



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

Dr. Heriberto Fernández

Instituto de Microbiología Clínica

Facultad de Medicina

**DETERMINACIÓN DE RELACIONES EPIDEMIOLÓGICAS EN
CEPAS DE *Campylobacter jejuni* RESISTENTES A QUINOLONAS,
AISLADAS DE DISTINTOS ORÍGENES**

Tesis de Grado presentada como parte de
los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y Título
Profesional de *Bioquímico*

RICARDO ANDRÉS VELOSO BAHAMONDE

VALDIVIA - CHILE

2005

Dedicatoria

A todas esas personas que me motivan a seguir adelante, a crear, soñar y a los que me sirven de puente para ver la realidad.

Agradecimientos.

- Al Dr. Heriberto Fernández, por ser un gran guía en el camino de la ciencia.
- Al Instituto de Microbiología Clínica de la Universidad Austral de Chile y al Laboratorio de Antibióticos del Departamento de Microbiología de la Universidad de Concepción por su por su excelente acogida y por proporcionarme toda la ayuda que necesité.
- Un agradecimiento especial la Sra. Paty, a Pancho y a la Sra. Isolde por su amistad y apoyo.
- A los Profesores del Instituto de Microbiología Clínica y a mis compañeros tesisistas por su paciencia ;-)

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS.....	i
INDICE DE FIGURAS.....	iii
INDICE DE TABLAS.....	iv
INDICE DE ABREVIATURAS.....	v
1. RESUMEN.....	1
1.1 SUMMARY.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1. Hipótesis.....	9
2.2. Objetivo general.....	9
2.3. Objetivos específicos.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1. Materiales.....	10
3.1.1. Medios de Cultivo.....	10
3.1.1.1. Medios Sólidos.....	10
3.1.1.2. Medios de conservación.....	10
3.1.1.3. Medios selectivos.....	10
3.1.1.4. Caldos y medios de enriquecimiento.....	11
3.1.2. Cepas (material biológico).....	11
3.1.3. Antibióticos.....	13
3.1.4. Soluciones.....	13
3.2. Métodos.....	16
4. RESULTADOS.....	21

4.1. Antibiograma.....	21
4.2. Perfil de proteínas.....	26
4.3. Perfil de restricción genómico.....	32
5. DISCUSIÓN.....	38
6. BIBLIOGRAFÍA.....	47

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Dendograma de cluster jerarquico para análisis de antibiograma.....	23
Figura 2 Electroforesis de cepas de <i>C. jejuni</i> resistentes y no resistentes a ácido nalidíxico.....	27
Figura 3 Dendograma de cluster jerárquico para análisis de perfil de proteínas.....	30
Figura 4 Perfil de restricción de cepas de <i>C jejuni</i> , <i>C coli</i>	33
Figura 5 <i>Dendograma de cluster jerárquico para análisis de mapa de restricción</i>	35
Figura 6 <i>Esquema de comparación entre las agrupaciones propuestas para perfil de restricción genómico y antibiograma</i>	39
Figura 7 <i>Esquema de comparación entre perfil de proteínas y perfil de restricción genómico; antibiograma y perfil de proteínas</i>	41

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Origen y número de las cepas de C. jejuni utilizadas en el estudio.....</i>	12
Tabla 2 <i>Antibióticos utilizados en el estudio.....</i>	14
Tabla 3 <i>Diámetros críticos para determinar susceptibilidad y resistencia.....</i>	18
Tabla 4 <i>Patrones de susceptibilidad y resistencia de las cepas en estudio.....</i>	22
Tabla 5 <i>Antibiotipos encontrados ordenados por grado de resistencia-susceptibilidad.....</i>	24
Tabla 6 <i>Lista de pesos moleculares entre las 6 bandas variables de distintas cepas ácido nalidíxico resistentes.....</i>	28
Tabla 7 <i>Agrupación de las cepas ácido nalidíxico resistentes según sus perfiles proteicos.....</i>	31
Tabla 8 <i>Cf por banda y por cepa.....</i>	34
Tabla 9 <i>Agrupación de las cepas ácido nalidíxico resistentes según sus perfiles de restricción.....</i>	37

INDICE DE ABREVIATURAS

%v/v	Porcentaje volumen volumen
Acril/bis	Solución de Acrilamida/Bisacrilamida
Ala	Alanina
An	Acido Nalidíxico
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
C	Cloramfenicol
Cf	Distancia desde el inicio del gel, al centro de cada banda dividida entre la distancia a la que ha migrado el ion líder.
CHEF	Electroforesis de campo eléctrico homogéneo de contornos limitados (Contour-clamped homogeneous electric field)
Cip	Ciprofloxacino
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Eritromicina
EDTA	Ácido etilen diamino tetraacético
Em	Enrofloxacino
F	Furazolidona
G	Gentamicina
GyrA	DNA girasa
I	Intermedio (resistencia intermedia al antibiotico)
ISP	Instituto de Salud Publica

kd	Kilodalton
Nor	Norfloxacino
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)
PBS	Buffer fosfato salino
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis.
R	Resistente (resistente al antibiotico)
S	Sensible (sensible al antibiotico)
SAG	Servicio Agrícola y Ganadero
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDW	Agua destilada esteril (Sterile distilled water)
Sma1	Enzima de restricción proveniente de <i>Serratia marcescens</i>
T	Tetraciclina
TBE	Buffer Tris Borato EDTA
TE	Buffer Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamino
Thr	Treonina
TRIS	Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol

1. RESUMEN

La incidencia de *Campylobacter jejuni* se ha incrementado en la última década en todo el mundo, siendo la principal causa de infecciones intestinales en los países desarrollados. El objetivo de este estudio, fue establecer las relaciones epidemiológicas existentes entre un total de veinticinco cepas resistentes a quinolonas aisladas desde hígado de pollo comercial, gallina, pelícano y agua del río Valdivia, a través de la exploración de su similitud genética y fenotípica utilizando para esto subtipificación por pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), perfiles de proteínas y la resistencia a 8 antibióticos. Nuestros resultados fueron analizados, a través de la utilización de métodos de agrupación jerárquicos, obteniéndose un alto grado de congruencia en dos de los tres métodos utilizados y un total de tres grupos de cepas relacionadas epidemiológicamente, con diferente grado de resistencia antibiótica y siguiendo aproximadamente, un patrón por origen.

1.1 SUMMARY

The incidence of *Campylobacter jejuni* has increased during the last decade all over the world being main cause of bacterial enteritis in developed countries. The objective of this study was to establish epidemiological relationships among twenty-five quinolone resistant strains isolated from different sources (commercial chicken livers, hens, pelicans and water samples of Valdivia River. The exploration of its genetic and phenotypic similarities was carried out by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), protein profiles and the resistance patterns to eight antibiotics. The results were analyzed using hierarchic cluster methods. Two of the three methods showed the highest degree of congruency obtaining three groups of isolates epidemiologically related, with different degrees of antibiotic resistance and approximately with one pattern per origin.

2. INTRODUCCIÓN.

El género *Campylobacter* pertenece a la familia *Campylobacteraceae*, agrupa bacilos gram negativos, curvos, no esporulados, en forma de S itálica o espirilados, que tienen entre 0.2 y 0.9 μm de ancho y 0.5 y 5 μm de largo, son móviles por un flagelo único en uno o en sus dos extremos. En cultivos de varios días pueden tomar forma cocoide. Las especies del género son microaerófilas y poseen metabolismo respiratorio. Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 26 y 42 °C . Las colonias generalmente no presentan pigmentación. Todas las especies son oxidasa positivas. Siendo la gran mayoría de ellas identificables por reacciones bioquímicas.

El género *Campylobacter* esta compuesto actualmente por 17 especies (NCBI taxonomy browser 2004), estas son:

<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter mucosalis</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Campylobacter concisus</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Campylobacter helveticus</i>
<i>Campylobacter lari</i>	<i>Campylobacter showae</i>
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	<i>Campylobacter curvus</i>
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	<i>Campylobacter rectus</i>
<i>Campylobacter faecalis</i>	<i>Campylobacter gracilis</i>
<i>Campylobacter hominis</i>	<i>Campylobacter lenienae</i>
<i>Campylobacter sputorum</i>	

Se denomina campylobacteriosis a las infecciones producidas por *Campylobacter*, las que son causadas por un limitado número de especies del género entre las que destacan *Campylobacter coli* y *Campylobacter jejuni*. Una vez ocurrido el contacto infectante, prosigue un período de incubación que oscila entre los 2 y los 5 días. Luego, se manifiesta el cuadro clínico, generalmente una diarrea aguda, que es

auto limitada y con una duración inferior a una semana. Además de la diarrea, suele cursar con dolor abdominal y puede haber náuseas, vómitos, cefalea y malestar general. Si bien es cierto, en pacientes normales la diarrea provocada por *Campylobacter* no suele ser grave, en pacientes inmunocomprometidos el pronóstico suele ser más serio, pudiendo, en caso de fallar el tratamiento, provocar la muerte (Pidcock y col, 2000, Fernandez 2003).

Las especies del género *Campylobacter* están ampliamente distribuidas en la naturaleza, se encuentran en un variado número de especies animales domésticas y salvajes, en los que puede causar un amplio número de enfermedades que van desde el aborto e infertilidad hasta infecciones intestinales (Scarcelli y col, 2001).

Las infecciones intestinales en el ser humano constituyen un importante problema de salud pública en países en vías de desarrollo, produciendo altas tasas de morbilidad y mortalidad, especialmente entre individuos de corta edad (Acuña, 2002). Entre los agentes de diarrea bacteriana se encuentran especies termotolerantes del género *Campylobacter*, específicamente *C. jejuni* y *C. coli* (Fernandez 1992), las que son reconocidas como la primera causa de diarrea en países desarrollados (Steinbrueckner y col, 2001; Ribot y col, 2001), por sobre otros patógenos como *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, y *Escherichia coli* (Pedersen y col 2003). En el año 2001 se estimaba que en Estados Unidos alrededor de 2 millones y medio de personas (Steinbrueckner y col, 2001, Pidcock y col, 1999) experimentaron cuadros diarreicos relacionados con *Campylobacter* y se encontró una prevalencia de portadores sanos de menos del 1%. A pesar de los altos estándares de salubridad en la fabricación de

alimentos en Europa Occidental, Canadá, Australia, Estados Unidos y Nueva Zelanda el número de infecciones por *Campylobacter* lejos de disminuir, ha aumentado en los últimos decenios, sin existir ninguna explicación para esto (Pedersen y col, 2003), y en Dinamarca los casos se han triplicado en los últimos diez años (Moller y col, 2000).

