

## COMUNICACIONES

## Identificación mediante biotipos y perfiles proteicos de *Campylobacter* aislados de perros\*

### Identification of *Campylobacters* isolated from dogs by using biotypes and protein electrophoretic patterns

G. GIACOBONI<sup>1</sup>, M.V., Dr.Cs. Vs., Bact.; M.C PUCHURI<sup>1</sup>, M. V.; C. CASTELLANO<sup>2</sup>, M. V., Dr. Cs. Vs.; M. G. ECHEVERRIA<sup>3</sup>, M. V., Dr. Cs. Vs., Bact., H. FERNANDEZ<sup>4</sup> T. M., D. Sc.

<sup>1</sup> Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Calle 60 y 118.CC 296 (1900) La Plata, Argentina

<sup>2</sup> Cátedra de Pequeños animales. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

<sup>3</sup> Cátedra de Virología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CONICET.

<sup>4</sup> Instituto de Microbiología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile.

#### SUMMARY

Two hundred and sixty faecal samples obtained with rectal swabs from dogs were studied for *Campylobacter* isolation. The samples were placed on Preston broth and incubated at 43° C for 12 h under a microaerophilic atmosphere. Then, they were seeded on Skirrow agar and incubated under the same conditions for 48 h. *Campylobacter* species were identified by conventional methods (morphological, biochemical and cultural test), Lior's biotypes and protein profiles were examined by polyacrylamide gel electrophoresis, under reducing conditions. The prevalence of thermo-tolerant *Campylobacter* species was 7.3%. Fifteen out of 19 *Campylobacter jejuni* biotype II isolates were used in electrophoresis. Strain 1522 was employed as reference strain. Analysis of the protein profiles of the electrophoretic banding patterns presented good correlation with biochemical tests. All isolates presented a protein band greater than 40-46 Kd and minor differences in mobility of 40-50 Kd. Four strains lacked the flagellin (62-64 Kd band). The fact that protein electrophoresis presented heterogeneity among strains of the same species and biotypes reinforces their importance as discriminative methods of epidemiological value.

*Palabras claves:* *Campylobacter*-biotipificación-electroforesis

*Key words:* *Campylobacter*-biotyping-electrophoresis

#### INTRODUCCION

Las especies termotolerantes de *Campylobacter* (*C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. coli* y *C. lari*), son agentes causantes de gastroenteritis y diarrea aguda en seres humanos ([Blaser, 1983](#)) y reconocen como reservorios naturales una gran variedad de especies de animales domésticos y silvestres ([Blaser, 1983](#); [Yogasundram y col., 1989](#); [Giacoboni y col., 1993](#)). Los perros y gatos son portadores y, por su estrecha relación con el ser humano al ser utilizados como mascotas, se describen como una fuente probable de infección ([Skirrow, 1981](#)).

El conocimiento de las especies prevalentes, así como la individualización e identificación de las cepas aisladas proveen información epidemiológica y permite relacionar las fuentes de contagio y el modo de transmisión. Los métodos de tipificación convencionales, basados en las pruebas bioquímicas, resistencia a varios agentes y tolerancia a diferentes temperaturas, son pruebas fenotípicas que se utilizan para caracterizar las cepas aisladas. No obstante, los diferentes métodos empleados en cada laboratorio pueden conducir a

resultados discrepantes ([Onn y Holmes, 1991](#)). La electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) es un método sensible y práctico que complementa la identificación y clasificación de los microorganismos ([Moore y col., 1980](#); [Donald y col., 1984](#)).

El objetivo de este trabajo fue identificar las especies de *Campylobacter* aisladas de perros de la ciudad de La Plata (Argentina), utilizando métodos convencionales y su biotipificación por el esquema de Lior, complementado con perfiles proteicos determinados por electroforesis en SDS-PAGE.

