

Patricia Bascuñana,
Irene Pena,
Juan J. Picazo,
Aurelio C. Velasco

Sensibilidad antimicrobiana de cepas hipurato-negativas de *Campylobacter* spp. y de *Helicobacter pullorum* aisladas de enfermos con diarrea

Servicio de Microbiología Clínica. Hospital Clínico San Carlos. Madrid.

RESUMEN

El género *Campylobacter*, tanto *C. jejuni* como algunas especies hipurato-negativas y géneros relacionados, son la principal causa de gastroenteritis en nuestro entorno a lo largo de todo el año. El objetivo del presente estudio es determinar la sensibilidad de cepas hipurato negativas de *Campylobacter* spp. y de *Helicobacter pullorum* aislados de heces diarreicas humanas. Se estudiaron 39 cepas de *Campylobacter coli*, dos de *C. lari* y cinco de *Helicobacter pullorum* identificadas por espectrometría de masas MALDI-TOF. La sensibilidad a amoxicilina-clavulánico, eritromicina, azitromicina, gentamicina, ciprofloxacino, levofloxacino, tetraciclina, tigeciclina y cloranfenicol se determinó por E-test. La mayoría de las cepas de *Campylobacter* hipurato-negativas y *H. pullorum* estudiadas presentaron una elevada resistencia a las dos fluoroquinolonas probadas y a la tetraciclina. Por otro lado, todas las cepas fueron sensibles a amoxicilina-clavulánico, a tigeciclina y a cloranfenicol, mientras que la mayoría lo fueron a los macrólidos y a la gentamicina.

Palabras Clave: *Campylobacter* hipurato negativo, *Helicobacter pullorum*, sensibilidad antibiótica.

Antimicrobial sensitivity of hippurate-negative *Campylobacter* and *Helicobacter pullorum* strains isolated from patients with diarrhea

ABSTRACT

C. jejuni as well as some hippurate-negative *Campylobacter* species and related diarrheagenic organisms, are the leading cause of gastroenteritis in our environment all throughout the year. The aim of the present study was to determine the

sensitivity of hippurate-negative *Campylobacter* and *Helicobacter pullorum* strains isolated from the stools of patients with diarrhea. We tested 39 *Campylobacter coli*, two *C. lari* and five *Helicobacter pullorum* strains identified by mass spectrometry analysis. The sensitivity to amoxicillin-clavulanic acid, erythromycin, azithromycin, gentamicin, ciprofloxacin, levofloxacin, tetracycline, tigecycline and chloramphenicol was tested by E-test. Most hippurate-negative *Campylobacter* and *H. pullorum* isolates studied showed high resistance to tetracycline and to the two fluoroquinolones tested. On the other side, all strains were sensitive to amoxicillin-clavulanic acid, tigecycline and chloramphenicol, while most of them were sensitive to both macrolides tested and to gentamicin.

Key Words: hippurate-negative *Campylobacter*, *Helicobacter pullorum*, antimicrobial sensitivity.

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Campylobacter* son la principal causa de infecciones gastrointestinales humanas en nuestro entorno a lo largo de todo el año. Las principales especies implicadas son *C. jejuni* y *C. coli* que en nuestro laboratorio representan, respectivamente, un 80% y 19% del total y, con menor prevalencia, otras especies hipurato-negativas como *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. concisus*, *C. fetus* y *C. curvus*. Actualmente, especies del género *Helicobacter* están emergiendo como patógenos entéricos en humanos, siendo una de las más importantes *H. pullorum*^{1,2}.

La mayoría de las gastroenteritis bacterianas no requiere tratamiento antibiótico ya que suelen ser autolimitadas. En los casos que deban ser tratados con antibióticos, ciprofloxacino suele ser el fármaco más recomendado. Sin embargo, en las gastroenteritis por *Campylobacter* spp. y *Helicobacter* productores de diarrea, el fármaco de elección es la eritromicina; otras alternativas serían fluoroquinolonas y tetraciclinas^{3,4}, aunque el continuo aumento de resistencias y la mayor frecuencia de estas etiologías en niños desaconseja su utilización en la clínica^{5,6}.

