

# ***Campylobacter* spp.: prevalencia y caracterización feno-genotípica de aislamientos de pacientes con diarrea y de sus mascotas en la provincia de La Pampa, Argentina**

ANA L. TAMBORINI<sup>1</sup>, LUIS M. CASABONA<sup>1</sup>, MARÍA R. VIÑAS<sup>2</sup>, VALERIA ASATO<sup>2</sup>, ALICIA HOFFER<sup>2</sup>,  
MARÍA I. FARACE<sup>2</sup>, MARÍA C. LUCERO<sup>2</sup>, ALEJANDRA CORSO<sup>2</sup>, MARIANA PICHEL<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Bacteriología, Establecimiento Asistencial "Dr. Lucio Molas", Raúl B. Díaz y Pilcomayo, Santa Rosa, La Pampa (L6300); <sup>2</sup>Departamento de Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Av. Vélez Sarsfield 563 (1281) CABA, Argentina.

\*Correspondencia. E-mail: anatamborini@hotmail.com

## RESUMEN

Se investigó la prevalencia de *Campylobacter* spp. en 327 pacientes con diarrea y en 36 animales (perros, gatos y pollos) que convivían con pacientes en los que se detectó este patógeno; el estudio se llevó a cabo en Santa Rosa, La Pampa, Argentina. Se aisló *Campylobacter* spp. en 50/327 pacientes y en 12/36 animales, *Campylobacter jejuni* fue la especie más frecuente. Se detectó resistencia a ciprofloxacina (65 %) y a tetraciclina (32 %) en una selección de 35 aislamientos de origen humano. En el análisis por electroforesis de campo pulsado de 13 aislamientos de *C. jejuni* se identificaron siete subtipos genéticos. Dos subtipos agruparon aislamientos de pacientes y de sus respectivos perros, y un tercer subtipo agrupó 1 aislamiento humano y 2 de pollos de ese paciente. Si bien las aves son reconocidas como el principal reservorio, es importante fortalecer la vigilancia de *Campylobacter* spp. en mascotas, las cuales pueden ser portadores asintomáticos del patógeno.

**Palabras clave:** *Campylobacter* spp., diarrea, mascotas, subtipos genéticos

## ABSTRACT

***Campylobacter* spp.: prevalence and pheno-genotypic characterization of isolates recovered from patients suffering from diarrhea and their pets in La Pampa Province, Argentina.** The prevalence of *Campylobacter* spp. was investigated in 327 patients suffering from diarrhea and in 36 animals (dogs, cats and chickens) owned by the patients that presented infection by *Campylobacter* in Santa Rosa, La Pampa, Argentina. *Campylobacter* spp. was isolated in 50/327 patients and in 12/36 animals, being *Campylobacter jejuni* the most common species. Resistance to ciprofloxacin (65 %) and tetracycline (32 %) was found among 35 isolates of human origin studied. Seven genetic subtypes were observed among 13 *C. jejuni* isolates by pulsed field gel electrophoresis. Two subtypes grouped isolates belonging to patients and their respective dogs whereas another subtype grouped one isolate of human origin and two isolates from the patient's chickens. The results of this investigation highlight the need to strengthen surveillance of *Campylobacter* spp. not only in poultry, which is recognized as the main reservoir, but also in pets, which were shown to be asymptomatic carriers of the pathogen.

**Key words:** *Campylobacter* spp., diarrhea, pets, genetic subtypes

La campilobacteriosis es una zoonosis de distribución mundial. *Campylobacter* spp. se halla habitualmente como comensal del tracto gastrointestinal de animales domésticos y salvajes, entre los cuales las aves de corral constituyen el principal reservorio y vehículo de transmisión del

patógeno (1, 6). Muchos casos de enteritis humana por *Campylobacter* spp. han sido asociados al contacto con animales o al consumo de agua contaminada, de leche cruda o de alimentos de origen animal parcialmente cocidos. Las especies termotolerantes, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, son

las más frecuentemente aisladas en casos de diarrea aguda en el hombre (6). En nuestro medio, la distribución de este microorganismo en el ambiente y en otros huéspedes animales (mascotas) no ha sido ampliamente estudiada (6, 8).