En América Latina, estudios en niños con diarrea muestran frecuencias variables de aislamiento para *Campylobacter*, dependiendo de la región y el origen de la población estudiada pero, porcentualmente menor que otros patógenos como *Escherichia coli* (EPEC) o *Shigella*. Sin embargo, existen estudios en los que la frecuencia de aislamiento es similar en casos de niños con diarrea y en controles sanos (Urestarazu y col, 1999; Acuña y col, 2002).

La campylobacteriosis es conocida como una zoonosis de distribución mundial. Los reservorios del germen suelen ser animales domésticos (perros, gatos, aves) y la fuente de infección son principalmente alimentos de origen animal, leche sin pasteurizar y agua contaminada (Steinbrueckner y col, 2001; Ribot y col, 2001; Scarcelli y col, 2001, Giacoboni y col, 2001; Pedersen y col 2003). Estudios recientes han identificado el consumo de alimentos de origen aviar como un factor de riesgo para la campylobacteriosis (Pedersen y col, 2003).

En la década de los 80 se introdujo las fluoroquinolonas para tratar diferentes patologías, entre ellas la mayor parte de las infecciones intestinales, teniendo una buena actividad “in-vitro” tanto para las especies termofílicas del género *Campylobacter*, como para los miembros de la familia *Enterobacteraceae*. El desarrollo de resistencia a las quinolonas en especies de *Campylobacter* surge como una respuesta a la presión selectiva ejercida por el uso indiscriminado de estos antibióticos

en animales y humanos (Pedersen y col, 2003). Las fluoroquinolonas son comúnmente usadas para tratar un gran número infecciones en humanos. En animales de granja, también son ampliamente usadas como tratamiento de varias infecciones provocadas por agentes como *Escherichia coli*, para la eliminación de saprobios (en aves) como *Salmonella* o, simplemente, a manera de profiláctico, provocando el surgimiento de cepas resistentes en animales de consumo humano (Pederesen y col, 2001). Las cepas resistentes que están apareciendo como entidades biológicas emergentes, han sido aisladas primero de animales, y debido al carácter zoonótico de la infección intestinal producida por *Campylobacter* se ha pesquisado posteriormente esta resistencia en el ser humano (Reina y col, 1992; Piddock y col, 1999; Chuma y col 2004; Jacobs-Reitsma y col, 1994, Endtz y col 1991). En el año 1991 se informó la aparición emergente de cepas resistentes a quinolonas aisladas de humanos en los Países Bajos, coincidiendo con la introducción de las fluoroquinolonas en medicina veterinaria (Piddock y col, 1999, Wretlind y col 1992).

La resistencia a fluoroquinolonas en cepas de *Campylobacter* está asociada a mutaciones en genes que codifican subunidades de la DNA girasa (*gyrA*) y, ocasionalmente, en los que codifican para la topoisomerasa IV (subunidad *parcC*). La DNA girasa aislada de cepas resistentes ha demostrado ser 100 veces más resistente a la inhibición por quinolonas, que la proteína de cepas sensibles. Por secuenciación de *GyrA* mutado, se ha podido demostrar que mutaciones en las posiciones Thr-86, Asp-90 y Ala-70 fueron las responsables de la resistencia. La mutación en Thr-86 está asociada con un nivel más alto de resistencia a ácido nalidíxico y ciprofloxacino, que las mutaciones en Asp-90 y Ala-70. También se ha demostrado que cepas de *C. jejuni*

altamente resistentes a ciprofloxacino presentan mutaciones en Thr-86 de Gyr-A, y en la posición Arg-139 de la topoisomerasa IV (subunidad parC). Existe, además, evidencia de eflujo de antibióticos en una cepa de *C. jejuni*, la cual era resistente también, a eritromicina, tetraciclina, cloramfenicol y muchos B-lactámicos (Engberg y col 2001, Piddock y col 1999).

En Chile, el control del uso de antibióticos se hace a través de dos órganos gubernamentales el Instituto de Salud Pública (ISP) en el caso de humanos y Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) en el caso de animales, con muy poca coordinación entre ellos (lo que se desprende de entrevistas a funcionarios). El control del uso de antibióticos es estricto respecto a venta y tiempo de uso en seres humanos. En cambio, en animales, el Servicio Agrícola y Ganadero ejerce muy poco o casi ningún control sobre las cantidades y el uso de este tipo de fármacos, con la excepción de la prohibición de uso de cloramfenicol, nitrofuranos y 5-nitroimidazoles además de una estricta reglamentación respecto a trazas de antibióticos en animales para consumo humano, debido a que pueden ser “dañinos para la salud del consumidor” (SAG, 2004).

En Chile no existen normativas ministeriales de epidemiología y de salud pública en relación a *Campylobacter* como en el caso de *Salmonella* o *Vibrio cholerae*. Los datos generados en torno a *Campylobacter* se han producido por grupos de investigación, la mayoría de ellos ligados a universidades.

Teniendo en cuenta el aumento del número de infecciones por *Campylobacter* asociada al consumo de alimentos en los países desarrollados (y probablemente también en Chile), Junto a la aparición emergente de cepas resistentes

a quinolonas, la poca información existente en nuestro medio respecto a este patógeno, el carácter zoonótico de las infecciones intestinales por *Campylobacter* y teniendo presente que en nuestra región coexisten varios factores que pueden permitir su mantención y transmisión, como son una hoya hidrográfica importante, una economía basada en gran parte en la actividad agropecuaria, la cercanía del hombre a diversas especies animales, el consumo de alimentos de origen animal con riesgo de transmisión y la existencia de numerosas especies de aves domésticas y de vida libre, se estima necesario contar con técnicas que permitan diferenciar cepas de *Campylobacter* de manera simple y económica, con la finalidad de identificar las fuentes de contagio y reservorios. Con ello se hace posible determinar las rutas de transmisión del germen, las cuales, en nuestra zona, se desconocen en gran medida. Siendo la aparición de cepas resistentes a quinolonas un problema emergente, se hace pertinente aplicar las metodologías utilizadas en este estudio a cepas con esta característica (resistentes a quinolonas), aisladas de distintos orígenes.

Para determinar estas relaciones epidemiológicas se han propuesto técnicas de laboratorio simples como es el caso de la determinación del antibiograma, una técnica compleja, la determinación del perfil de proteínas totales, que corresponde a otra técnica de bajo costo y finalmente una técnica de alta complejidad, estandarizada y universalmente aceptada por diferentes autores como es el análisis del perfil de restricción del DNA, utilizando electroforesis en campo pulsado.

2.1. Hipótesis

Las cepas de *C. jejuni* resistentes a fluoroquinolonas aisladas de diferentes orígenes tienen relaciones epidemiológicas susceptibles de ser demostradas por su antibiograma, el perfil de proteínas o el análisis de restricción genómico con PFGE

2.2. Objetivo general

Determinar las relaciones epidemiológicas existentes entre cepas de *C. jejuni* resistentes a quinolonas a través de distintos métodos (antibiograma, perfil de proteínas y perfil de restricción)

2.3. Objetivos específicos

- ◆ Establecer el antibiograma de cepas de *C. jejuni* resistentes a fluoroquinolonas aisladas de diferentes orígenes (alimentos (pollo), gallinas, pelicanos, agua).

- ◆ Determinar el perfil de proteínas y el perfil de restricción genómico para cada cepa.

- ◆ Establecer si existe relación epidemiológica de acuerdo a al perfil genotípico y/o fenotípico de estas cepas

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Medios de Cultivo

3.1.1.1. Medios Sólidos

Agar Sangre.

Preparado a partir de Agar Brucella (Oxoid) más un 5 %v/v de sangre humana. Fue utilizado para cultivar las cepas para el perfil de proteínas y realizar la electroforesis en campo pulsado.

Agar Mueller-Hinton.

Preparado a partir de Agar Mueller-Hinton (Oxoid) mas un 5%v/v de sangre humana, con un volumen total por placa de 20 ml. Utilizado para realizar los antibiogramas

3.1.1.2. Medios de conservación

Medio Freezing.

Caldo Brucella mas un 15% de glicerol. Se lo usó en la crioconservación (-20 °C) y respaldo de cepas por periodos extensos de tiempo (meses).

3.1.1.3. Medios selectivos

Medio Skirrow

Agar Brucella más mezcla antibiótica compuesta por vancomicina 10mg/l, polimixina B

2500 UI/l , trimetoprim 5mg/l (suplemento SR069E Oxoid), 5%v/v de sangre humana. Utilizado principalmente para la mantención de cultivos puros en el tiempo y como fuente de material biológico para repiques en agar sangre.

3.1.1.4. Caldos y medios de enriquecimiento

Caldo Tioglicolato.

Caldo Tioglicolato (Oxoid), utilizado para viabilización de cepas congeladas por largos periodos de tiempo o para enriquecimiento de cultivos envejecidos.

Tioglicolato semi sólido .

Caldo Tioglicolato (Oxoid), mas un 0.2 a 0.4 % de agar. Se lo usó en la conservación de cepas a 4°C por periodos cortos de tiempo (una semana).

Nota: *Todos los medios comerciales fueron preparados según las indicaciones del proveedor.*

3.1.2. Cepas (material biológico)

Cepas resistentes al ácido nalidíxico

Se trabajo con 25 cepas de *C. jejuni* de distintos orígenes, todas ellas conservadas en el cepario del Instituto, cuyo origen y numero se detalla en la tabla 1.

Cepas no resistentes a ácido nalidíxico

Se trabajó con la cepa G001 proveniente de gallina, perteneciente a la especie *C. coli*, sin resistencia antibiótica a las drogas utilizadas y con la cepa control , *C. jejuni* Li06.

TABLA 1

Origen y número de las cepas de C. jejuni utilizadas en el estudio.

Origen	Nº	Código
Hígado de pollo para consumo humano	18	HP
Cepas aisladas de río	3	A
Pelícano	2	PK
Gallina	2	G

Otras cepas

Escherichia coli O28, utilizada como control negativo en la determinación de perfiles proteicos.