## MATERIAL Y METODOS

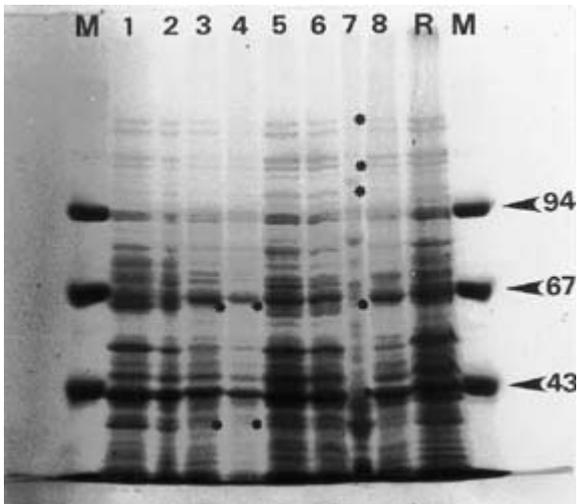
Se tomaron muestras fecales por hisopado rectal de 260 perros atendidos en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Las muestras fueron colocadas en caldo Preston de enriquecimiento e incubadas a 43°C, en atmósfera microaerófila (Campy Pack, BBL), durante 12 horas. Luego, una alícuota de 0.1 ml fue sembrada en agar selectivo de Skirrow modificado (agar Brucella 43 g/l, vancomicina 10 mg/l, trimetoprima 5 mg/l, polimixina B 2.500 U.I/l, vancomicina 10 mg/l, metabisulfito de sodio 0.5 g/l, piruvato de sodio 0.5 g/l, sulfato ferroso 0.5 g/l y sangre equina desfibrinada 70 ml/l) e incubada en iguales condiciones de atmósfera y temperatura, durante 48 horas. Para la identificación presuntiva de las colonias sospechosas se realizó coloración de Gram, pruebas de oxidasa y de catalasa. La identificación de especie se realizó según las pruebas bioquímicas y culturales propuestas por [Skirrow y Benjamin \(1980\)](#) y la biotipificación, de acuerdo al esquema de [Lior \(1984\)](#). Las cepas utilizadas para la electroforesis fueron cosechadas en una solución salina de pH 7.0, a partir de placas de agar sangre al 5% luego de una incubación de 48 horas a 43°C en microaerofilia. Las suspensiones bacterianas fueron lavadas 3 veces con la misma solución y, posteriormente, centrifugadas a 3500 rpm durante 20 minutos. Los sedimentos así obtenidos, formados por bacterias completas, fueron procesados en condiciones de reducción, hervidas a 100°C, durante 5 minutos y sembradas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7.5%, empleando un sistema de buffer discontinuo. Las placas (170 x 190 x 1 mm) se sometieron a 35 mA durante aproximadamente 3.5 horas de acuerdo a la metodología utilizada por [Brooks y col. \(1986\)](#). Como cepa de referencia se utilizó cepa humana 1522 de *C. jejuni*. y como marcador de peso molecular, un preparado proteico comercial (Pharmacia) que produce 3 bandas (94, 67 y 43 Kd). La tinción posterior de los geles se realizó con azul brillante de Coomassie.

## RESULTADOS Y DISCUSION

De las 260 muestras estudiadas fueron aisladas 19 cepas de *Campylobacter* termotolerantes (7.3%), correspondiendo todas a la especie *Campylobacter jejuni* y, según el esquema de Lior, al biotipo II. A pesar de haber utilizado procedimientos similares en el procesamiento de las muestras, la prevalencia de *Campylobacter* encontrada en este estudio fue baja (7.3%), comparada con la informada por [Fernández y col. \(1991, 1994\)](#) en la provincia de Valdivia (Chile) (51.3% y 42.5%). En estos estudios, [Fernández y col. \(1991, 1994\)](#) encuentran que el biotipo I de *C. jejuni* es el más frecuentemente aislado. En nuestro trabajo, en cambio, el biotipo II fue el único biotipo aislado. Estas diferencias podrían estar condicionadas por situaciones epidemiológicas de carácter geográfico-ambiental que estuviesen favoreciendo el predominio de determinados tipos de cepas ([Lastovica y col., 1986](#)).

De las 19 cepas aisladas, 15 fueron sometidas a análisis electroforético y denominadas 13, 14, 29, 64, 78, 83, 87, 88, 92, 106, 162, 165, 201, 222 y 259. Los patrones obtenidos en las distintas cepas fueron similares y presentaron un número de 30 bandas aproximadamente. Dos de ellas (29 y 64) carecieron de bandas de 35 y 64 kD. Las cepas 87 y 222 no presentaron la banda de 64 kD y, además, la cepa 87 apareció diferente a las demás, con ausencia de bandas de 43, 110, 125 y 155 kD. Las cepas 29, 64 y 88 mostraron perfiles proteicos muy similares entre sí, mientras que en la cepa 201 se apreciaron diferencias de movilidad en las bandas ubicadas entre 40 y 50 kD ([figuras 1 y 2](#)).

De acuerdo a la bibliografía consultada, *C. jejuni* posee un polipéptido mayor de entre 40 a 46 kD, cuatro menores, constantes, de aproximadamente 27-29, 35-40, 62-64 y 72 kD y uno menor, variable, de entre 70-75 kD. Todas las cepas compartieron las bandas del polipéptido mayor (40-46kD), pero difirieron en las 4 proteínas menos constantes, especialmente en la banda de 62- 64 kD que estuvo ausente en cuatro de las quince cepas procesadas. Este peso molecular corresponde al de la flagelina, proteína termolábil que podría perderse por las repetidas resiembras realizadas en medios sólidos ([Newell y col., 1984](#); [Wennman y col., 1985](#)).