Entre los años 2009 y 2010, *Campylobacter* spp. fue reconocido como el principal agente etiológico en pacientes con diarrea en el Establecimiento Asistencial "Dr. Lucio Molas" (datos no publicados). A partir de estos antecedentes, se plantearon como objetivos del presente trabajo conocer la prevalencia de *Campylobacter* spp. como causal de diarrea aguda en humanos y caracterizar fenotípicamente los aislamientos recuperados de muestras clínicas de origen humano y de aves (pollos) y animales domésticos (perros y gatos) que convivían con los pacientes infectados, considerados estos últimos como posibles vías de transmisión del microorganismo. Este estudio comprendió la población de distintos barrios de la ciudad de Santa Rosa (La Pampa, Argentina) y fue de tipo descriptivo, de corte transversal. Desde el 1 de octubre de 2010 hasta el 1 de octubre de 2011 se realizaron 327 coprocultivos de muestras correspondientes a pacientes con diarrea aguda, que concurren al Servicio de Bacteriología del Hospital "Dr. Lucio Molas", previa consulta médica y consignación de datos filiatorios. El rango etario de los pacientes estuvo comprendido entre 2 meses y 59 años, el 61,7 % de ellos eran menores de 4 años.

Las muestras de materia fecal fueron procesadas para la búsqueda de enteropatógenos bacterianos. En aquellos pacientes con aislamiento positivo para *Campylobacter* spp., se realizó una visita a las viviendas, una encuesta y posteriormente hisopados rectales de mascotas y aves que compartían el espacio físico con los pacientes.

Las muestras de los pacientes y los hisopados de origen animal se cultivaron en medio selectivo para *Campylobacter* spp. (Campyloselect Agar-bioMérieux, Marcy/Etoile, Francia) y se incubaron en atmósfera de microaerofilia (GENbox microaer bioMérieux) durante 48 h a 42 °C. La identificación presuntiva se realizó mediante un examen en fresco de las colonias aisladas y coloración de Gram. Los aislamientos se caracterizaron por pruebas bioquímicas convencionales: catalasa, citocromo oxidasa, hidrólisis del indoxil acetato e hidrólisis del hipurato (5). Las especies identificadas fenotípicamente fueron confirmadas por PCR múltiple como *C. jejuni* y *C. coli*, según el protocolo de PCR de la Red WHO Global Foodborne Infections Network América del Sur (14). La extracción de ADN se realizó por hervido a partir de aislamientos caracterizados fenotípicamente como *C. jejuni* y *C. coli*.

Se determinó la sensibilidad a los antimicrobianos por el método de dilución en agar según el documento M45-A2 del CLSI; las drogas evaluadas fueron eritromicina, tetraciclina, ciprofloxacina, gentamicina y nitrofurantoína (3). Para la interpretación de los resultados con las primeras tres drogas se utilizaron los puntos de corte sugeridos en la Tabla 4 del citado documento, mientras que para la nitrofurantoína y la gentamicina, no incluidas en dicha tabla, se utilizaron los puntos de corte para *Enterobacteriaceae* de la Tabla 2A, M100-S22 (4), como lo sugiere la literatura internacional. Por consenso y en el marco del Programa Nacional de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos WHONET – Grupo *Campylobacter*, se enviaron al INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" los cinco primeros aislamientos de cada mes de origen humano; además, se remitió una selección de aislamientos de origen animal vinculados con los casos.

A fin de determinar la posible relación genética entre los aislamientos, se analizó una selección de 13 aislamientos de *C. jejuni* y 2 de *C. coli* de origen humano y/o provenientes de animales con evidencia de contacto (Tabla 1). Se aplicó el protocolo estandarizado de electroforesis en campo pulsado (PFGE) de la red PulseNet Internacional con la enzima de restricción *Sma*I, considerada como una técnica de poder discriminatorio para la subtipificación molecular de *Campylobacter* spp. (11, 13). Los resultados obtenidos fueron analizados usando el software BioNumerics v. 4.6 (Applied Maths) y los dendrogramas se construyeron aplicando el coeficiente de Dice, método UPGMA. La interpretación de los perfiles genéticos fue realizada teniendo en cuenta la robustez de la técnica de subtipificación, la diversidad genética del microorganismo en estudio, la prevalencia de cada patrón en el país y el contexto epidemiológico del estudio (2).

Con fines comparativos y de interpretación de resultados, los perfiles genéticos obtenidos se compararon con aquellos ingresados en la Base de Datos Nacional (BDN) de subtipos de *C. jejuni* y *C. coli*. Esta base contiene información recopilada desde el año 2005 hasta 2011 de casos esporádicos y asociados a brote, y de aislamientos de origen animal (aves) procedentes de diferentes provincias argentinas, en el marco de la Red Nacional de Diarreas y Patógenos Bacterianos de Transmisión Alimentaria.