3.1.3. Antibióticos

Se utilizaron 9 antibióticos, los que se describen en la tabla 2

3.1.4. Soluciones

TBE 10x

Tris 1mM, ácido bórico 0.83 M, EDTA 10mM

TE

Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.

Solucion de lisis

Tris 50 mM, EDTA 50 mM (pH 8), sarcosina 1%, 0.1 mg de proteinasa K por ml.

PBS

Buffer fosfato 0.1M, NaCl 0.85%, pH 7.4,

4x Upper Buffer

Tris 0.5 M, SDS 0.4%, pH 6.8.

4x Lower Buffer

Tris 1.5M, SDS 0.4%, pH 8.8.

Acrilamida/Bisacrilamida

se usó en una proporción de 30/0.8 de acrilamida/bisacrilamida

TABLA 2

Antibióticos utilizados en el estudio

Antibiótico	cod	Familia
Acido Nalidixico	An	Quinolona
Ciprofloxacino	Cip	Fluoroquinolona
Enrofloxacino	Em	Fluoroquinolona
Norfloxacino	Nor	Fluoroquinolona
Furazolidona	F	Nitrofurano
Eritromicina	E	Macrolido
Tetraciclina	T	Tetraciclina
Gentamicina	G	Aminoglicosido
Cloramfenicol	C	Fenicol

10x Buffer de Corrida

Tris 0.25M, glicina 1.92M, SDS 1%, pH 8.3

Buffer de Carga

Tris 0.25M, SDS 6%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0.04%, β -mercapto etanol 20%

Estándar de Peso molecular.

Se utilizo un estándar de 7 bandas de entre 116 y 14.4 Kd fabricado por fermentas (#SMO431)

3.2. Métodos

Conservación de las cepas.

Para la conservación de las cepas se cosechó de la superficie de la placa las colonias traspasando las bacterias a un tubo Eppendorf estéril con aproximadamente 1 ml. de medio Freezing. Posteriormente las cepas fueron guardadas a -20°C. Para periodos cortos de tiempo (1 semana) se utilizó tioglicolato semi-sólido para la conservación a 4°C.

Descongelamiento de cepas

Las cepas fueron descongeladas y traspasadas a agar sangre y a caldo tioglicolato e incubadas a 37°C, en microaerofilia. A las 24-48 horas se procedió a comprobar la presencia de bacilos curvos gram negativos, las colonias fueron repicadas en agar Skirrow e incubadas a 42 °C, en microaerofilia, por 24 h.

Microaerofilia.

Para lograr las condiciones de microaerofilia se utilizó una mezcla de gases con un 6% de O₂, 10% de CO₂, 84% de N₂ o bien se utilizaron sobres Campygen (Oxoid), todo esto en jarras herméticas de microaerofilia (Oxoid).

Determinación de la resistencia antibiótica.

A partir de cultivos de 24 hrs se preparó una suspensión bacteriana equivalente a 0,5 McFarland. Se diluyeron 5 µl de esta suspensión en 495 µl de suero fisiológico y se

sembró en agar Müeller-Hinton con tórula en tres direcciones distintas (Carret, G. y col). Los antibiogramas se realizaron con 9 antibióticos, ácido nalidíxico, cloramfenicol, gentamicina, eritromicina, tetraciclina, ciprofloxacino, enrofloxacino, norfloxacino y furazolidona. Con un compás se determinó el diámetro del halo de inhibición en tres direcciones distintas, promediando los resultados.

Antibiograma

Para determinar susceptibilidad bacteriana se utilizaron los valores propuestos por la Sociedad Francesa de Microbiología para definir la susceptibilidad o resistencia para cada cepa (Carret, G y col), según la tabla 3:

Determinación de perfiles proteicos.

Preparación de las muestras

El protocolo se realizó según lo propuesto por Giacoboni y col (1999) y adaptado a nuestro laboratorio. Se tomó una asada de cultivo en agar sangre la que fue suspendida en 1 ml de suero fisiológico estéril. Esta suspensión se centrifugó durante 5 min a 5000 rpm, lavando el pellet, de esta manera, tres veces. Finalmente, las bacterias fueron suspendidas en solución de extracción y hervidas por 5 min a baño maría.

Se prepararon los geles utilizando buffer discontinuos en una cámara de 17x19 cm, con un volumen aproximado de 30 ml. El gel separador se preparó al 12.5% a partir de 10,42 ml de solución Acril/bis, 6,25 ml de buffer lower, 1,2 ml de persulfato

TABLA 3

Diámetros críticos para determinar susceptibilidad y resistencia de acuerdo a la Sociedad Francesa de Microbiología.

Antibiótico	Diámetros críticos en mm		
	Resistencia (R)	Intermedio (I)	Susceptibilidad (S)
Tetraciclina	<17	Entre 17 y <19	>=19
Ácido Nalidixico	<15	Entre 15 y <20	>=20
Ciprofloxacino	<19	Entre 19 y <22	>=22
Enrofloxacino	<19	Entre 19 y <22	>=22
Norfloxacino	<19	Entre 19 y <22	>=22
Furazolidona	<14	Entre 14 y <17	>=17
Eritromicina	<17	Entre 17 y <22	>=22
Cloramfenicol	<19	Entre 19 y <23	>=23
Gentamicina	<14	Entre 14 y <16	>=16

de amonio, 20 μ l de TEMED y agua con un volumen total de 25 ml. El gel espaciador al 5%, se preparó utilizando 640 μ l de solución Acril/bis, 1260 μ l de upper buffer, 500 μ l de persulfato de amonio, 6 μ l de TEMED y agua para un volumen total de 5 ml.

Los geles fueron digitalizados (escáner Canon FB-320p) y las imágenes generadas se normalizaron respecto a los estándar de peso molecular con un software de tratamiento de imágenes ("The Gimp" versión 2). Se obtuvieron entre 30 y 35 bandas por carril. Se determinó el peso molecular de las bandas de interés a través del cálculo de C_f (se define C_f como la distancia desde el inicio del gel, al centro de cada banda dividida entre la distancia a la que ha migrado el ion líder) para cada carril. Se usó el estándar de peso molecular como curva de calibración y métodos de regresión para la determinación de las curvas probables.

Las bandas de interés se obtuvieron a través de análisis visual de bandas de alta intensidad que se encontraran presente en la mayoría de las cepas y que presentaran una manifiesta "variabilidad".

Electroforesis en campo pulsado.

El protocolo se realizó según lo propuesto por Ribot y col (2001). Se hizo una suspensión bacteriana en 2 ml de PBS, con una densidad óptica a 610 nm de entre 0.57 y 0.82. Se tomaron 400 μ l y se le agregaron 25 μ l de proteinasa K (20 mg/ml). Se tomaron 400 μ l de agarosa al 1% (55°C) en TE y se y se mezcló con el mix bacteriano. El mix fue puesto en moldes y se dejó enfriar. Una vez frío se sacaron los PLUG de los moldes dejándolos toda la noche en 1200 μ l de solución de lisis a 54°C. Se lavaron 4 veces (15 a 20 min por lavado a 54°C), la primera con agua ultra pura y

las siguientes con buffer TE, para finalmente, dejarlos en 1 ml de buffer TE a temperatura ambiente. Los PLUG fueron cortados en trozos de aproximadamente 2 mm y puestos en 100 μ l buffer de pre-restricción (buffer de enzima 10x en SDW) 1x por 5 min a temperatura ambiente. Se eliminó la mezcla de pre-restricción y se agregaron 200 μ l de mezcla de restricción (según protocolo de enzima Sma1) y se incubó a 26°C por 2 hrs. Se eliminó la mezcla de restricción y se suspendieron los PLUG en TBE 0,5x. La corrida se hizo en agarosa 1% en buffer TBE 0.5x por 18 horas bajo las siguientes condiciones $T_i = 6.75$ A $T_f = 38.35$ A Volt= 6 volt/cm (CHEF-DR II BioRad). Los geles fueron digitalizados y se calculó el Cf para cada banda.

Análisis de datos.

El análisis de los datos numéricos generados por las tres metodologías se hizo con el software "SPSS Versión 11". El método estadístico utilizado fue el análisis de conglomerados por métodos jerárquicos (hierarchical cluster), usando enlace promedio entre grupos (average linkage between groups), y como método de aproximación se utilizó block.

4. RESULTADOS

4.1. Antibiograma

A partir de los diámetros de halo por cepa con los distintos antibióticos y de los datos de la tabla 3 se creó la tabla 4 en la que se encuentran las cepas ordenadas según su grado de resistencia a los antibióticos utilizados en este estudio.

Todas las cepas fueron sensibles a gentamicina, tetraciclina y furazolidona. De las 25 cepas 3 fueron resistentes, 3 de susceptibilidad intermedia y las 19 restantes sensibles a eritromicina. Para cloramfenicol 3 cepas mostraron susceptibilidad intermedia y las 22 restantes fueron susceptibles, coincidiendo las cepas de susceptibilidad intermedia a cloramfenicol con las resistentes a eritromicina .

Se encontró que todas las cepas resistentes a ácido nalidíxico lo fueron, además, a ciprofloxacino y norfloxacino. En el caso de enrofloxacin se encontraron 14 cepas resistentes, 4 sensibles y 7 intermedias.

Con los datos expuestos en la tabla 4 se hizo un análisis jerárquico lográndose los resultados mostrados en la figura 1. En ella se observa la existencia de un máximo de 7 antibiotipos según sus patrones de susceptibilidad y resistencia. Con esta información se creó la tabla 5 la que muestra los antibiotipos propuestos ordenados de mayor a menor por grado y cantidad de resistencia a distintos antibióticos.

En la figura 1 se observa la existencia de un máximo de 7 antibiotipos según sus patrones de susceptibilidad y resistencia. Con esta información se creó la tabla 5 la que muestra los antibiotipos propuestos ordenados de mayor a menor por grado y cantidad de resistencia a distintos antibióticos.

TABLA 4

Patrones de susceptibilidad y resistencia de las cepas de Campylobacter en estudio.