El objetivo del presente estudio es determinar la sensibilidad de cepas hipurato negativas de *Campylobacter* spp. y de *Helicobacter pullorum* aislados de heces diarreicas humanas.

Correspondencia:
Aurelio C. Velasco
Servicio de Microbiología,
Hospital Clínico San Carlos, Madrid
E-mail: avelasco.hsvo@salud.madrid.org

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismos en estudio. Se estudiaron 41 cepas de *Campylobacter* spp. hipurato negativas (39 *C. coli* y dos de *C. lari*) y cinco cepas de *Helicobacter pullorum* aisladas de heces diarreicas. La identificación de género y especie se realizó por espectrometría de masas MALDI-TOF (*matrix-associated laser desorption/ionization time of flight*) (Bruker GmbH, Leipzig, Alemania)^{7,9}. Hasta su estudio en lotes, las cepas se mantuvieron congeladas a -20 °C en leche desnatada o en viales ViaBank® (Corsham Wiltshire, Reino Unido). Para su descongelación, las muestras se inocularon en agar Columbia suplementado con 5% de sangre de cordero (Biomérieux, Marcy l'Etoile, Francia) e incubadas a 42 °C en atmósfera microaerófila (BD Gaspak EZ, Sparks, Maryland, EEUU) durante 24 horas.

Estudios de sensibilidad. La sensibilidad se determinó por E-test (AB Biodisk, Solna, Suecia). Las cepas se diluyeron en agua estéril hasta una turbidez de 0,5 de Mc Farland y se inocularon en agar Müller-Hinton suplementado con 5% de sangre de cordero (Biomérieux, Marcy l'Etoile, Francia) incubado a 42°C durante 24 h en atmósfera microaerófila (BD Gaspak EZ, Sparks, Maryland, USA). Los antibióticos estudiados fueron amoxicilina-clavulánico, eritromicina, azitromicina, gentamicina, ciprofloxacino, levofloxacino, tetraciclina, tigeciclina y cloranfenicol. La CMI, definida como la concentración más baja de antimicrobiano en la que no se observó crecimiento, se registró a las 24 h de incubación. Como control se utilizó *C. coli* ATCC 43478. Según estándares CLSI, se consideraron los siguientes puntos de corte de resistencia: ciprofloxacino ≥ 4 mg/L, levofloxacino ≥ 8 mg/L, tetraciclina ≥ 16 mg/L, gentamicina ≥ 16 mg/L y cloranfenicol ≥ 32 mg/L. El punto de corte de resistencia a tigeciclina se fijó en $>0,5$ mg/L según criterios EUCAST. Dada la falta de criterios uniformemente estándar sobre puntos de corte de resistencia en *Campylobacter* para otros antimicrobianos, los de eritromicina, azitromicina y amoxicilina-clavulánico se fijaron siguiendo el criterio de estudios previos⁴: ≥ 16 mg/L, ≥ 4 mg/L y ≥ 32 mg/L, respectivamente.

RESULTADOS

Los resultados de sensibilidad, expresados como CMI₅₀ y CMI₉₀ (concentraciones que inhiben el crecimiento del 50% y del 90% de las cepas, respectivamente) y el rango de CMI se muestran en la tabla 1. La distribución de dichas CMI a lo largo de todo el rango de sensibilidad se muestra en la tabla 2.

Todas las cepas estudiadas fueron sensibles a amoxicilina-ácido clavulánico, tigeciclina y cloranfenicol. La mayoría fueron sensibles a macrólidos (85% para eritromicina y azitromici-

Tabla 1

Resultados de sensibilidad a los 9 antimicrobianos estudiados en las 41 de cepas de *Campylobacter* spp. y 5 de *H. pullorum*.

