

“Diagnóstico Microbiológico de infección
gastrointestinal por *Campylobacter* spp.”

Especialistas invitados

Celeste Lucero

clucero@anlis.gov.ar

Marisa Turco

marisaturco@hotmail.com

Campylobacteriosis

- Es una zoonosis
- Es una de las principales causas de gastroenteritis en el mundo entero
- Principales reservorios: animales de granja, que se infectan en los primeros años de vida y la mayoría de ellos permanecen como portadores.
- Principales vías de infección:
 - ingestión de carnes mal cocidas (principalmente aves de corral, pero también cerdo, ganado bovino, etc.),
 - leche no pasteurizada
 - agua u otros alimentos contaminados con excretas de animales infectados
 - contacto con mascotas.

Especies de interés clínico

- Si bien varias especies de *Campylobacter* spp. fueron aisladas de muestras clínicas son pocas las reconocidas con rol patógeno

Especies Termófilas:

- *Campylobacter jejuni* } principales
- *Campylobacter coli* } enteropatógenos
- *Campylobacter lari* }
- *Campylobacter upsaliensis* } aisladas fundamentalmente de muestras intestinales

Especies No Termófilas:

- *Campylobacter fetus* aislada fundamentalmente de muestras de sangre

¿Cuál es la muestra adecuada para el cultivo?

Materia fecal en frasco estéril o medio de transporte adecuado

¿Cómo se conservan las muestras?



En medio de transporte las muestras pueden ser conservadas hasta 24 hs. a 4° C.

¿Cuál es el medio de transporte adecuado?

- ★ Cary-Blair (tener en cuenta que la concentración de agar-agar debe reducirse en un 0.12%)
- ★ AMIES con carbón

¿Cuál es la microscopía recomendada?

Coloración de GRAM



se recomienda el uso de carbolfucsina al 0,8 % como contraste



elementos gram-negativos mayoritariamente en forma de S y alas de gaviota

Exámen en fresco



bacilos con movilidad característica: movimiento en tirabuzón

¿Qué medio de cultivo debe utilizarse para el cultivo?

- Cualquier medio agar base rico en aminoácidos, suplementado con sangre (ovina, equina o humana) al 5%, y una mezcla antibiótica para inhibir la flora acompañante.

MEDIOS DE CULTIVO (fórmula por litro)

	Medio de SKIRROW	Medio de SKIRROW modificado	Medio de BUTZLER	Medio de CAMPY-BAP (Blaser)	Medio de CDC
B a s e	Agar Brucella	Agar Brucella Supl. FBP: Piruvato de Na 0.5 g Metabisulfito de Na 0.5 g Sulfato ferroso 0.5 g	Caldo Tioglicolato 30 gr Agar agar 12 gr	Agar Brucella	Caldo nutrit. N° 2 2,5 g Caseina hidrolizada 3 g Desoxicolato de Na 1 g Sulfato ferroso 0,25 g Piruvato de Na 0,25 g Agar 12 g
A T B	VAN 10 mg TMS 5 mg POL B 2500 UI*	VAN 10 mg TMS 5 mg POL B 2500 UI * CTN 10 mg**	NOVO 5mg COL 10000 U.I* CICLOH 50 mg CEF 15 mg** BACI 25000 U.I.	VAN 10 mg TMP 5 mg POLB 2500 UI* ANFO 2 mg CEF 15 mg**	CPZ 0,032 g ANFO B 0,01 g
	Sangre: 50ml	Sangre: 50ml	Sangre: 50ml	Sangre: 50ml	CARBON 4g

*POL B y COL pueden inhibir algunas cepas de *C. jejuni* y *C.coli*

** CTN inhibe el desarrollo de ciertas especies: *C. fetus*, *C. jejuni sbsp. doylei* y *C. Upsaliensis*

VAN (vancomicina), TMS (Trimetoprima-sulfametoxazol), POL B (Polimixina B), CTN (Cefalotina), NOVO (Novobiocina), CEF (Cefepima), BACI (Bacitracina), ANFO (Anfotericina), CPZ (Cefoperazona), CICLOH (Cicloheximida)

¿Qué atmósfera, temperatura y tiempo de incubación deben utilizarse para el cultivo?

