antes de la 3 h, como hemos

descripto previamente, en agar selectivo incubado en microaerofilia<sup>5</sup>, consistente en agar Mueller Hinton con 7% de sangre equina lisada con suplemento con 10 mg/l de vancomicina, 5 mg/l de trimetoprima y 2 500 UI/l de polimixina B,

Se tomaron además 52 muestras de hisopado de cloaca de pollos, 16 de 3 establecimientos avícolas industriales y 36 de gallineros familiares del sur de las provincias de Santa Fe y Córdoba, que son comercializados en Rosario, obteniendo abundante material, que fue colocado en el medio de Cary y Blair, transportado refrigerado a 4 °C y sembrado antes de las 3 h. Las muestras de pollos se sembraron de la misma manera que la descrita para los humanos, el hisopo se sumergió después en el medio de enriquecimiento semisólido para *Campylobacter* de Chan, consistente en agar Columbia con agar al 7%, con 5% de sangre equina y el mismo suplemento de antimicrobianos y fue subcultivado a las 24 h en el medio selectivo sólido antedicho. Las placas fueron observadas a las 24 y 48 h de incubación en microaerofilia (80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 5% H<sub>2</sub>).

Las colonias acuosas características se identificaron con el método tradicional en base a la morfología de un extendido coloreado con fucsina básica y las pruebas de catalasa, oxidasa, sensibilidad a cefalotina, trifenil tetrazolio, indoxilacetato e hipurato rápido<sup>5,6</sup>. Los aislamientos se conservaron a -70 °C en caldo cerebro corazón con 17% v/v de glicerina. Se probó la sensibilidad a ciprofloxacina por E test<sup>7</sup>, dilución en agar y difusión con discos de 5 µg<sup>8,9</sup>.

Para la caracterización molecular los aislados de *C. jejuni* fueron divididos en los siguientes grupos según la procedencia de: a) humanos (H), b) aislados de pollos de un establecimiento industrial para producción de pollos parrilleros (E1), c) aislados de otro establecimiento similar (E2), d) aislados de gallinas ponedoras (PON) para la producción de huevos para consumo humano y e) aislados de aves de una granja (FAM) para el consumo familiar sin empleo de alimentos balanceados. La clonalidad se determinó por RAPD-PCR, utilizando el primer 1254<sup>10,11</sup>, en un termociclador MJ Research. Para la realización de la técnica de RAPD-PCR se extrajo el ADN cromosomal de una colonia aislada y resuspendida en 200 µl de buffer Tris-EDTA (10mM Tris, 1mM EDTA) e incubada a 95 °C durante 15 minutos. Se utilizó 1.5 µl del sobrenadante para realizar las reacciones de PCR. La reacción se llevó a cabo utilizando el cebador 1254 descrito por Tu y col<sup>12</sup>. La reacción de PCR constó de 35 ciclos de 40 segundos a 95 °C, 40s a 48 °C y 40s a 72 °C con una extensión final de 7 minutos a 72 °C. El revelado de los productos de PCR se realizó por corrida en gel de agarosa con bromuro de etidio y transiluminación en UV. Se interpretó a los aislamientos como clones diferentes cuando diferían en una banda de amplificación.

## Resultados

Se obtuvo desarrollo de *C. jejuni* en muestras provenientes de 18 pacientes (7.8%). Doce de los aislamientos fueron resistentes a ciprofloxacina (66.7%), sólo 8 se pudieron aislar en estado puro. En seres humanos se obtuvieron 4 patrones diferentes por RAPD (Tabla 1)

Se aisló *C. jejuni* en 16 (100%) de las muestras de materia fecal de pollos de establecimientos industriales avícolas, todos resultaron resistentes a ciprofloxacina: 2 aislados de pollos de un establecimiento industrial para producción de pollos parrilleros (E1), 7 aislados de otro establecimiento similar (E2) y 7 aislados de materia fecal de gallinas ponedoras (PON) para producción de huevos para consumo humano. Se aisló *C. jejuni* de 18