CEPA	An	Cip	Nor	Em	E	C	G	T	F
A25	R	R	R	R	R	I	S	S	S
A87	R	R	R	R	R	I	S	S	S
A61	R	R	R	R	R	I	S	S	S
HP96	R	R	R	R	I	S	S	S	S
HP15	R	R	R	R	S	S	S	S	S
HP54	R	R	R	R	S	S	S	S	S
HP13	R	R	R	R	S	S	S	S	S
HP19	R	R	R	R	S	S	S	S	S
HP52	R	R	R	R	S	S	S	S	S
HP100	R	R	R	R	S	S	S	S	S
HP46	R	R	R	R	S	S	S	S	S
HP14	R	R	R	R	S	S	S	S	S
HP108	R	R	R	R	S	S	S	S	S
HP109	R	R	R	R	S	S	S	S	S
HP107	R	R	R	I	I	S	S	S	S
HP006	R	R	R	I	S	S	S	S	S
HP55	R	R	R	I	S	S	S	S	S
HP98	R	R	R	I	S	S	S	S	S
HP50	R	R	R	I	S	S	S	S	S
HP104	R	R	R	I	S	S	S	S	S
HP102	R	R	R	I	S	S	S	S	S
PK44	R	R	R	S	I	S	S	S	S
G60	R	R	R	S	S	S	S	S	S
G68	R	R	R	S	S	S	S	S	S
PK7	R	R	R	S	S	S	S	S	S
G001	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Cepa G001: control sensible. Para el análisis numérico se consideró sensible(S)=1, intermedio(I)=2, resistente(R)=3.

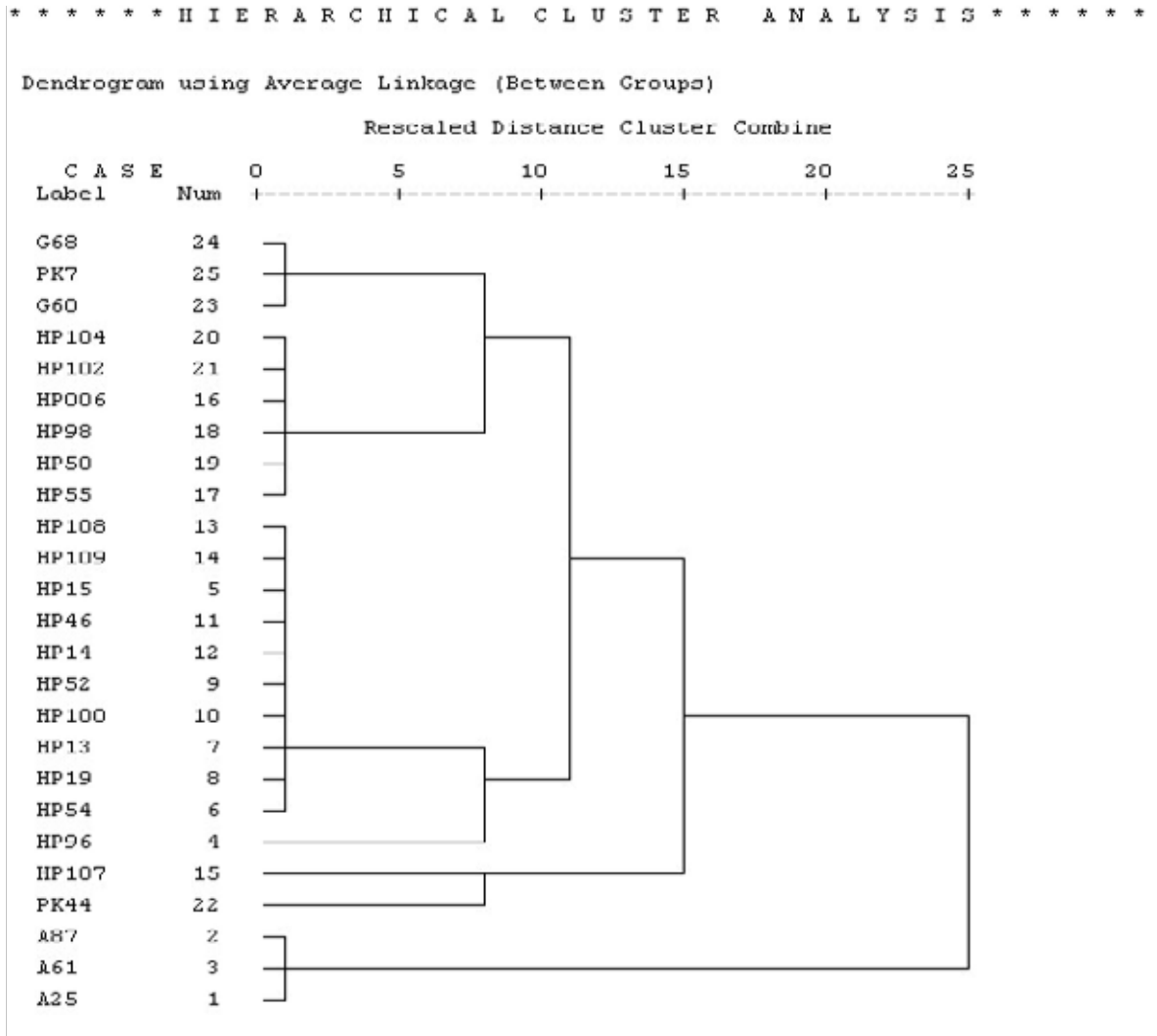


FIGURA 1: Dendrograma de cluster jerarquico para análisis de antibiograma

TABLA 5

Antibiotipos encontrados ordenados por grado de resistencia-susceptibilidad

<i>Antibiotipo</i>	<i>Antibióticos</i>									<i>Nº de cepas</i>	<i>Cepas</i>
	<i>An</i>	<i>Cip</i>	<i>Nor</i>	<i>Em</i>	<i>E</i>	<i>C</i>	<i>G</i>	<i>T</i>	<i>F</i>		
1AB	R	R	R	R	R	I	S	S	S	3	A25, A61, A87
2AB	R	R	R	R	I	S	S	S	S	1	HP96
3AB	R	R	R	R	S	S	S	S	S	10	HP13, HP14, HP15, HP19, HP46, HP52, HP54, HP100, HP108, HP109.
4AB	R	R	R	I	I	S	S	S	S	1	HP107
5AB	R	R	R	I	S	S	S	S	S	6	HP006, HP50, HP55, HP98, HP102, HP104
6AB	R	R	R	S	I	S	S	S	S	1	PK44
7AB	R	R	R	S	S	S	S	S	S	3	G60, G68, PK7

Nota: los nombres de los antibiotipos son arbitrarios, R=resistente, I=intermedio, S=sensible

El antibiotipo 1AB uno está compuesto por cepas aisladas del río Valdivia (A25, A61, A87) y está determinado por la resistencia a enrofloxacino, eritromicina y la resistencia intermedia a cloramfenicol, siendo estas cepas resistentes a ciprofloxacino y norfloxacino.

En el antibiotipo 2AB se encuentra una cepa (HP96) con resistencia a ciprofloxacino, norfloxacino, enrofloxacino y resistencia intermedia a eritromicina, fue aislada de hígado de pollo.

El antibiotipo 3AB está compuesto por un total de 10 cepas (HP13, HP14, HP15, HP19, HP46, HP52, HP54, HP100, HP108, HP109.) resistentes a ciprofloxacino, norfloxacino y enrofloxacino. Las cepas de este grupo fueron aisladas de hígado de pollo.

El antibiotipo 4AB está compuesto por una cepa aislada de hígado de pollo (HP107) con resistencia a ciprofloxacino, norfloxacino e intermedia a enrofloxacino y eritromicina.

El antibiotipo 5AB está compuesto por 6 cepas (HP006, HP50, HP55, HP98, HP102, HP104), aisladas de hígado de pollo con resistencia a ciprofloxacino, norfloxacino e intermedia a enrofloxacino.

El antibiotipo 6AB está compuesto por 1 cepa (PK44) aislada de pelícano que presenta resistencia a ciprofloxacino, norfloxacino e intermedia a eritromicina.

El antibiotipo 7AB está compuesto por 3 cepas (G60, G68, PK7) aisladas de gallina y pelícano y que presentan resistencia a ciprofloxacino y norfloxacino.

4.2. Perfil de proteínas.

Se hizo una serie de geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes con la finalidad de establecer relaciones epidemiológicas entre las cepas estudiadas. En la figura 2, se muestra uno de estos geles. En él se observan los perfiles de proteínas de *C jejuni* (carriles **2 a 6**) y de las cepas control Li06 (**1**), O28 (**8**) y G001 (**7**). Con los datos obtenidos de estos geles se creó la tabla 6 en la que se presentan los pesos moleculares de las 6 bandas estudiadas y que mostraron variabilidad entre cepas.

Se observa, en cada carril entre 30 y 40 bandas muy unidas y en algunos casos montadas unas con otras. Se aprecia que la mayoría de estas bandas son bastante débiles. Alrededor de los 41 Kd (**E**) se encuentra una gran banda asociada a un polipéptido mayor, que según Giacoboni y col (1999), debiera presentarse entre los 40 y 46 kd. Esta banda está presente en todas las cepas del género estudiadas, incluida la cepa control Li06 (**1**) y la cepa G001 (*C. coli*, **7**). La cepa control negativo *E. coli* (O28, **8**) no presentó esta banda. El polipéptido marcado como A se encuentra en todas las cepas y su peso molecular estuvo entre los 25 y 26 kd. Las bandas marcadas de A a I se encuentran en todas las cepas de *C. jejuni* analizadas, con la excepción de HP46 y HP19. Las zonas comprendidas entre F y G (41–50 Kd); H e I y hasta el límite superior del gel fueron constantes en todas las cepas. La zona entre A y F (25-41 Kd incluyendo el polipéptido mayor) y en los alrededores de G (en el que existe un par de bandas que presenta distancias disímiles entre ellas), presenta variabilidad entre las distintas cepas, existiendo rasgos distintivos que permitirían diferenciar grupos entre ellas.