Antibiótico	CMI ₅₀ (mg/L)	CMI ₉₀ (mg/L)	Rango (mg/L)
Amoxicilina-ác. clavulánico	1,5	4	$\leq 0,25-8$
Eritromicina	1	256	$0,25-\geq 256$
Azitromicina	0,25	256	$\leq 0,125-\geq 256$
Gentamicina	0,75	256	$0,25-\geq 256$
Ciprofloxacino	32	32	$\leq 0,064-\geq 32$
Levofloxacino	32	32	$\leq 0,064-\geq 32$
Tetraciclina	256	256	$\leq 0,125-\geq 256$
Tigeciclina	0,02	0,05	$\leq 0,016-0,064$
Cloranfenicol	2	6	1-8

na) y gentamicina (89%), mientras que se observó un mayor número de cepas resistentes a fluoroquinolonas (85% para ciprofloxacino y 70% para levofloxacino) y a tetraciclina (76%).

DISCUSIÓN

Actualmente, los métodos basados en espectrometría de masas, MALDI-TOF, están considerados de referencia para la identificación de *Campylobacter* y *Helicobacter*⁷. Sin embargo, no ocurre lo mismo para la determinación de la CMI. Aunque existen diversos procedimientos para determinar la susceptibilidad *in vitro*, como difusión en disco, microdilución en caldo o E-test, ninguno de ellos se encuentra estandarizado para estas bacterias¹⁰. Esto dificulta la comparación de resultados entre distintos estudios. La lectura del E-test es relativamente subjetiva debido a las condiciones especiales para el crecimiento de *Campylobacter* y géneros afines; no obstante, el E-test es un método sencillo de realizar que no requiere el uso de instrumentación especial. Por esta razón, en el presente trabajo se eligió este último método para realizar la sensibilidad de las cepas estudiadas.

Los datos obtenidos muestran una distribución bimodal de las CMI de quinolonas y tetraciclinas y una agrupación más homogénea de las cifras de CMI en el resto de los antibióticos probados, con alguna cepa resistente en el caso de los macrólidos y gentamicina.

Nuestros resultados indican que no hubo diferencias significativas en el número de cepas resistentes a eritromicina y azitromicina. Teniendo en cuenta que la eritromicina es el antimicrobiano de elección, cuando sea necesario administrar un tratamiento antibiótico, las cepas resistentes *in vitro* a eritromicina lo son también a azitromicina, por lo que teóricamente no sería una alternativa a considerar. Además, nuestros datos muestran que los aislados de *C. coli* resistentes a macrólidos presentan también resistencia a las fluoroquinolonas y a otros

Tabla 2 Distribución de las CMI de varios antibióticos para las cepas de *Campylobacter* hipurato-negativas y de *Helicobacter pullorum*.

	Número de cepas de <i>Campylobacter</i> hipurato-negativas y de <i>Helicobacter pullorum</i> en cada CMI (mg/L)																
	≤0,016	0,02	0,03	0,064	0,125	0,25	0,5	0,75	1	2	4	8	16	32	64	128	≥256
Amox.-clav.						2	5	7	9	16	6	1					
Eritromicina						7	5	3	14	9	1						7
Azitromicina					9	18	11	1									7
Gentamicina						1	15	16	8	1							5
Ciprofloxacino				1	4	2					1	1					37
Levofloxacino				4	3						7	4	5				23
Tetraciclina					6	5							1	1	3	2	28
Tigeciclina	21	10	9	6													
Cloranfenicol									1	24	16	5					

grupos de antibióticos como gentamicina o tetraciclina, creándose cepas multiresistentes; estos datos concuerdan con los obtenidos en estudios previos^{2,10}. Otros autores proponen que los pacientes infectados con una cepa resistente a eritromicina o a fluoroquinolonas presentan mayor riesgo de prolongación de la diarrea¹¹, enfermedad invasiva o incluso la muerte que los infectados con cepas sensibles¹². Este incremento de cepas resistentes a los antibióticos, especialmente a macrólidos y quinolonas, se cree que está relacionado con el uso de antibióticos presentes en la alimentación de animales productores de alimentos^{6,10,13}. En nuestro estudio, de las cepas resistentes a fluoroquinolonas, 85% lo fueron a ciprofloxacino y 70% a levofloxacino. Según estos datos, las fluoroquinolonas deberían ser sustituidas por otras alternativas para el tratamiento de la gastroenteritis por *Campylobacter* hipurato-negativo y *H. pullorum*, en caso de que sea necesario administrar antibióticos.