Se aisló *Campylobacter* spp. en 50 de 327 muestras de origen humano (15,2 %). Otros enteropatógenos identificados fueron *Shigella* spp. (12,5 %), *Salmonella* spp. (8 %), *Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC) (2,4 %) y *Escherichia coli*

**Tabla 1.** Selección de aislamientos de *C. jejuni* y *C. coli* de origen humano y animal analizados por PFGE

N.º Aislamiento	Identificación	Fecha de aislamiento	Origen	Edad (años)
324/10 <sup>(1)</sup>	<i>C. jejuni</i>	04/10/10	Humano	59
332/10 <sup>(2)</sup>	<i>C. jejuni</i>	07/10/10	Humano	2
375/10 <sup>(2)</sup>	<i>C. jejuni</i>	07/10/10	Animal (perro)	
379/10 <sup>(3)</sup>	<i>C. jejuni</i>	10/11/10	Humano	2
376/10 <sup>(3)</sup>	<i>C. jejuni</i>	10/11/10	Animal (perro)	
49/11 <sup>(4)</sup>	<i>C. jejuni</i>	01/02/11	Humano	1
51/11 <sup>(4)</sup>	<i>C. coli</i>	02/02/11	Animal (perro)	
116/11 <sup>(5)</sup>	<i>C. jejuni</i>	11/04/11	Humano	51
111/11 <sup>(5)</sup>	<i>C. jejuni</i>	14/04/11	Animal (pollo)	
112/11 <sup>(5)</sup>	<i>C. jejuni</i>	14/04/11	Animal (pollo)	
129/11 <sup>(6)</sup>	<i>C. jejuni</i>	25/04/11	Humano	4
130/11 <sup>(6)</sup>	<i>C. jejuni</i>	25/04/11	Animal (perro)	
143/11 <sup>(7)</sup>	<i>C. coli</i>	11/05/11	Humano	1
144/11 <sup>(7)</sup>	<i>C. jejuni</i>	11/05/11	Animal (gato)	
145/11 <sup>(7)</sup>	<i>C. jejuni</i>	11/05/11	Animal (pollo)	

(1) Este paciente tenía contacto con una mascota (perro), pero el aislamiento de origen animal no fue recuperable para el análisis por PFGE; (2), (3), (4), (5), (6), (7) cada número agrupa aislamientos de origen humano y de sus respectivas mascotas y/o pollos.

enterohemorrágico (EHEC) (0,9 %). Las especies de *Campylobacter* encontradas fueron *C. jejuni* (n = 48) y *C. coli* (n = 2). Los resultados de la prueba de hidrólisis del hipurato de dos aislamientos de *C. jejuni* fueron de difícil interpretación, pero su identificación fue confirmada por PCR. De los 50 pacientes cuyos aislamientos fueron positivos para *Campylobacter* spp., 39 (78 %) eran menores de 4 años; 40 (80 %) tenían animales (perros, gatos, pollos), 6 (12 %) no tenían animales y 4 (8 %) no pudieron ser encuestados. De 36 animales

hisopados se aisló *Campylobacter* spp. en 12 muestras (33,3 %); 11 de estas contenían *C. jejuni* y la otra *C. coli*.

Se observó un 65 % de resistencia a ciprofloxacina y un 32 % de resistencia a tetraciclina en los 35 aislamientos de origen humano analizados. No se detectó resistencia a eritromicina, nitrofurantoína y gentamicina (Tabla 2). Los aislamientos de origen animal presentaron el mismo perfil de sensibilidad que aquellos genéticamente relacionados de origen humano (Figura 1).

**Tabla 2.** Perfil de sensibilidad a los antimicrobianos de aislamientos de *C. jejuni* y *C. coli* de origen humano (n = 35)

ATB	% R	CIM <sub>50</sub> (µg/ml)	CIM <sub>90</sub> (µg/ml)	Rango (µg/ml)
ERI	0 <sup>(1)</sup>	0,5	2	0,25 -2
CIP	65 <sup>(1)</sup>	8	32	0,06 -32
TET	32 <sup>(1)</sup>	0,25	128	0,06 - 512
NIT	0 <sup>(2)</sup>	1	1	0,25 -2
GEN	0 <sup>(2)</sup>	0,5	0,5	0,25 -1

ATB: antimicrobiano; ERI: eritromicina, CIP: ciprofloxacina, TET: tetraciclina, NIT: nitrofurantoína, GEN: gentamicina; R: resistente según, (1) los puntos de corte para *Campylobacter* spp. establecidos por el CLSI (3); (2) los puntos de corte para *Enterobacteriaceae* establecidos por el CLSI (4). No se detectaron aislamientos con sensibilidad intermedia.