Atmósfera

Atmósfera microaerófila: 85% N₂, 5-10% O₂, 3-10%CO₂

El medio de Skirrow modificado contiene suplemento FBP, que aumenta la tolerancia del campylobacter al oxígeno, por lo que puede incubarse en atmósfera enriquecida en CO₂ sin necesidad de microaerofilia

Temperatura y Tiempo de incubación

Por lo menos 3 días en microaerofilia.
La temperatura ideal es de 42°C.

¿Cómo se identifica un aislamiento sospechoso?

Colonias sospechosas de *Campylobacter* spp.:

- puntiformes, transparentes, como gotas de agua que crecen a 42°C en microaerofilia
- elementos gram-negativos en formas de S y alas de gaviota
- Catalasa, oxidasa y movilidad positivas.

Cumpliendo estos tres items podemos informar *Campylobacter* spp.

Hidrólisis de hipurato (diferencia *C. jejuni* de las otras especies)

Campylobacter spp.: tipificación

- Catalasa, test del hipurato, indoxil acetato
- Crecimiento a 32 y 42°C
- Reducción de nitratos
- Sensibilidad al Nalidíxico* y Cefalotina
- Producción de SH₂

*Tener en cuenta que hay cepas que adquieren resistencia (alrededor del 70% de R a ác. Nalidíxico y ciprofloxacina en cepas de *C. jejuni* en nuestro país), por lo que un resultado de resistenete no excluye *C. jejuni* o *C. coli*

Campylobacter spp.: pruebas bioquímicas

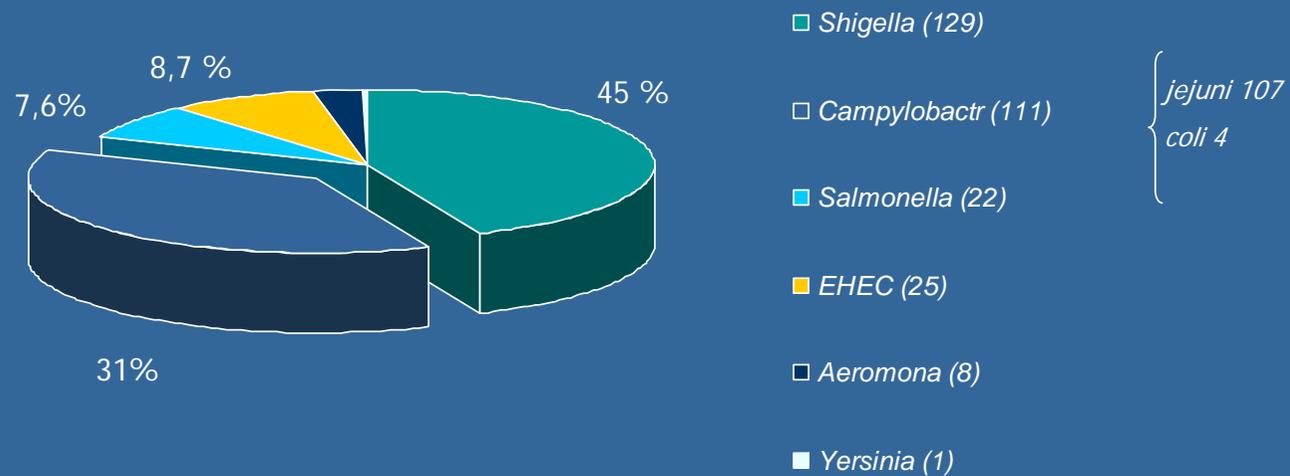
	<i>C. fetus fetus</i>	<i>C. jejuni jejuni</i>	<i>C. jejuni doylei</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Catalasa	+	+	+	+	+	D/-
Red. NO3	+	+	-	+	+	+
SH2	-	+/-	-	-	+	-
Hipurato	-	+	-	-	-	-
Indoxilacetato	-	+	+	+	-	+
Crec 25	+	-	-	-	-	-
Crec 37	+	+	+	+	+	+
Crec 42	-	+	-	+	+	V
S ac Nal	R	S*	S*	S*	R	R
S CTN	S	R	S	R	R	V

Aislamientos de enteropatógenos en el Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez"

Período enero-diciembre 2005

N coprocultivos: 916

N aislamientos: 287



Tratamiento antibiótico: ¿cuándo?