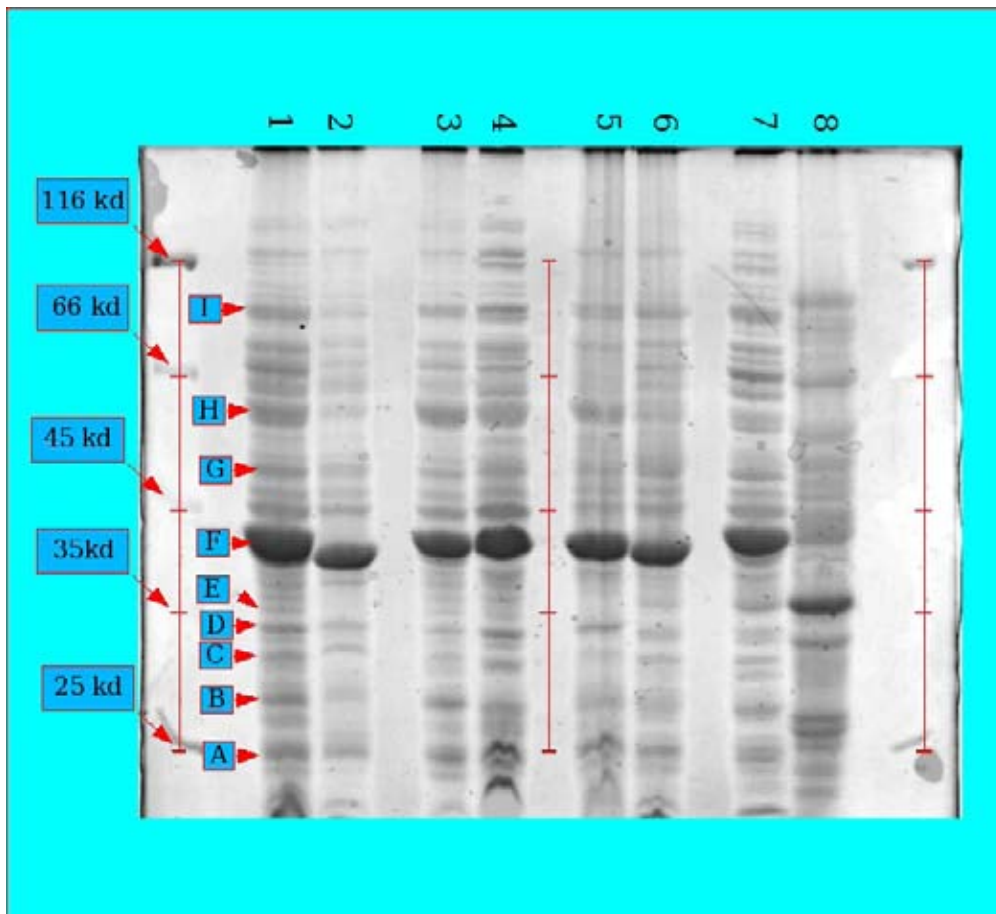


Figura 2: PAGE SDS de cepas de *C. jejuni* resistentes y no resistentes a ácido nalidíxico, *C. coli*, *E. coli*. Carril 1 Li06, 2 HP104, 3 HP54, 4 PK44, 5 G68, 6 A61, 7 G001 (*C. coli*), 8 Eco028 (*E. coli*). peso molecular aproximado para algunas bandas **A** 25 Kd, **B** 28 Kd, **C** 31 Kd, **D** 34 Kd, **E** 35 kd, **F** 41 Kd, **G** 50 Kd, **H** 57 KD, **I** 89 Kd.

Tabla 6: Lista de pesos moleculares entre las 6 bandas variables de distintas cepas ácido nalidíxico resistentes

Cepa	Pesos moleculares (kd)					
A25	59,2	56,6	34,8	33,3	31,7	39,8
A61	60,3	57,6	35,7	33,4	32,0	39,8
A87	59,4	56,1	35,3	33,3	31,9	39,8
G60	59,7	57,6	35,3	33,2	31,4	40,5
G68	59,5	57,4	35,5	34,0	32,3	40,6
HP006	58,3	55,2	35,0	33,8	32,4	40,5
HP100	60,6	57,3	35,4	33,3	32,1	42,0
HP102	59,9	56,9	36,3	34,8	33,8	41,7
HP104	60,2	57,1	36,6	34,2	32,5	40,4
HP107	59,7	56,9	35,6	34,2	32,5	41,6
HP108	59,4	57,0	34,9	33,4	31,8	40,7
HP109	59,6	56,9	36,2	34,9	33,9	41,6
HP13	59,1	55,7	34,9	33,4	31,9	41,4
HP14	61,0	57,8	35,9	34,3	33,1	41,6
HP15	60,8	57,0	35,9	34,4	33,2	42,3
HP19	59,8	56,5	36,6	35,2	-	42,1
HP46	61,1	57,6	35,9	34,2	-	41,7
HP50	58,3	56,1	35,2	33,8	32,2	40,9
HP52	59,11	56,1	35,1	34,17	33,04	41,43
HP54	60,89	58,37	36,33	34,96	33,29	41,57
HP55	60,02	57,33	36,58	35,2	33,82	41,87
HP96	60,03	56,23	35,83	34,34	33,21	41,6
HP98	61,64	58,43	35,73	34,52	33,16	41,56
PK44	59,5	57,11	35,51	34,06	32,64	41,94
PK7	58,49	56,22	35,08	33,67	31,93	40,47

El análisis se basó en 6 bandas presentes en estas zonas, encontrándose variabilidad entre cepas. A partir del análisis de los perfiles proteicos se construyó la tabla 6 que contiene la lista de pesos moleculares por cepa.

Con los datos expuestos en la tabla 6 se hizo el análisis jerárquico obteniéndose los resultados mostrados en la Figura 3. En esta se observa el árbol de distancias, entre las 25 cepas ácido nalidíxico resistentes estudiadas, para las 6 bandas consideradas relevantes. La discriminación por grupo se hizo considerando la máxima distancia entre duplicados y vía la utilización de los controles (datos no mostrados). Las líneas rojas corresponden a lo que se postula como distancia de corte por agrupación, por lo que todo par de cepas que se encuentre a una distancia inferior a la mostrada van a ser consideradas cepas iguales.

De los resultados del análisis jerárquico y su forma gráfica el dendograma, se postula la existencia de cuatro grupos, dos de los cuales están compuestos por cepas individuales y se los nombra como grupos 1prot (HP46) y 2prot (HP19). Los otros dos grupos 3prot y 4prot están compuestos por 10 y 13 cepas respectivamente. Las cepas que forman cada grupo se detallan en la tabla 7.

Dendrogram

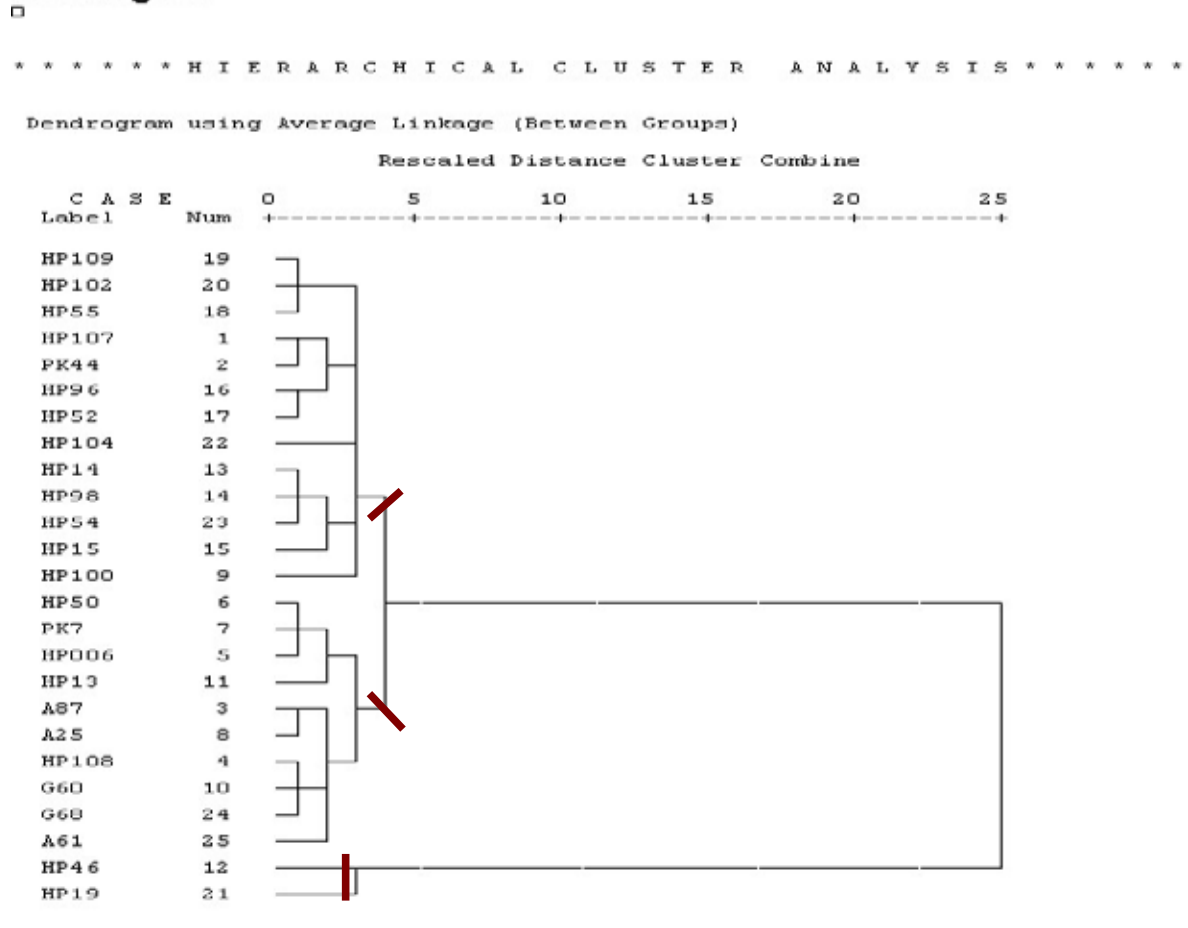


FIGURA 3: Dendrograma de cluster jerárquico para análisis de perfil de proteínas

TABLA 7

Agrupación de las cepas ácido nalidíxico resistentes según sus perfiles proteicos.

Grupo según perfil proteico	Cepas												
1prot	HP46												
2prot	HP19												
3prot	A61	A87	A25	HP108	HP50	HP13	HP006	PK7	G68	G60			
4prot	HP96	HP107	PK44	HP14	HP100	HP54	HP52	HP15	HP109	HP102	HP55	HP98	HP104

4.3. Perfil de restricción genómico.

El perfil de restricción genómico con PFGE es un método ampliamente usado para el diagnóstico epidemiológico de cepas de *Campylobacter*. Los DNAs extraídos de las cepas incluidas en este estudio fueron cortados con la enzima Sma1 y corridos por PFGE. En la figura 4 se muestra uno de estos geles, en el se observa una serie de patrones de bandas, incluido el de la cepa control G001 (2).