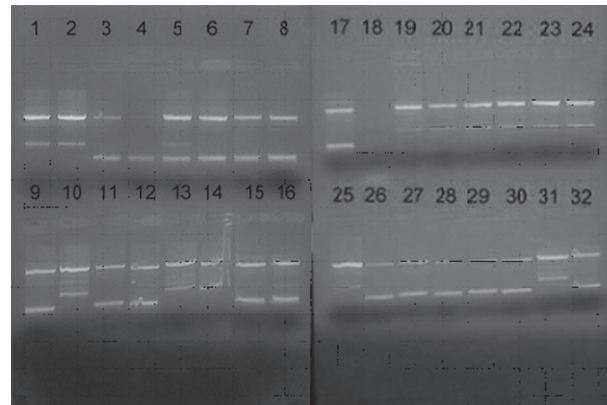


Fig. 1.- Calles obtenidas por RAPD con las cepas de *Campylobacter jejuni* aisladas de animales y de seres humanos. Calle 1 a 4 y 7 a 10: aislados de seres humanos; 5 y 6 de pollos del establecimiento industrial E1; 11 a 17 de pollos del establecimiento industrial E2; 26 a 32 de gallinas ponedoras (PON); de 19 a 25 de animales de gallinero familiar (FAM)

(50%) de materia fecal de gallinas de granjas familiares (FAM) de los cuales 7 (38.9%) resultaron resistentes a ciprofloxacina (Tabla 1).

En los establecimientos industriales se obtuvieron 2 a 3 patrones diferentes en cada uno. Diez y seis de los 31 aislamientos presentaron el patrón II (Tabla 2).

En la Fig. 1 pueden verse los diferentes patrones del polimorfismo de ADN.

Como puede verse, hubo aislamiento de cepas del clon I en SH, E2 y FAM. El tipo II apareció en todos los establecimientos industriales (E1, E2 y PON) y en H. El tipo III apareció sólo en H, a diferencia del IV que apareció sólo en animales del E1. El patrón V se aisló en H, E2 y PON. El clon II se aisló en humanos y en todos los establecimientos industriales de carne y huevos, pero no en el gallinero familiar. El 93.5% (29/31) de los aislamientos (patrones RAPD I, II y IV) se detectaron tanto en humanos como en animales.

## Discusión

*Campylobacter jejuni* se presentó con una importante frecuencia en humanos. La afectación de los establecimientos industriales avícolas fue masiva.

Estudios anteriores de sensibilidad a los antimicrobianos por dilución en medio sólido nos permitieron determinar la presencia de aislamientos con numerosos perfiles de resistencia. La presencia de numerosos serovares en nuestro medio fue corroborada por hemaglutinación, determinando la presencia de 11 serogrupos O en relación al lipopolisacárido de los aislados de *C. jejuni*<sup>13</sup>. En 1985, en los EE.UU. las quinolonas fluoradas eran los agentes más activos frente a *C. jejuni*<sup>14</sup>. En la década siguiente a 1985 la sensibilidad a ciprofloxacina era cercana al

Tabla 1.– Distribución de los aislamientos de *Campylobacter jejuni* en humanos y aves, de cepas con resistencia a las fluoroquinolonas y cepas analizadas por la reacción de RAPD-PCR

	Nº de muestras	Nº de positivas	Aislamientos R a FQN	Aislamientos R a FQN analizados por RAPD-PCR
Total humanos	230	18	12	8
Est avic E1*	2	2	2	2
Est avic E2	7	7	7	7
PON	7	7	7	7
Total est avic	16	16	16	16
FAM	36	18	7	7
Total muestras de aves	52	34	23	23
Total general	282	52	35	31

\* Est avic: Establecimiento avícola industrial; E1: Establecimiento 1; E2: Establecimiento 2; PON: gallinas ponedoras para producción de huevos de consumo humano; FAM: granjas familiares.

TABLA 2.– Distribución de los clones de *Campylobacter jejuni* resistentes a quinolonas provenientes de seres humanos y de gallinas y pollos en establecimientos avícolas industriales y familiares. Método RAPD-PCR

Origen	Patrón de aislamiento					Totales
	I	II	III	IV	V	
Humanos	1,2*3,7-9	4	-	10	8	
Estab ind E1	-	6	-	5	-	2
Estab ind E2	14	11,12,15-17	-	-	13	7
PON	-	26-30,32	-	-	31	7
FAM	19-25	-	-	-	-	7

Estab ind: Establecimiento industrial; \* Números de identificación de los aislamientos; PON: gallinas ponedoras para producción de huevos de consumo humano; FAM: granjas familiares.