- Fiebre alta
- Más de 8 deposiciones diarias
- Diarreas que se prolongan por más de 7 días
- Inmunocomprometidos
- Extremos de la vida
- Evitar diseminación

Drogas de elección

Drogas de PRIMERA LÍNEA para el tratamiento de diarreas:
eritromicina y ciprofloxacina .

Drogas para el tratamiento de infecciones sistémicas: **amoxicilina/ac. clavulánico, imipenem , gentamicina.**

¿Cuáles son las metodologías que se utilizan para evaluar la sensibilidad antibiótica?

- **DILUCIÓN EN AGAR:** Metodología estandarizada por CLSI (ex NCCLS). Utilizada por laboratorios de referencia, no es práctica para la rutina de los laboratorios clínicos.
- **DIFUSIÓN POR DISCOS:** no normatizada por CLSI (ex NCCLS) pero sirve para screening
- **E-test:** es comparable a la técnica de dilución en agar para la mayoría de las drogas, excepto clindamicina y ac. nalidíxico

CONDICIONES PARA EVALUAR LA SENSIBILIDAD EN CAMPYLOBACTER SPP.

Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

CLSI (exNCCLS) 2005 - Documento M100-s15 (tabla 3a)

- Método de dilución en agar (M7-A6)
- Medio: Mueller Hinton enriquecido con sangre de carnero al 5%.
- Inóculo: 0.5 de Mc Farland
- Incubación: 24hs a 42°C o 48hs a 36°C en microaerofilia.

“Ciertos aislamientos de algunas especies *Campylobacter* (*C. jejuni* subps. *doylei*, *C. fetus* y *C. lari*) pueden no crecer a 42°C por lo tanto la elección de la temperatura de incubación debe hacerse según la especie.”

- Cepa control de calidad *C. jejuni* ATCC 33560.
- La CLSI aún no se ha expedido en cuanto a puntos de corte, los que aquí recomendamos son los utilizados en la literatura internacional

Servicio ANTIMICROBIANOS
INEI – ANLIS Dr Carlos G. Malbran

Puntos de corte – Dilución en Agar

Antibiótico	Sensible	Intermedio	Resistente
Ciprofloxacina (CIP)	≤ 1	2	≥ 4
Eritromicina (ERI)*	≤ 4	-	≥ 8
Tetraciclina (TET)	≤ 4	8	≥ 16
Fosfomicina (FOS)	≤ 64	128	≥ 256
Nitrofurantoina(NIT)	≤ 32	64	≥ 128
Gentamicina (GEN)	≤ 4	8	≥ 16
Cloranfenicol (CMP)	≤ 8	16	≥ 32
Azitromicina (AZI)	≤ 2	4	≥ 8
Imipenem (IMP)	≤ 4	8	≥ 16
Amoxicilina/clav(AMC)	$\leq 8/4$	16/8	$\geq 32/16$

Extraído de la Tabla 2A del documento M100-S15 – CLSI 2005

*Modificado según recomendación de la literatura (Gaudreau et al).

Servicio ANTIMICROBIANOS
INEI – ANLIS Dr Carlos G. Malbran

CONDICIONES PARA EVALUAR LA SENSIBILIDAD EN CAMPYLOBACTER SPP.
Antibiograma por difusión*:

- Inóculo: 0.5 de McFarland
- Medio: MH enriquecido con sangre de carnero al 5%.
- Incubación: 48hs a 35°C en microaerofilia.

Drogas a ensayar para cepas provenientes de diarreas:

de primera línea (ATB mínimo): **eritromicina y ciprofloxacina** .

Adicionales: **tetraciclina, nitrofurantoina y cloranfenicol**

Drogas recomendadas para infecciones sistémicas: amoxicilina/ac. clavulánico, imipenem , gentamicina.