**Figura 1:** Perfiles proteicos de 8 cepas aisladas e identificadas como *Campylobacter jejuni* biotipo II de Lior.

M: marcador de peso molecular expresado en kD (flechas).

R: cepa de referencia humana 1522.

1: cepa 13, 2: cepa 14, 3: cepa 29, 4: cepa 64, 5: cepa 78, 6: cepa 83, 7: cepa 87, 8: cepa 88.

Los asteriscos indican ausencia de bandas.

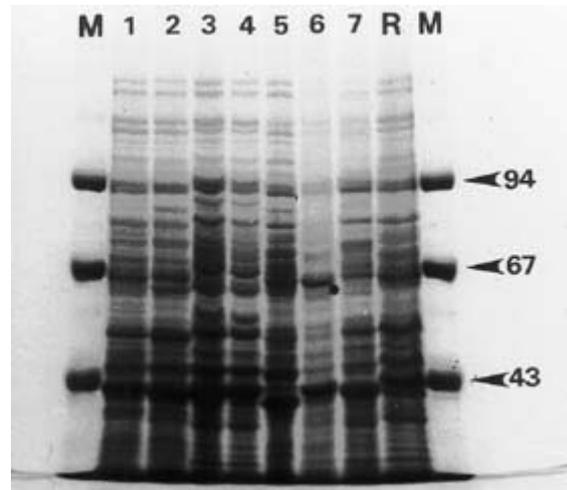
Protein profile of 8 strains isolated and identified as *Campylobacter jejuni* Lior's biotype II.

M: molecular weight marker expressed in kD (arrows).

R: human reference strain (1522).

1: strain 13, 2: strain 14, 3: strain 29, 4: strain 64, 5: strain 78, 6: strain 83, 7: strain 87, 8: strain 88.

Asterisks indicate band absence.



**Figura 2:** Perfiles proteicos de 7 cepas aisladas e identificadas como *Campylobacter jejuni* biotipo II de Lior.

M: marcador de peso molecular expresado en kD (flecha).

R: cepa de referencia humana 1522.

1: cepa 92, 2: cepa 106, 3: cepa 162, 4: cepa 165, 5: cepa 201, 6: cepa 222, 7: cepa 259.

El asterisco marca ausencia de una banda.

Figure 2: Protein profile of 7 strains isolated and identified as *Campylobacter jejuni* Lior's biotype II.

M: molecular weight marker expressed in kD (arrows).

R: human reference strain 1522).

1: strain 92; 2: strain 106, 3: strain 162, 4: strain 165, 5: strain 201, 6: strain 222, 7: strain 259.

Asterisc indicates band absence.

La importancia de la aplicación de un método para tipificar las especies y subespecies del género *Campylobacter*, reside en la posibilidad de poder relacionar las cepas encontradas en la amplia variedad de animales reservorios de estas bacterias con aquellas aisladas en aquellos casos de infección humana. Existe una amplia variedad de métodos de tipificación, con diferentes grados de complejidad y discriminación en cuanto a la técnica y resultados que puedan ser reproducidos en diferentes laboratorios ([Blaser, 1983](#); [Patton y Wachsmuth, 1992](#)). El esquema de biotipificación de [Lior \(1984\)](#) es uno de los métodos más utilizados para relacionar epidemiológicamente las cepas aisladas. Sin embargo, también se ha utilizado con este propósito la electroforesis de proteínas. En [1992, Hu y col.](#), utilizando electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), realizaron un estudio epidemiológico comparando el perfil proteico de 41 cepas de *C. jejuni* de origen animal y humano, concluyendo que, por los patrones obtenidos, es posible establecer relaciones de identidad entre las cepas aisladas de pollos y otros animales y las de infecciones humanas.

Si bien a la electroforesis se le considera un método complejo para tipificar *Campylobacter* ([Patton y Wachsmuth, 1992](#)) y de discriminación moderada a baja, en nuestro trabajo este método mostró heterogeneidad entre las cepas aisladas de una población canina, aunque las mismas pertenecieron todas a un mismo biotipo. El hecho de que la electroforesis de proteínas haya demostrado heterogeneidad entre cepas de una misma especie y biotipo, reafirma su importancia como método de discriminación epidemiológica. No obstante lo anterior, estimamos necesario realizar estudios de biología molecular de mayor profundidad que permitan explicar las diferencias encontradas en los perfiles proteicos de las cepas analizadas.