Dendograma 1

Dice (Opt: 1.50%) (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

PFGE-Smal PFGE-Smal



Dendograma 2

Dice (Opt: 1.50%) (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

PFGE-Smal PFGE-Smal



**Figura 1.** Análisis de los patrones genéticos de aislamientos de *C. jejuni* (dendograma 1) y de *C. coli* (dendograma 2) de origen humano y animal obtenidos por PFGE-Smal y perfiles de resistencia a antimicrobianos. Se indican con recuadros los aislamientos de *C. jejuni* de origen humano y animal que fueron agrupados en *clusters* o grupos con idéntico perfil de PFGE. CIP: ciprofloxacina, TET: tetraciclina, R: resistente, S: sensible.

En el análisis por PFGE-Smal de 13 aislamientos de *C. jejuni* se identificaron siete subtipos genéticos. Dos de los subtipos, denominados ARDBRS16.00128 y ARDBRS16.0022, agruparon aislamientos de un paciente y de su correspondiente mascota (perro), el patrón ARDBRS16.022 agrupó, además, un aislamiento recuperado de un ave no relacionada. El subtipo ARDBRS16.0080 agrupó un aislamiento de origen humano, dos de aves de dicho paciente y uno de una mascota (gato) correspondiente a otro paciente. Los restantes aislamientos presentaron cuatro perfiles genéticos diferentes, dos de ellos con mayor similitud al patrón ARDBR16.0022 (Figura 1). Al comparar con la BDN, se observó que 2 de los 7 subtipos genéticos de *C. jejuni*, ARDBRS16.0022 y ARDBRS.0080, habían sido determinados en otras provincias de Argentina en aislamientos de origen

humano, en particular en Buenos Aires, Córdoba, Neuquén, Río Negro y Santa Fe; estas tres últimas provincias eran las de mayor representación dentro de la BDN. Los dos aislamientos de *C. coli* mostraron patrones de PFGE diferentes entre sí, los que fueron identificados anteriormente en aislamientos humanos y de aves de otras provincias.

En el período analizado, *Campylobacter* spp. fue el enteropatógeno más frecuentemente aislado en los casos de diarrea del Hospital “Dr. Lucio Molas”. La especie predominante fue *C. jejuni*, y los menores de 4 años fue el grupo etario más afectado. Estos datos son comparables con los comunicados en otros países (1). La PCR múltiple permitió confirmar las especies de *Campylobacter* spp. caracterizadas fenotípicamente y resultó útil para la identificación de aislamientos con resultados de difícil interpretación

en la prueba de hidrólisis del hipurato (7).

Los altos porcentajes de resistencia a ciprofloxacina y a tetraciclinas detectados coinciden con los observados a nivel nacional (9). Otros autores sugieren que los niveles de resistencia a fluoroquinolonas podrían estar relacionados con el uso de estos antimicrobianos en veterinaria (12). No se detectaron aislamientos resistentes a eritromicina ni a nitrofurantoína, mientras que en el resto del país se han informado muy bajos porcentajes de resistencia a macrólidos (3 %) y no se ha registrado resistencia a nitrofuranos (9). Sobre la base de estos resultados preliminares, la eritromicina podría utilizarse en nuestra población como droga de primera elección para el tratamiento de aquellas diarreas graves por *Campylobacter* spp. que lo requieran, en concordancia con informes de otras partes del mundo (10, 12).

La relación genética observada entre los aislamientos de pacientes y de sus mascotas sugiere la posible exposición a una misma fuente de infección a través de la alimentación, o bien, la transmisión de *C. jejuni* entre los pacientes y sus mascotas, como lo demostraron Wolfs *et al.* al informar el primer caso comprobado genéticamente de transmisión de *C. jejuni* entre animales y seres humanos (15). La identificación de subtipos genéticos de *C. jejuni* compartidos por distintos huéspedes y encontrados en diferentes provincias y años sugiere la circulación en el país de aislamientos con potencial de diseminación y transmisibilidad entre distintos huéspedes.

Estos resultados plantean la necesidad de fortalecer la vigilancia y el control de *Campylobacter* spp., considerando no solo el estudio de las aves reconocidas como principal reservorio a nivel mundial, sino también el de otros animales que podrían estar en contacto con las personas, como las mascotas (perros y gatos), ya que estas fueron evidenciadas como portadores asintomáticos del patógeno. El contacto con estos animales podría constituir un factor de riesgo para la infección, agravado en zonas con hábitos higiénicos deficientes.