La sensibilidad a las tetraciclinas difiere entre las estudiadas ya que todas las cepas fueron sensibles a tigeciclina y sólo 11 (24%), presentaron sensibilidad a tetraciclina. Dado que la tigeciclina se ha mostrado muy eficaz *in vitro* y que la principal vía de excreción del antibiótico inalterado es la vía fecal, la tigeciclina podría ser evaluada como una buena opción para el tratamiento de la gastroenteritis por *Campylobacter* spp. y *H. pullorum* en adultos, aunque no sería recomendable en niños. De igual manera, el cloranfenicol tampoco sería una buena opción en países con otras alternativas por sus potenciales efectos secundarios. Todas las cepas probadas en nuestro estudio fueron sensibles a amoxicilina-clavulánico, pudiendo considerarse una buena alternativa terapéutica en caso de no poder utilizar un macrólido.

En conclusión, los aislados de *Campylobacter* hipurato-negativos y *H. pullorum* estudiados presentaron una elevada resistencia a las dos fluoroquinolonas probadas y a la tetraciclina. Por otro lado, todas las cepas fueron sensibles a amoxicilina-clavulánico, a tigeciclina y a cloranfenicol, mientras que la mayoría lo fueron a los macrólidos y a la gentamicina.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a Paloma Lorenzo y Pablo Prieto su ayuda en la conservación de las cepas aisladas.

BIBLIOGRAFÍA

- Andersen LP. New *Helicobacter* species in humans. *Dig Dis* 2001; 19: 112-5.
- Vandenberg O, Houf K, Douat N, Vlaes L, Retore P, Butzler JP, et al. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of non-jejuni/coli campylobacters and arcobacters from Belgium. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 908-13.
- Gibreel A, Taylor DE. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 243-55.
- Lehtopolku M, Nakari UM, Kotilainen P, Huovinen P, Siitonen A, Hakanen AJ. Antimicrobial susceptibilities of multidrug-resistant *Campylobacter jejuni* and *C. coli* strains: in vitro activities of 20 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 1232-6.
- Payot S, Bolla JM, Corcoran D, Fanning S, Megraud F, Zhang Q. Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Microbes Infect* 2006; 8: 1967-71.
- Pratt A, Korolik V. Tetracycline resistance of Australian *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 452-60.
- Alispahic M, Hummel K, Jandreski-Cvetkovic D, Nobauer K, Razzazi-Fazeli E, Hess M, et al. Species-specific identification and differentiation of *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Campylobacter* by full-spectral matrix-associated laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry analysis. *J Med Microbiol* 2010; 59: 295-301.
- Kolinska R, Drevinek M, Jakubu V, Zemlickova H. Species identification of *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni* and *C. coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and PCR. *Folia Microbiol (Praha)* 2008; 53: 403-9.
- Mandrell RE, Harden LA, Bates A, Miller WG, Haddon WF, Fager-

- quist CK. Speciation of *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, *C. helveticus*, *C. lari*, *C. sputorum*, and *C. upsaliensis* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 6292-307.
10. Ge B, Bodeis S, Walker RD, White DG, Zhao S, McDermott PF, et al. Comparison of the Etest and agar dilution for in vitro antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter*. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 487-94.
 11. Travers K, Barza M. Morbidity of infections caused by antimicrobial-resistant bacteria. *Clin Infect Dis* 2002; 34 Suppl 3: S131-4.
 12. Helms M, Simonsen J, Olsen KE, Molbak K. Adverse health events associated with antimicrobial drug resistance in *Campylobacter* species: a registry-based cohort study. *J Infect Dis* 2005; 191: 1050-5.
 13. Lubber P, Bartelt E, Genschow E, Wagner J, Hahn H. Comparison of broth microdilution, E Test, and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1062-8.