## RESUMEN

Se estudiaron 260 muestras fecales obtenidas por hisopado rectal atendidos en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Para el aislamiento de *Campylobacter* se utilizó caldo Preston de enriquecimiento, incubado a 43°C durante 12 h en microaerofilia y siembra en agar Skirrow incubado en iguales condiciones por 48 h. La identificación de especie se realizó por los métodos

convencionales, la biotipificación por el método de Lior y los perfiles proteicos se determinaron en geles de poli(acrilamida) bajo condiciones de reducción. La prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes fue de 7.3%, resultando 19 cepas identificadas como *C. jejuni* biotipo II. De éstas, 15 fueron sometidas a electroforesis, utilizándose la cepa humana 1522 como referencia. Los perfiles proteicos obtenidos de las cepas fueron similares y presentaron un número de 30 bandas aproximadamente. Todas las cepas compartieron las bandas del polipéptido mayor de 40-46 kD. Las diferencias se observaron en la carencia de algunas bandas o en su movilidad entre las de 40 y 50 kD. El hecho de que la electroforesis de proteína haya demostrado heterogeneidad entre cepas de una misma especie y biotipo, reafirma su importancia como método de discriminación epidemiológica.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Miguel Angel Petruccelli, por su colaboración en la impresión fotográfica.

Aceptado: 31.08.99.

\* Trabajo parcialmente financiado por los proyectos DID.UACH S-97-21 y FONDECYT1980920.

## BIBLIOGRAFIA

BLASER, M.J. 1983. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infection, *Epidemiol. Rev.* 5: 157-176.

BROOKS, B., M. GARCIA, D.E FRASER, H.LIOR, B. STEWART, A.M. LAMMERDING. 1986. Isolation and characterization of cephalotin-susceptible *Campylobacter coli* from slaughter cattle, *J. Clin. Microbiol.* 24: 591-595.

DONALD A., J.R. FERGUSON, W. DWIGHT, J.R. LAMBE. 1984. Differentiation of *Campylobacter* species by protein banding patterns in polyacrylamide slab gels, *J. Clin. Microbiol.* 20: 453-460.

FERNANDEZ, H., R. MARTIN, J. THIBAUT. 1991. *Campylobacter* intestinal carriage among stray and pet dogs, *Rev. Saúde Públ. (Sao Paulo)* 25: 473-475.

FERNANDEZ, H., K. KAHLER, R. SALAZAR, M.A. RIOS. 1994. 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.

GIACOBONI, G., K. ITOH, K. HIRAYAMA, E. TAKAHASHI, T. MITSUOKA. 1993. Comparison of fecal *Campylobacter* in calves and cattle of different ages and areas in Japan, *J. Vet. Med. Sci.* 55: 555-559.

HU, L., Z. CHEN, B. WANG. 1992. Studies of outer membrane protein profiles by SDS-PAGE for *Campylobacter jejuni* in an epidemiological investigation, *J. West. China Univ. Med. Sci.* 23: 280-283.

LASTOVICA, A.J., E. LE ROUX, R.V. CONGI, J.L. PENNER. 1986. Distribution of sero-biotypes of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from paediatric patients, *J. Med. Microbiol.* 21:1-4.

LIOR, H. 1984. New, extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter laridis*, *J. Clin. Microbiol.* 20: 636-640.

MOORE, W.E.C., D.E. HASH, L.V. HOLDEMAN, E.P. CATO. 1980. Polyacrylamide slab gel electrophoresis of soluble proteins for studies of bacterial floras, *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 900-907.

NEWELL, D. G., H. MC BRIDE, A. D. PEARSON. 1984. The identification of outer membrane proteins and flagella of *Campylobacter jejuni*, *J. Gen. Microbiol.* 130: 1201-1208.

ONN, S. L. W., B. HOLMES. 1991. Effect of inoculum size on the phenotypic characterization of *Campylobacter* species, *J. Clin. Microbiol.* 29: 923-926.

PATTON, CH.M., K. WACHSMUTH. 1992. Typing Schemes: Are Current Methods Useful? En: Nachamkin, I., M. J. Blaser, L. S. Tompkins. (eds.): *Campylobacter jejuni*. Current status and future trends. American Society for Microbiology, Washington D.C.

SKIRROW, M.B., BENJAMIN, J. 1980. 1001 *Campylobacters*: cultural characteristics of intestinal *Campylobacters* from man and animals, *J. Hyg.* 85: 427-441.

SKIRROW, M.B. 1981. *Campylobacter* enteritis in dogs and cats: a "new zoonosis", *Vet. Res. Com.* 5: 13-19.

WENNMAN, W., J. CHAI, T.J. LOVIE, C. GANDREAU, C. LIOS, D. G. NEWELL, A.D. PEARSON, D.E TAYLOR. 1985. Antigenic analysis of *Campylobacter* flagellar protein and other proteins, *J. Clin. Microbiol.* 21: 108-112

YOGASUNDRAM, K., S.M. SHANE, K.S. HARRINGTON. 1989. Prevalence of *Campylobacter jejuni* in selected domestic and wild birds in Louisiana, *Avian Dis.* 33: 664-667.