A partir de los hallazgos presentados, es importante promover la integración de las áreas de trabajo de laboratorio, clínica humana y veterinaria, con el objetivo de contar con estudios epidemiológicos completos de vigilancia e investigación de brotes en el país, que permitan determinar fuentes de infección y vías de transmisión del microorganismo, para la toma de medidas oportunas de prevención y control.

**Agradecimientos:** al personal del Servicio de Bacteriología del Hospital "Dr. Lucio Molas" por su colaboración. Al Dr. Marcos Mayer y a la Dra. Claudia Elorza, por la revisión del manuscrito.

## BIBLIOGRAFIA

1. Acke E, Carroll C, O'Leary A, McGill K, Kelly L, Lawlor A, Madden R, Moran L, Scates P, Mc Namara E, Moore J, Jones B, Seamus F, Whyte P. Genotypic characterization and cluster analysis of *Campylobacter jejuni* isolates from domestic pets, human clinical cases and retail food. *Ir Vet J* 2011; 64: 6.
2. Barrett TJ, Gerner-Smidt P, Swaminathan B. Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. *Foodborne Pathog Dis* 2006; 3: 20-31.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline. Second edition, 2010; M45-A2. Wayne, PA, EEUU.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 22<sup>th</sup> Informational Supplement, 2012; M100-S22. Wayne, PA, EEUU.
5. Farace M, Viñas M. Manual de procedimientos para el aislamiento y caracterización de *Campylobacter* spp. Departamento de Bacteriología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" Centro Regional de Referencia WHO-Global Salm Surv para América del Sur, 2007, p. 5-33.
6. Fernández H, Kahler K, Salazar R, Ríos M. Prevalence of thermotolerant species of *Campylobacter* and their biotypes in children and domestic birds and dogs in southern Chile. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1994; 36: 433-6.
7. Giacoboni G, Echeverría MG, Perfumo C. Aplicación de PCR-RFLP para subtipificar *Campylobacter jejuni*. *Rev Argent Microbiol* 2005; 37: 81-3.
8. López C, Agostini A, Giacoboni G, Cornero F, Tellechea D. Campilobacteriosis en una comunidad de bajos recursos de Buenos Aires, Argentina. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2003; 22: 1013-20.
9. Lucero MC, Hoffer A, Veliz O, Albornoz E, Guerreiro L, Galas M, Farace MI, Grupo *Campylobacter*, Corso A. Perfil de sensibilidad a los antimicrobianos en aislamientos de origen humano de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en Argentina: Vigilancia nacional 2007-2010. VII Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología, Parasitología Clínicas (SADEBAC). *Rev Argent Microbiol* 2012; 44 Supl 1: 58.
10. Nachamkin I, Engberg J, Aarestrup FM. Diagnosis and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* species. En: Nachamkin I, Blaser M, editors. *Campylobacter*. 2<sup>nd</sup> Edition. Washington DC, ASM Press, 2000, p. 45-66.
11. Newell DG, Frost JA, Duim B, Wagenaar JA, Madden RH, Van der Plas J, On SLW. New developments in the subtyping of *Campylobacter* species. En: Nachamkin I, Blaser M, editors. *Campylobacter*. 2<sup>nd</sup> Edition. Washington DC, ASM Press, 2000, p. 27-44.

12. Payot S, Bolla J, Corcoran D, Fanning S, Mgraud F, Zhang Q. Mechanism of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Microbes Infect* 2006; 8: 1967-72.
13. Ribot EM, Fitzgerald C, Kubota K, Swaminathan B, Barrett TJ. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1889-94.
14. Wagenar J, Van Bergen M. Multiplex PCR for differentiation of *C. coli* and *C. jejuni*. *Global Salm-Surv.* A global *Salmonella* surveillance and laboratory support project of the World Health Organization. *Laboratory Protocols. Level 4 Training Course 1* Ed. February 2003. [On-line] [http://www.antimicrobialresistance.dk/data/images/training%20course%20-%20level%203+\\_4\\_.pdf](http://www.antimicrobialresistance.dk/data/images/training%20course%20-%20level%203+_4_.pdf).
15. Wolfs T, Duim B, Geelen S, Rigter A, Thomson-Carter F, Fler A, Wagenaar J. Neonatal sepsis by *Campylobacter jejuni*: genetically proven transmission from a household puppy. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 97-9.

Recibido: 17/1/2012- Aceptado: 31/10/ 2012