100% y dado que tampoco se detectaban aislamientos resistentes de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y las especies de *Shigella*, las quinolonas constituían la primera opción cuando se requería tratamiento empírico, como en la diarrea del viajero. La enteritis por *C. jejuni* es frecuente en todo el mundo, se observan desde casos autolimitados hasta cuadros graves inclusive mortales. Epidemiológicamente, en nuestro medio se presenta por igual en ambos sexos, con dos picos de frecuencia en adolescentes o adultos jóvenes y en niños menores de 5 años. Es precisamente en este grupo en el que se presenta con mayor frecuencia –superior al 50% de los casos–, y gravedad. En efecto, en niños menores de 5 años significativamente más casos deben internarse comparados con los niños

mayores y adultos, el cuadro se prolonga más frecuentemente y la fiebre es significativamente más elevada. En Rosario, la mayoría de los casos de diarrea disenteriforme son debidos a esta etiología<sup>2, 3, 5, 13</sup>. Es sabido que la bacteria puede ocasionar casos asociados con el síndrome de Guillain Barré<sup>15</sup>. Es por ello importante disponer de tratamiento antimicrobiano efectivo como alternativa a los macrólidos, que son las drogas de elección para los casos intestinales, y la gentamicina para los casos extraintestinales. En un principio la resistencia al ácido nalidíxico sólo representó una dificultad para la diferenciación de *C. jejuni* con los campilobacter termofílicos resistentes al ácido nalidíxico, es decir *C. lari*. La proporción de cepas resistentes a las fluoroquinolonas aumentó rápidamente

ocasionando un problema mundial en el tratamiento de la enteritis en general y particularmente por *Campylobacter* y el tratamiento empírico propuesto para la diarrea del viajero. En nuestro país el porcentaje de resistencia frente a quinolonas supera el 60%<sup>4</sup>.

En 1995 detectamos el primer aislamiento de *C. jejuni* resistente al ácido nalidíxico<sup>16</sup> y desde entonces la resistencia a las quinolonas se mostró en aumento en Rosario, hasta llegar a más de 2/3 de los aislamientos de humanos con diarrea en 2007<sup>4</sup>. Esa cifra se incrementó hasta llegar a más del 70 % con una CIM  $\geq 4$   $\mu\text{g/ml}$ , lo cual fue constatado también en aves (datos no publicados), en coincidencia con lo observado en la República Checa<sup>17</sup> y en Pensylvania<sup>18</sup>. El rápido y contundente aumento de la resistencia podría deberse a la infección de humanos con cepas ya resistentes. Dado que la fuente de infección humana más importante son los pollos, la emergencia de mutantes resistentes en los pollos de consumo humano podría ser el origen de la infección humana con bacterias resistentes a las quinolonas. La resistencia a este grupo de antimicrobianos en los establecimientos de cría podría deberse a su uso en la cría de pollos o en medicina veterinaria. Los mecanismos de resistencia están codificados en genes que determinan cambios en la ADN girasa, en las bombas de eflujo y son trasmisibles por integrones<sup>19,20</sup>. De hecho, Bardon y col. informan 55% de resistencia en humanos en la República Checa en 2009<sup>17</sup>. En cambio, en países que limitan el uso de quinolonas en la producción de pollos o en medicina veterinaria, los aislamientos de infecciones humanas son todos sensibles a este grupo de antimicrobianos y los casos debidos a aislamientos resistentes son atribuidos a viajes<sup>21,22</sup>. En América Latina está permitido el uso de quinolonas para el tratamiento veterinario y la alimentación de aves<sup>23</sup>, inclusive en el área del sur de la provincia de Santa Fe donde se tomaron las muestras de aves (Prof. J.C. Fain Binda, Facultad de Veterinaria UNR, comunicación personal). Se emplean enrofloxacin, danofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin, sarafloxacin, difloxacin, flumequina y ácido oxolínico<sup>23</sup>.