*La opción de utilizar esta técnica como screening de la sensibilidad a los antimicrobianos surge de un estudio de correlación entre el antibiograma por difusión y la dilución en agar realizado en el servicio de Antimicrobianos del INEI – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. Los antibióticos detallados en la tabla de puntos de corte de difusión cuentan con una buena correlación, mientras que no recomendamos evaluar la sensibilidad a ampicilina y fosfomicina por difusión.

Puntos de corte – Difusión por disco

Antibiótico	Resistente	Intermedio	Sensible
Ciprofloxacina (CIP)	≤15	16-20	≥21
Eritromicina (ERI)	≤13	14-22	≥23
Tetraciclina (TET)	≤14	15-18	≥19
Nitrofurantoina (NIT)	≤14	15-16	≥17
Gentamicina (GEN)	≤12	13-14	≥15
Cloranfenicol (CMP)	≤12	13-17	≥18
Azitromicina (AZI)	≤13	14-17	≥18
Imipenem (IMP)	≤13	14-15	≥16
Amoxicilina/clav (AMC)	≤13	14-17	≥18

•Extraído de Tablas 2A y 2C, Documento M100-S15 – CLSI (ex NCCLS) 2005.

La CLSI aún no se ha expedido en cuanto a puntos de corte, los que aquí recomendamos son los utilizados en la literatura internacional