La figura 4 muestra la existencia de varios tipos bien definidos de perfiles de restricción en las cepas de *C. jejuni*. A simple vista, se puede notar la semejanza entre los carriles 1, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 13; entre los carriles 5 y 8 y un tercer perfil, que es el del carril 11. Utilizando la información digitalizada de los geles se procedió al cálculo de C_r para cada banda por carril, generándose los datos expuestos en la tabla 8.

De la figura 5 se desprende la presencia de, a lo menos tres agrupaciones, todas con gran similitud grupal (corta distancia intra-grupo) y grandes diferencias (distancias) entre grupos, por lo que pueden considerarse las diferencias presentes en cada agrupación como despreciable.

Las cepas 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 21, 22, 24 y 25 muestran una marcada similitud, todas las cepas en este grupo, que denominaremos 1PFGE presentan un total de 9 bandas distribuidas a lo largo del gel principalmente en las zonas media a media baja. Todas las cepas de este grupo fueron aisladas desde hígado de pollo.

Con los datos de la tabla 8 se hizo un cluster jerárquico según el protocolo expuesto en análisis de datos de material y método, el que entregó como resultado la figura 5

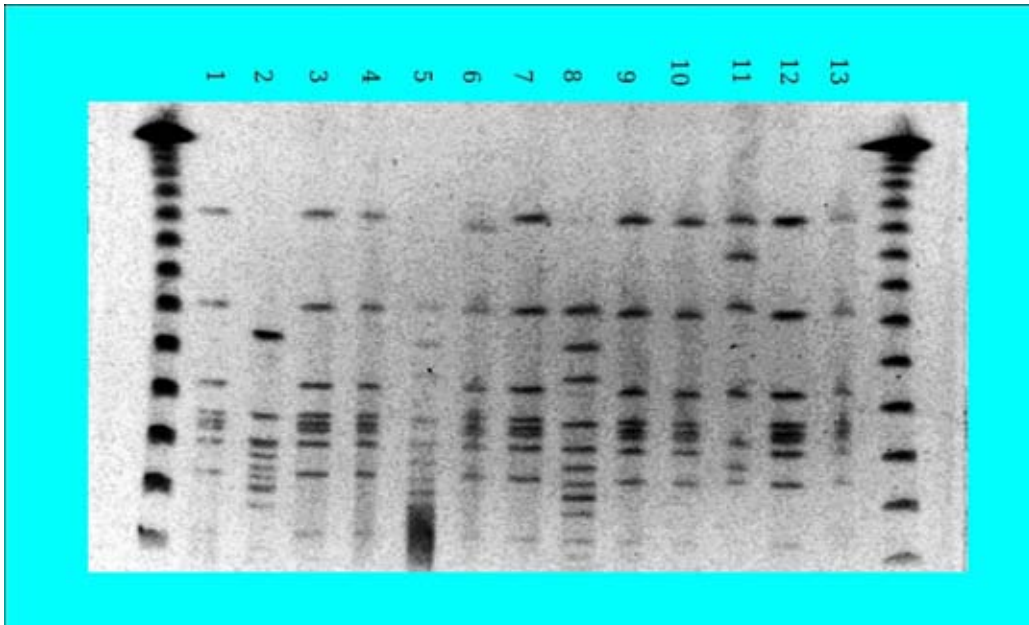


FIGURA 4: Perfil de restricción de cepas de *C jejuni*, *C coli* El DNA fue cortado con la enzima **Sma**1, en el carril 1 se encuentra la cepa HP13 en el 2 G001 (*C. coli*), 3 HP100, 4 HP52, 5 A87, 6 HP55, 7 HP50, 8 HP108, 9 HP14, 10 HP104, 11 PK44, 12 HP96, 13 HP006.

TABLA 8

Coefficiente Cf por banda y por cepa.

Cepas	Coefficiente Cf									
A25	0,51	0,59	0,65	0,74	0,79	0,83	0,86	0,89	0,92	0,97
A61	0,51	0,58	0,65	0,73	0,78	0,83	0,85	0,89	0,92	0,97
A87	0,52	0,6	0,66	0,75	0,8	0,84	0,87	0,9	0,93	0,98
G60	0,31	0,38	0,48	0,65	0,74	0,79	0,83	-	-	-
G68	0,31	0,38	0,48	0,65	0,74	0,79	0,83	-	-	-
HP006	0,33	0,52	0,68	0,73	0,75	0,76	0,79	0,85	0,98	-
HP100	0,34	0,53	0,68	0,74	0,76	0,78	0,8	0,87	0,99	-
HP102	0,33	0,52	0,68	0,73	0,75	0,76	0,79	0,85	0,97	-
HP104	0,34	0,53	0,69	0,74	0,76	0,77	0,8	0,87	0,98	-
HP107	0,34	0,52	0,68	0,73	0,75	0,77	0,79	0,85	0,97	-
HP108	0,52	0,60	0,66	0,75	0,80	0,84	0,87	0,90	0,93	0,98
HP109	0,33	0,52	0,67	0,74	0,74	0,76	0,79	0,85	0,97	-
HP13	0,33	0,53	0,68	0,74	0,76	0,78	0,8	0,86	0,98	-
HP14	0,34	0,53	0,68	0,75	0,76	0,78	0,8	0,86	0,98	-
HP15	0,31	0,49	0,64	0,7	0,72	0,73	0,76	0,82	0,94	-
HP19	0,34	0,52	0,67	0,73	0,75	0,76	0,79	0,85	0,97	-
HP46	0,34	0,53	0,68	0,74	0,75	0,77	0,79	0,85	0,98	-
HP50	0,34	0,53	0,68	0,75	0,76	0,77	0,8	0,86	0,98	-
Hp52	0,34	0,53	0,68	0,74	0,76	0,77	0,8	0,86	0,98	-
HP54	0,34	0,51	0,67	0,73	0,74	0,76	0,78	0,85	0,97	-
HP55	0,36	0,53	0,68	0,74	0,76	0,77	0,8	0,86	0,98	-
HP96	0,34	0,53	0,69	0,74	0,76	0,77	0,8	0,86	0,98	-
HP98	0,35	0,52	0,67	0,73	0,75	0,77	0,79	0,85	0,98	-
PK44	0,34	0,41	0,51	0,68	0,78	0,83	0,85	-	-	-
PK7	0,31	0,38	0,48	0,65	0,74	0,79	0,82	-	-	-

Dendrogram

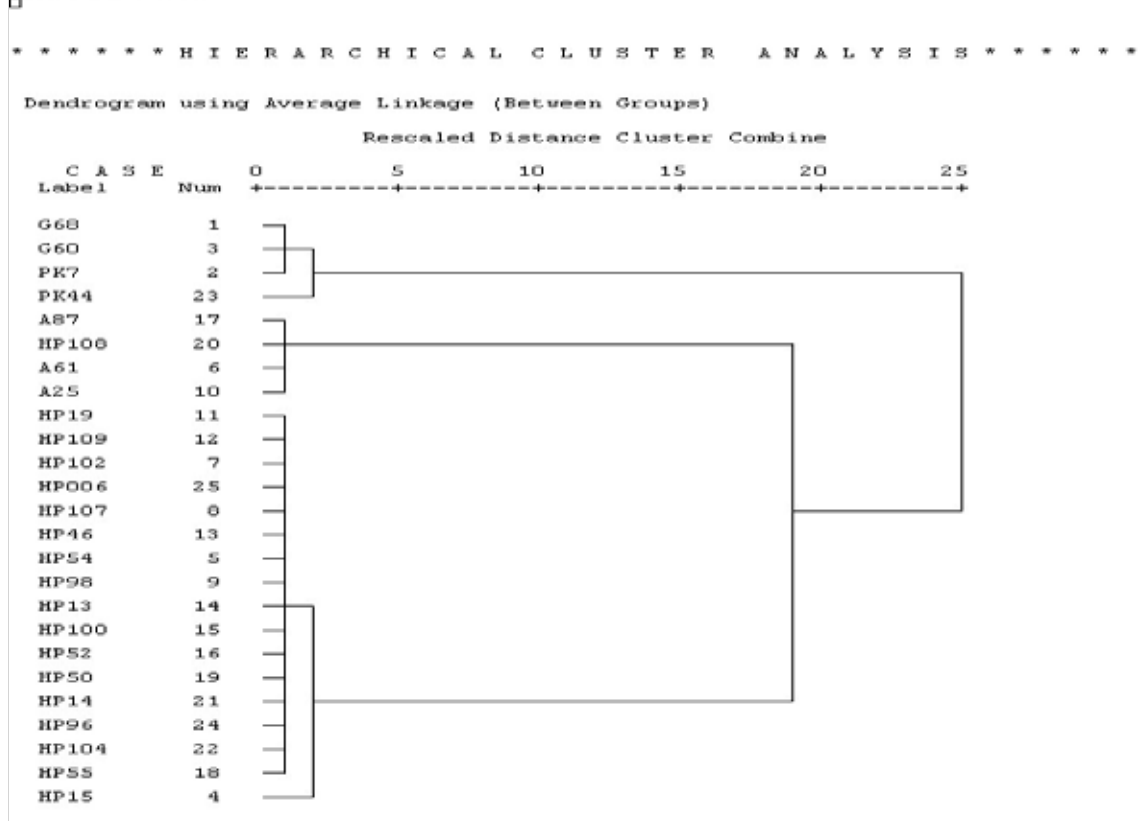


FIGURA 5: Dendrograma de cluster jerárquico para análisis de mapa de restricción

Las cepas 1, 2, 3 y 23 corresponden a las cepas aisladas de pelícano y gallina, muestran 7 bandas distribuidas en la zona media y media alta del gel. Este grupo fué denominado grupo 2PFGE.

Las cepas con los números 6, 10, 17 y 20 forman un grupo en el que se encuentran cepas principalmente del río Valdivia (con la excepción de HP108). Las bandas se distribuyen en la zona media y media baja del gel. Todo este grupo presenta 12 bandas (se utilizaron 10 para el análisis) con la excepción de la cepa A87. Este grupo de cepas fue denominado 3PFGE.

En la tabla 9 se observa el resumen de las agrupaciones generadas por el “clustering” asociado al mapa de restricción.