Bardon y col. encontraron que los porcentajes de resistencia a fluoroquinolonas y otras drogas eran mayores en animales que en seres humanos<sup>17</sup>.

En este trabajo se pudo demostrar que en los dos establecimientos de cría para la producción de pollos parrilleros (E1, E2) y en el establecimiento de gallinas ponedoras (PON) se detectaron cepas resistentes a quinolonas con el mismo patrón de polimorfismo de ADN del hallado en los aislamientos de pacientes con diarrea debida a *C. jejuni* resistente a ciprofloxacin. Tres de los cinco clones se hallaron tanto en humanos como en aves, lo que sugiere la posibilidad de que los seres humanos se hayan infectado a partir de cepas de origen animal. El clon III sólo se halló en humanos, por lo que se hacen necesarios ulteriores estudios para determinar si hay

cepas no zoonóticas. El clon IV solo se halló en aves, lo que podría deberse a la colonización de aves por cepas menos virulentas para el ser humano. La presencia de un solo clon en gallineros domésticos (también hallado en pacientes con diarrea), hace necesario muestrear un mayor número de este tipo de criaderos, de planteles no alimentados con alimentos balanceados. Nuestro próximo objetivo será la determinación de clones en un mayor número de aislamientos por electroforesis en gel de campo pulsado. La resistencia a las quinolonas no sólo afecta la terapéutica en seres humanos y en animales, sino que puede dificultar la comercialización de aves. Se debería considerar en nuestro país la restricción del uso veterinario e industrial de los antimicrobianos y particularmente de las quinolonas fluoradas.

## Bibliografía

- Humphrey T, O'Brien S, Madsen M. Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int J Food Microbiol* 2007; 117: 237-57.
- Gambandé T, Damiano M, Borda N, Notario R, Aita J. Prevalencia de las bacterias causantes de diarrea en un hospital de Rosario, Argentina. *Rev Fac Cien Méd Univ Nac Córdoba* 2006; 63: 36-8.
- Gambandé T, Notario R, Luciano MI, Toledo V, Ponessa A. Características clínicas y epidemiológicas de casos humanos de enteritis por *Campylobacter*. [Abstract]. En: XIII Jornadas Argentinas de Microbiología; 8 octubre, 2008; Rosario. Libro de Resúmenes UNR (Ed), p 478. Resumen N° 347.
- Gambandé T, Borda N, Notario R, et al. Sensibilidad a los antimicrobianos de *Campylobacter jejuni* aislados en un año en el Hospital Español de Rosario. [Abstract]. En: XI Congreso Argentino de Microbiología; 10 octubre, 2007; Córdoba. Actas *Rev Argent Microbiol* 2007; 39 (supl 1): 107. Resumen N° 335 - 19799.
- Notario R, Borda N, Deserti S, Gambandé T. Infecciones entéricas por *Campylobacter jejuni* en Rosario. *Medicina (Buenos Aires)* 1985; 45: 654-658.
- Penner JL. The genus *Campylobacter*: a decade of progress. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1: 157-172.
- Fernández H, Mansilla M, González V. Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* subsp *jejuni* assessed by E-test and double dilution agar method in southern Chile. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95: 247-9.
- Luangtongkum T, Morishita TY, El-Tayeb AB, Ison AJ, Zhang Q. Comparison of antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter* spp. by the agar dilution and the agar disk diffusion methods. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 5900-4.
- Potz NAC, Mushtaq S, Johnson AP, et al. Reliability of routine disc susceptibility testing by the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) method. *J Antimicrob Chemother* 53: 729-38.
- Stern NJ, Bannon VA, Svetoch CA, et al. Distribution and characterization of *Campylobacter* spp from Russian poultry. *J Food Protect* 2004; 67: 239-45.
- Basri Ertas H, Cetinkaya B, Muz A, Ongor H. Genotyping of broiler-originated *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates using *fla* typing and random amplified polymorphic DNA methods. *Int J of Food Microbiol* 2004; 94: 203-9.
- Tu ZC, Eisner W, Kreiswirth BN, Blaser MJ. Genetic di-