Antibiograma por difusión

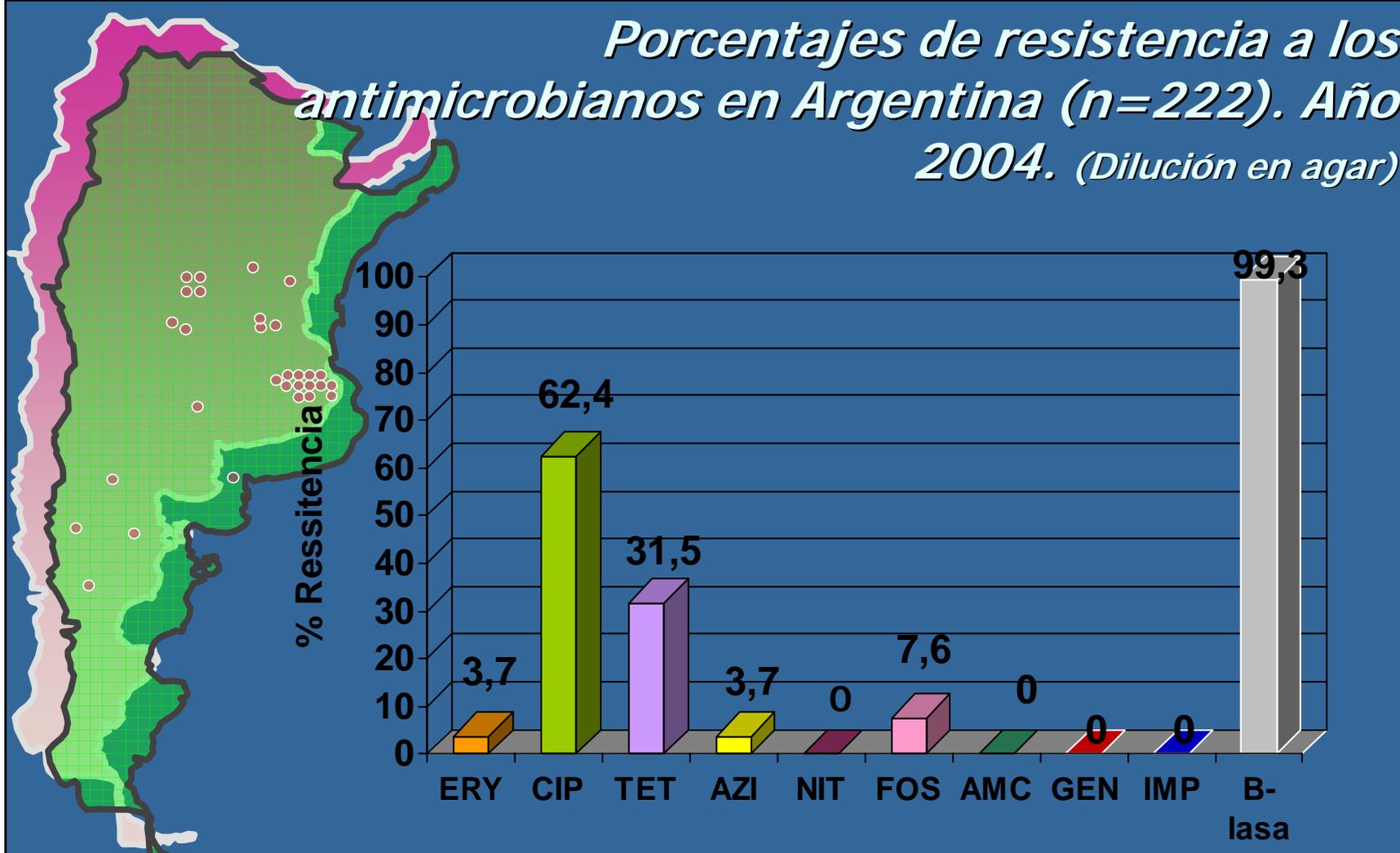


Dilución en medio sólido



Servicio ANTIMICROBIANOS
INEI – ANLIS Dr Carlos G. Malbran

Porcentajes de resistencia a los antimicrobianos en Argentina (n=222). Año 2004. (Dilución en agar)



Instituciones que participan en la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos en *Campylobacter*:
 CÓRDOBA: Clínica Reina Fabiola, Htal. Del Niño Jesús; LA PAMPA: Htal. Gob. Centeno; NEUQUEN: Htal. Heller, Htal. Provincial; RIO NEGRO: Htal. Regional Cipolletti y Htal. Regional de Bariloche; SANTA FE: Htal. Alasia, Inst. ABC, Htal. V. J. Vilela, Htal. Provincial; CAPITAL FEDERAL: Htal. Garrahan, Htal. Piñero, Sanatorio Mitre, Htal. Fernandez; PROV DE BUENOS AIRES: Htal. Sor M. Ludovica, Htal. Eva Peron (ex Castex) Htal. Evita de Lanus, Htal. Piñero

*¿Por qué es importante el diagnóstico de las diarreas por *Campylobacter* spp. y la vigilancia de la resistencia?*

📍 Porque... es el primero o segundo agente etiológico de diarreas bacterianas y es considerado un factor importante en el desarrollo del Sme. De Guillain – Barré.

📍 Porque... en los casos que se necesite un tratamiento antibiótico, la droga de primera elección para *Campylobacter* spp., la ERITROMICINA, es ineficaz frente a otros enteropatógenos y en nuestro país hay una alta tasa de resistencia a CIPROFLOXACINA

Bibliografía

- Nachamkin I.; Engberg J.; Arestrup F. (2002) Diagnosis and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* species. *Campylobacter* 2nd Edition. ASM Press, Washington, D. C.p 45-66
- Trieber C.; Taylor D. (2000). Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter*. *Campylobacter* 2nd Edition 2. ASM Press, Washington, D. C. p 441-454
- Coker A.; et al. Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerg. Infect. Diseases*. 8: 237-243
- Allos B. M. 2001. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging Issues and trends. *Clin Inf Dis* 32:1201-6.
- Taylor D.; Courvalin P. 1988. Mechanisms of Antibiotic Resistance in *Campylobacter* Species. *Antimic. Agents Chemoth.*32: 8, 1107
- Oncul O.; et al. 2003. Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni*: a comparison between Etest and agar dilution method. *Diag. Microbiol. And Inf. Dis.* 45:69-71
- Lin J.; et al. 2002. CmeABC functions as a multidrug Efflux System in *Campylobacter jejuni*. *Antimic. Agents Chemoth.* 46: 2124-2131
- Gaudreau Ch.; et al. 1997. Comparison of disc diffusion and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Antimicrob. Chemoth.* 39: 707-712
- Bachoual R.; et al. 2001. Single or double mutational alterations of GyrA associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Microb. Drug Resist.* 7: 257- 261
- Smith k. et al. 1999. Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992-1998. *New Engl. Journ. Medic.* 340: 1525- 1532
- Engberg J. et al. 2001. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg. Infect. Diseases*. 7: 24-34