TABLA 9

Agrupación de las cepas ácido nalidíxico resistentes según sus perfiles de restricción.

Grupo según PFGE		
1PFGE	2PFGE	3PFGE
HP108	HP96	G60
A61	HP107	G68
A25	HP14	PK44
A87	HP100	PK7
Cepas	HP54	
	HP52	
	HP19	
	HP15	
	HP46	
	HP13	
	HP109	
	HP102	
	HP55	
	HP98	
	HP50	
	HP006	
	HP104	

5. DISCUSIÓN

Con el objeto de establecer relaciones epidemiológicas entre las cepas de *C. jejuni* estudiadas y resistentes a fluoroquinolonas aisladas de distintos orígenes, fueron aplicadas una serie de técnicas de laboratorio ya explicadas anteriormente.

Los resultados obtenidos muestran la existencia de grupos de cepas relacionadas epidemiológicamente entre sí. En dos de las tres metodologías utilizadas fue posible obtener resultados similares. Al comparar los resultados obtenidos por el método de análisis de restricción genómico con el antibiograma (figura 6), se aprecia que la agrupación de las cepas por antibiotipos presenta alta correspondencia con las agrupaciones propuestas por el análisis de restricción genómico, exceptuando a la cepa HP108. En ambos métodos, las cepas aisladas desde agua, A61, A87, A25 están agrupadas juntas en 1AB y en 3PFGE. Las cepas PK y G que están juntas en el perfil de restricción genómico. En el antibiograma se encuentran en dos grupos, uno conformado por G60, G68, PK7 ó grupo 7AB y otro por PK44 ó grupo 6AB. Las cepas HP, en el caso del perfil de restricción genético se encuentran distribuidas en dos grupos (HP108 en 3PFGE y todas las otras en 1PFGE). En el antibiograma, las cepas HP se encuentran distribuidas en 4 grupos (2AB, 3AB, 4AB, 5AB). La mayor diferencia al comparar los resultados de estos métodos está en la cepa HP108 que en el antibiograma se presenta en uno de los grupos de HP (3AB) y en PFGE está en el grupo de las A (3PFGE).

En nuestro trabajo se encontró que ambos métodos difieren en su capacidad resolutive, siendo de interés el hallazgo de un mayor número de agrupaciones

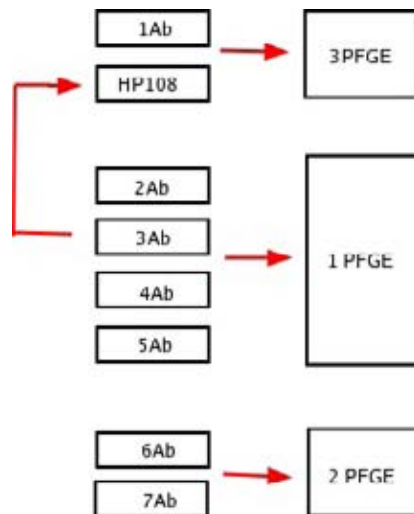


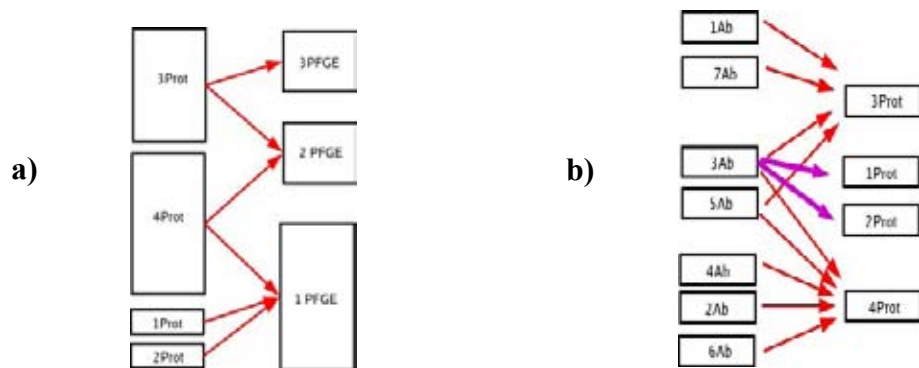
FIGURA 6: Esquema de comparación entre las agrupaciones propuestas para el perfil de restricción genómico y el antibiograma

obtenidas a partir del antibiograma.

Por otra parte, el hecho de que PFGE no pudiera discriminar entre cepas del mismo origen, muestra claramente las limitaciones de la metodología tal como está planteada y la necesidad de asociarla con otros métodos, tanto o más resolutivos, con la finalidad de aumentar la fiabilidad de los resultados o, en su defecto, hacer perfiles de restricción genómicos utilizando un número mayor de enzimas de restricción. Dado que el perfil de restricción genómico utilizando la enzima Sma1 ha presentado buenos resultados, algunos investigadores como Duim y col. (2003), Pedersen y col. (2003) y Fernández-Astorga y col (2003) han optado por asociarlo con otro tipo de técnicas utilizando PFGE con Sma1 como referencia sin aumentar el número de enzimas de restricción.

El mismo tipo de comparación entre las agrupaciones obtenidas a partir de los perfiles proteicos y los dos métodos anteriores, no muestra tanta similitud (figura 7).

Las aparentes discrepancias entre nuestros resultados pueden ser explicadas por la baja resolución del método, ya antes discutida por Giacoboni y col (1999) y On (1996), una inadecuada elección de las bandas a estudiar, una incorrecta elección de la metodología para abordar los resultados o el estar comparando los resultados de técnicas distintas (y que son perfectibles). No obstante, se encontró dos cepas que presentaban la ausencia de una de las bandas estudiadas, hecho descrito con anterioridad por Giacoboni y col (1999) para cepas de *C. jejuni* utilizando esta misma metodología y podría explicarse por una delección que quite el sentido al gen que codifica para la proteína desaparecida o por la aparición de una señal de término prematura. Este hecho (desaparición de bandas) permitió discriminar a estas dos



*FIGURA 7: Esquema de comparación entre el **a)** perfil de proteínas y el perfil de restricción genómico. **b)** antibiograma y el perfil de proteínas.*

cepas, siendo agrupadas de forma separada (1Prot y 2Prot) debido a que desde el punto de vista estadístico la desaparición de estas bandas implica necesariamente definir la posición de estas bandas como “0” (el método utilizado no puede definir ausencia) existiendo de esta manera una inmensa distancia entre la posición de la banda ausente hasta sus equivalentes en las otras cepas.

En los perfiles proteicos de *C. jejuni*, al igual que en otras especies, la dificultad del método surge al momento de analizar los datos (On 1996). La presencia de más de 30 bandas por carril con muy poca diferencia entre cepas, hace muy difícil el análisis de datos. En este caso, fue necesario segregar un grupo de bandas que parecían presentar una alta variabilidad entre cepas (On 1996, Owen 1988), surgiendo entonces el problema de la correcta elección de las bandas, problema que tiene una solución únicamente experimental y para el cual no han sido propuestos protocolos. Sin embargo Duim y col. (2004) obtuvieron muy buenos resultados utilizando esta misma metodología, en un rango similar de pesos moleculares de bandas en *C. lari*.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de los perfiles proteicos sugieren 4 agrupaciones de cepas bastante heterogéneas respecto a su origen. Sin embargo, se observan grupos de cepas cuyos integrantes muestran tendencia a permanecer agrupadas con unas cepas y no con otras, al comparar distintas metodologías, por lo que las podríamos denominar o considerar como agrupaciones de cepas conservadas. Es el caso de los grupos 2PFGE, 3PROT y 7AB, que tienen en común a las cepas PK7, G60 y G68 y de los grupos 3PFGE, 3PROT y 1AB entre cuyos miembros se encuentran las cepas A25, A61 y A87. Las excepciones son las cepas HP50, HP13, HP006 y de las cuales no existe homología grupal en alguna de las otras metodologías.

Podemos concluir que es posible discriminar entre las cepas resistentes a quinolonas, aisladas de distintos orígenes. De los tres métodos el que mejor distinguió por origen fue PFGE (no pudo distinguir las PK de las G y la Hp108 que está agrupada con las A). El antibiograma agrupa de manera bastante similar pero, según los resultados, discriminaría más grupos que PFGE. Eso incluye diferenciar entre cepas del mismo origen como por ejemplo las cepas HP en cuatro grupos y las PK en dos mientras que las cepas A61, A25 y A87 se encuentran en un grupo por separado (de HP108) a diferencia de 3PFGE.

Los resultados del análisis de restricción genómico y del antibiograma muestran una serie de agrupaciones bastante homogéneas respecto a su origen (tabla 5, tabla 9), lo que nos permite sugerir la existencia de, a lo menos, 3 grupos relacionados epidemiológicamente entre las cepas estudiadas.

Los grupos 2AB, 3AB, 4AB y 5AB están formados íntegramente por cepas aisladas desde hígado de pollo, exceptuando la HP108. Estas cepas muestran una gran similitud genética (grupo 1PFGE en tabla 9 y figura 5). Las cepas HP96 (2AB) y HP107 (4AB) agrupadas de forma individual por sus antibiogramas difieren entre ellas únicamente en su grado de resistencia a enrofloxacino (al igual que la mayoría de las cepas HP, que se encuentran en grupos distintos por esta razón). Sin embargo, éstas difieren del resto de las cepas de este origen por presentar resistencia intermedia a eritromicina. Basados en estos resultados, se sugiere, que las cepas aisladas de hígado de pollo, con la excepción de HP108, provienen de la expansión clonal de un precursor único. Las diferencias en su antibiograma podrían explicarse por mutaciones puntuales (o acumulación de mutaciones) que significaran una ventaja ante la presión

selectiva ejercida por el uso de eritromicina, quinolonas y fluoroquinolonas en las plantas avícolas (todas las cepas estudiadas resistentes a ácido nalidíxico lo son también a ciprofloxacino y norfloxacino), sumado a la posibilidad de que estas cepas evolucionaran en relativo aislamiento por largos períodos de tiempo. Se puede sugerir, además, la existencia de múltiples eventos de mutación (o de adquisición de resistencia), lo que explicaría el diferente tipo de resistencia a enrofloxacin adquirida por estas cepas (tabla 5).