- vergence of *Campylobacter fetus* strains of mammal and reptile origins. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3334-40.
13. Notario R, Borda N, Gambandé T, Sutich E. Species and serovars of enteropathogenic agents associated with acute diarrheal disease in Rosario, Argentina. *Rev Ins. Med trop São Paulo* 1996; 38: 5-7.
  14. Fliegelman RM, Petrak RM, Goodman LJ, Segreti J, Trenholme GM, Kaplan RL. Comparative in vitro activities of twelve antimicrobial agents against *Campylobacter* species. *Antimicrobial Agents Chemother* 1985; 27: 429-30.
  15. Erazo Torricelli R. Síndrome de Guillain Barré en pediatría. *Medicina (Buenos Aires)* 2009; 69: 84-91.
  16. Notario R, Borda N, Gajardo T, et al. Infección intestinal por *Campylobacter jejuni* resistente al ácido nalidíxico. *Infectol & Microbiol Clin* 1995; 7: 38-41.
  17. Bardon J, Kolar M, Cekanova L, Hejnar P, Koukalova D. Prevalence of *Campylobacter jejuni* and its resistance to antibiotics in poultry in the Czech Republic. *Zoonosis Public Health* 2009; 56: 111-6.
  18. Nachamkin I, Ung H, Li M. Increasing fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni*, Pennsylvania, USA, 1982-2001. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:1501-2.
  19. Moore JE, Corcoran D, Dooley JSG, et al. *Campylobacter*. *Vet Res* 2005; 36: 351-382.
  20. Lucey B, Crowley D, Moloney P, et al. Integronlike structures in *Campylobacter* spp. of human and animal origin. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 50-5.
  21. Unicomb L, Ferguson J, Riley TV, Collignon P. Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* absent from isolates, Australia. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 1482-3.
  22. Engberg J, Neimann J, Moller Nielsen E, Moller Aarestrup F, Fussing V. Quinolone-resistant *Campylobacter* infections in denmark: a risk factors and clinical consequences. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1056-63.
  23. Serrano Vega L. Biodisponibilidad y farmacocinética de antibacterianos en avicultura. En: <http://www.engormix.com/MA-vicultura/sanidad/articulos/biodisponibilidad-farmacocinetica-antibacterianos-avicultura-t231/165-p0.htm>; consultado el 26-1-2011.

----

#### LA TAPA

**Ascidian** (Ascidiae). Interpretación de varias ascidias. Tomada de Ernst Haeckel (1834-1919) *De Kunstformen der Natur*, Lámina 85, 1904. Archivo de *Wikimedia Commons*.

Los ascidiáceos (Ascidacea), ascidias, o chorros marinos (*sea squirts*), porque aspiran el agua, la filtran, retienen los alimentos, y la expulsan en un chorro, son una clase de animales cordados del subfilo Urochordata; se encuentran en todos los mares del planeta, fijas en rocas o alguna superficie sólida. La clase incluye 2 300 especies, algunas solitarias, otras sociales que, unidas por la base, forman comunidades compactas, y otras compuestas: colonias de hasta metros de diámetro formadas por individuos pequeños (zooides) agrupados alrededor de un poro común (atrioporo) por donde expulsan el agua aspirada. Casi todas las ascidias son hermafroditas. En las solitarias la fertilización es externa, en las coloniales la reproducción puede ser externa o interna, sexual o asexual. Las larvas tienen notocorda, tubo neural, y hendiduras faríngeas, pierden la notocorda cuando adultas; las ascidias son cordadas en el estado larval, adultas dejan de serlo. Algunas especies son comestibles (el piure chileno), otras, por su función de filtros acumulan contaminantes y se utilizan como indicadores, otras como organismos modelos de investigación. Entre las capaces de reproducción asexual se encuentra la familia Didemnidae a la cual pertenece la especie *Diplosoma listerianum* (Milne-Edwards, 1841) sobre la que trata la nota en CAVEAT LECTOR (ver p 382). En la página 376 se incluye la identificación de las ascidias ilustradas en la tapa. *Diplosoma listerianum* no está incluida en la lámina sino en CAVEAT LECTOR.