Los grupos 6AB y 7AB (2PFGE), están formados por cepas aisladas desde pelícano y gallina. Ambos grupos poseen una gran similitud genética y difieren sólo en la resistencia intermedia a eritromicina de 6AB (PK44), esto es avalado por una similar agrupación en los perfiles proteicos. Esto sugiere que las fuentes de adquisición del microorganismo por parte de ambas especies de aves pudieran ser las mismas y la hoya hidrográfica pudiera ser la fuente de diseminación. Se puede especular que la adquisición de la resistencia antibiótica pudiera estar influenciada por el uso de antibióticos en la industria salmonera río arriba o que puntos en común en sus cadenas alimentarias sean la fuente de bacterias resistentes.

El grupo 1AB está compuesto por cepas aisladas del río Valdivia (antes de la puesta en marcha de la planta de tratamiento y en distintas fechas), estas cepas permanecen agrupadas juntas en todos los métodos demostrando de esta forma su alta similitud. Las cepas "A" de este grupo poseen similitud en sus perfiles de restricción genómicos con la cepa HP108 proveniente de hígado de pollo (las cepas "A" y HP108 pertenecen al grupo 3PFGE). Este hallazgo indica que este grupo de cepas se encuentra relacionado epidemiológicamente y, probablemente, tengan un precursor

único. Sin embargo, la cepa HP108, a diferencia de las cepas del grupo 1AB, no es resistente a eritromicina ni intermedia a cloramfenicol (tabla 5), sino que posee el mismo tipo de resistencia que la mayoría de las cepas HP, esto es, resistencia a ácido nalidixico y a las 3 fluoroquinolonas que formaron parte del estudio. Esto refuerza la teoría de múltiples eventos de adquisición de resistencia y por otra parte sugiere la posibilidad de fuentes comunes de adquisición del microorganismo entre las plantas avícolas y el río Valdivia o de transmisión de uno a otro lugar de aislamiento, a través, de cadenas epidemiológicas desconocidas.

Existe similitud entre los resultados obtenidos por los tres métodos. Esto es especialmente notorio a la hora de hacer un análisis comparativo de resultados obtenidos por las distintas técnicas. Se observa una alta conservación de las agrupaciones existentes, lo que permite sugerir relaciones epidemiológicas entre las cepas.

Como se esperaba, se encontró en estos métodos un diferente grado de resolución a las relaciones epidemiológicas existentes. Conocido ésto, se le puede dar mayor o menor peso a los resultados obtenidos por cada uno de estos métodos respecto a la veracidad de las relaciones epidemiológicas que informa. Los resultados inesperados obtenidos por el antibiograma, desde el punto de vista resolutivo, muestran la necesidad de mejorar los métodos moleculares. A pesar de ser un método estandarizado para el uso que se le dio en este estudio, -aunque no se pretende que sea una técnica control- el método de campo pulsado puede y debe ser mejorado para satisfacer las necesidades que en esta investigación se plantea y el paso lógico sería trabajar con más enzimas de restricción. En el caso de los perfiles proteicos, se obtuvo

resultados satisfactorios a partir de la asociación de un método poco resolutivo (para las necesidades de este estudio) como la SDS-PAGE con métodos de análisis matemático. Por el momento no podemos dar demasiada fiabilidad al método, aunque este tendría buenas proyecciones, de mejorarse los problemas inherentes a la metodología.

El antibiograma es una técnica económica, fácil de estandarizar y conocida hace más de 60 años. Es por eso que no deja de sorprender el grado de resolución que logró con estas cepas y el hecho de que ninguno de los métodos moleculares pudo discriminar de esta forma. Sin embargo, la gran debilidad de esta metodología es la necesidad de encontrar resistencia antibiótica en las cepas para poder discriminar. Es posible evadir las falencias inherentes a esta técnica utilizando concentración mínima inhibitoria (MIC), método que presenta muchas de las ventajas del antibiograma y sin su desventaja principal, el necesitar de cepas resistentes para funcionar.

En resumen, nuestros resultados muestran la existencia de tres grupos de cepas relacionados epidemiológicamente entre sí, siguiendo un patrón por origen, con excepciones (HP108). A través de la información obtenida en este estudio y de su extensión a un número mayor de cepas aisladas de humanos y de otros animales se podría, en el futuro, tener un conocimiento más acabado de la cadena epidemiológica para bacterias de este género que, en nuestra zona geográfica se encuentran ampliamente distribuidos (Fernández, 1994), lo que permitiría predecir las posibles fuentes de contagio de este microorganismo.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Acuña, Ana María . Enfermedades transmitidas por alimentos en Uruguay. Montevideo. Cap. 7 Campylobacter 69-77 OPS 2002.
2. Carret, G. y col. Comité de L'antibiogramme de la Societé Francaise de Microbiologie 2000-2001. The French Society for Microbiology (<http://www.sfrn.asso.fr/>), Junio 2001.
3. Chuma, T., Niwa, H., Maeda, T. y Okamoto, K. Acquisition of quinolone resistance and point mutation of gyr A gene in Campylobacter jejuni isolated from Broiler and in vitro.induced resistant strains. J. Vet Med Sci. Feb;66(2):155-60 2004.
4. Duim B., Godschalk P., van den Braak N., Dingle K., Dijkstra J., Leyde E., van der Plas J., Colles F., Endtz H., Wagenaar J., Maiden M., van Belkum A. Molecular Evidence for Dissemination of Unique Campylobacter jejuni Clones in Curaçao, Netherlands Antilles. J. Clin. microbiol. Dec; 41(12): 5593-5597 2003.
5. Duim B, Wagenaar J., Dijkstra J., Goris J, Endtz H., Vandamme P. Identification of Distinct Campylobacter lari Genogroups by Amplified Fragment Length Polymorphism and Protein Electrophoretic Profiles. Appl. Env. microbiol. Jan; 70(1): 18-24 2004.
6. Endtz, H.P., G.J. Ruijs, B. Van Klingerén, W.H. Jansen, T. Van Der Ryden y R.P. Mouton. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *J. Antimicrob. Chemother.* 27: 199-208, 1991.
7. Engberg J., Aarestrup F., Taylor D., Gerner-Smidt P., Nachamkin I. Quinolone and

- macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanism and trends in human isolates. *Emerg. Infect. Dis.* Jan-Feb;7(1):24-34 2001.
8. Fernández, H. Thermotolerant *Campylobacter* species associated with human diarrhea in Latin America. *Braz. J. Adv. Sci.* 44:39-43, 1992.
 9. Fernandez, H., Kahler K., Salazar R., Rios M. A... 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* 36: 433-436, 1994.
 10. Fernández, H. Farance, M I. Manual de procedimientos. Diagnostico de *Campylobacter* en muestras clinicas y de alimentos. Ed. OMS 2003
 11. Fernández-Astorga A., Llovo J., Mateo E., Muñoz A., Urquijo M., On SL., Molecular Typing of *Campylobacter jejuni* Isolates Involved in a Neonatal Outbreak Indicates Nosocomial Transmission. *J. Clin. Microbiol.* 41(8): 3926-3928, 2003.
 12. Giacoboni, G.; Puchuri, M.C, Castellano, C., Echeverria, G., Fernandez, H. Identificación mediante biotipos y perfiles proteicos de *Campylobacter* aislados de perros. *Arch. med. Vet.* 31:231-235, 1999
 13. Giacoboni G., R. Cerdá, C. López Emergencia a la resistencia antibiótica en cepas de *campylobacter jejuni* aisladas de carne de pollo. *Analect Vet.* 21.1:63-67 2001.
 14. Giacoboni, G., Echeverría, MG., Perfumo, CJ. *Campylobacter jejuni* y *C. coli* en suinos abortados: comparación entre la identificación fenotípica y los perfiles proteicos en geles de poliacrilamida. *Rev. Arg. Microbiol.* 34:199-204, 2002.
 15. Jacobs-Reitsma, W.F., Kan, C.A., Bolder, N.M. The induction of quinolone resistance in *Campylobacter* bacteria in broilers by quinolone treatment. *Lett. Appl. Microbiol.* 19:228-231, 1994.

16. Moller Nielsen E, Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping campylobacter jejuni isolated from humans, poultry and cattle. *J. Clin. Microbiol.* 38:3800-3810, 2000.
17. NCBI Taxonomy Browser. Campylobacter
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=194>
18. On S. L. Identification methods for campylobacters, helicobacters, and related organisms. *Clin Microbiol Rev.* July; 9(3): 405–422, 1996.
19. Owen R. J., Costas M., Sloss L., Bolton F. J., Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of *Campylobacter laridis* and allied thermophilic campylobacters from the natural environment. *J Appl. Bact.* 65:69-78, 1988.
20. Pedersen K, Wedderkopp A. Resistance to quinolones in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Danish broilers at farm level. *J Appl Microbiol.*;94(1):111-119 2003.
21. Piddock, L.J.V. Quinolone resistance and *Campylobacter*. *Clin. Microbiol. Infect.* 5:239-243, 1999.
22. Reina, J., N. Borrel y A. Serra. Emergence of resistance to erythromycin and fluoroquinolones in thermotolerant *Campylobacter* strains isolated from feces 1987-1991. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11: 1163-1166, 1992.
23. Ribot, E. M., Fitzgerald C., Kubota K., Swaminathan B., Barrett T. J. Rapid Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for Subtyping of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol.*; 39(5): 1889-1894 2001.
24. Scarcelli E., Costa, E. O., Genovez, M. E., Cardoso, M. V., Bach, E. E., Torres, A. P. Comparison of electrophoretic protein profiles of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*

- isolated from different animal species. *Brazilian J. Microbiol.* São Paulo: , v.32, n.4, p.286 - 292, 2001.
25. Steinbrueckner, B., Ruberg, F., Kist, M., Bacterial genetic fingerprint: a reliable factor in the study of the epidemiology of human campylobacter enteritis?. *J Clin Microbiol.* 39(11):4155-9, 2001
26. Universidad de Cadiz. Area de informática. Guia para el análisis de datos con spss
27. Urrestarazu MI, Liprandi F, Pérez De Zuárez E. Características etiológicas, clínicas y sociodemográficas de la diarrea aguda en Venezuela. *Rev. Panam. Salud Publica.* 6(3):149-156, 1999.
28. Wretlind, B., A. Strömberg, L. Östlund, E. Sjörgen y B. Kaijser. Rapid emergence of quinolone resistance in *Campylobacter jejuni* in patients treated with norfloxacin. *Scand. J. Infect. Dis.* 24: 685-686, 1992.