

## Alteraciones morfológicas inducidas por ampicilina en *Campylobacter*

Francisco Hernández

Unidad de Microscopia Electrónica, Universidad de Costa Rica

Patricia Rivera, Marco Luis Herrera, Rosa María Rodríguez

Hospital Nacional de Niños, Caja Costarricense de Seguro Social

(Recibido: 18 de junio de 1985)

**Abstract:** Morphologic changes in *Campylobacter fetus* ssp. *jejuni* were evaluated as cultivated on thioglycollate broth, containing minimum of 0.1, 1,3 and 10 Ampiciline minimal inhibitory concentration (MIC). During the first four hours of incubation, no changes occurred in the presence of 0.1 MIC; but with the rest of the ampiciline dosis, even at the first hour, a proportion larger than 5% of filament-policurved forms was found, and it increased with the incubation time. The greatest number of altered bacteria was found with the use of 10 MIC. No other morphologic changes were observed.

El *Campylobacter fetus* ssp *jejuni* ha sido catalogado como uno de los principales agentes bacterianos causantes de diarrea, especialmente en niños menores de dos años de edad (Editorial Lancet, 1982). Este cuadro diarreico responde satisfactoriamente a la terapia hidroelectrolítica, recuperándose el paciente en un lapso de tres a cinco días (Karmali & Fleming, 1979). Sin embargo, en algunos casos la diarrea persiste hasta por más de dos semanas y el paciente puede permanecer como portador, aún durante períodos mayores de un año (Richardson *et al.* 1981). Por lo tanto, en esos pacientes de evolución crónica, se recomienda el tratamiento antimicrobiano para erradicar el agente del intestino y evitar ese estado de portador. El antibiótico de elección es eritromicina, y en el caso de cepas resistentes se recomienda el uso de gentamicina (Chow *et al.* 1978; Vanhoof *et al.* 1982; Svedhem *et al.* 1981).

Con respecto a la sensibilidad del *Campylobacter* hacia la ampicilina, la mayoría de las cepas muestran concentraciones mínimas inhibitorias muy altas, por lo que es recomendable terapéuticamente. Probablemente por la misma razón no se han evaluado las alteraciones morfológicas que podría inducirle; lo que se ha estudiado ampliamente en otras bacterias. Incluso, se ha demostrado que algunos antibióticos

beta lactámicos, son capaces de transformar bacterias bacilares en estructuras ovoideas o filamentosas (Tomasz, 1979a.).

En cuanto a la morfología de *Campylobacter*, se trata de bacterias curvadas, predominando las formas en C o en S y en menor proporción aparecen formas cocoides y filamentosas policurvas (Hernández *et al.* 1985). No obstante, estas últimas formas predominan en algunos cultivos (Hernández *et al.* 1984). Las estructuras cocoides se encuentran con más frecuencia en cultivos viejos, por lo que se relacionan con estados degenerativos (Buck *et al.* 1983). En contraposición surge la duda sobre la eventual participación de un antibiótico beta lactámico, en la morfogénesis de esas estructuras filamentosas policurvas, por lo que se decidió evaluar la morfología de esta bacteria cultivada en presencia de ampicilina.

Se estudiaron 8 cepas de *Campylobacter*. Cada una fue inoculada en una serie de tubos de tioglicolato, que contenía concentraciones de ampicilina equivalentes a 0.1, 1.3 y 10 concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), calculadas con base en la evaluación de su antibiótico-sensibilidad *in vitro* (Rodríguez *et al.* 1984). La atmósfera de cada tubo fue enriquecida con una mezcla de nitrógeno y anhídrido carbónico (Hernández *et al.* 1983) y se incubaron a 42°C.

De cada tubo se extrajeron alícuotas de 1 ml. al cabo de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta y décimo octava horas de incubación, se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en solución amortiguadora de fosfatos y se hicieron tinciones negativas con ácido fosfotúngstico. Además, los especímenes se deshidrataron y procesaron para cortes ultrafinos y réplicas de platino-carbón según el método ideado por el doctor Hiroshi Akahori, y fueron analizadas en un microscopio electrónico de transmisión (Hitachi HU 12A).

En las preparaciones de tinción negativa se contó el número de formas celulares que aparecían, considerándose como normales aquellas formas mono, bi o tricurvadas; definiendo como formas filamentosas policurvadas, aquellas que mostraban cuatro o más curvas. En la figura 1 se expone el porcentaje de formas alargadas, aparecidas en cada período de incubación para una misma cepa, según el tratamiento con las diferentes concentraciones de ampicilina evaluadas. Se observa que con 0.1 CMI no aparecen formas alargadas durante las primeras tres horas de incubación, en tanto con 1 CMI, aparece un 7% de formas alargadas durante la primera hora y ese porcentaje inicial sube aproximadamente al doble, cuando la cepa fue sometida a 10 CMI; además, esa proporción de formas alargadas es mayor a medida que se aumenta la concentración de ampicilina.

En la figura 2 se muestran algunas de las formas observadas en cultivos tratados con 10 CMI de ampicilina, en estos casos las bacterias se hicieron filiformes y su longitud llegó hasta 10  $\mu\text{m}$ , aunque su diámetro no fue mayor de 0,5  $\mu\text{m}$ . La pared de esas bacterias filamentosas es más lisa que la observada en formas no tratadas, que muestran un aspecto cerebriforme (Figura 3). En cortes ultrafinos de formas filamentosas, se aprecian estructuras como gránulos y cilindros basales, que indican una ultraestructura normal, sin embargo, aún en las formas más alargadas no se observaron vestigios de septos transversales, que indiquen una división celular activa (Figura 4). No obstante, en algunas réplicas se aprecian constricciones evidentes, que indican los sitios de división celular (Figura 5).

Las alteraciones morfológicas inducidas por penicilina en bacterias han sido estudiadas desde 1940 (Gardner, 1940). Posteriormente se han evaluado los efectos de otros antibióticos beta lactámicos, como ampicilina, cefalexina, piperacilina, mecilnam, tienamicina, ácido

clavulónico y cefalosporina (Tomasz, 1979a). Los principales cambios en la morfología de las bacterias tratadas han sido la transformación de bacilos en formas filamentosas u ovoideas (Tomasz, 1979a). Además, se han observado otras alteraciones como la formación de sáculos o protuberancias en la superficie de las bacterias tratadas (Staugaar *et al.* 1976; Klein y Luginbuhl, 1977). Estas diversas alteraciones morfológicas indican una multiplicidad de mecanismos de acción, por los cuales esas drogas ejercen su efecto sobre las bacterias, que en última instancia se traduce en una acción bacteriostática o bactericida (Schockman *et al.* 1979; Tipper, 1979; Tomasz 1979 a,b). Sin embargo, también puede ocurrir la lisis bacteriana sin que se detecten alteraciones morfológicas.

Los mecanismos y las vías metabólicas para los antibióticos beta lactámicos se desconocen actualmente. Incluso se ha propuesto que deben revisarse los mecanismos descritos tradicionalmente que explican la acción de la penicilina (Tomasz, 1979b). Aunque bien es posible que uno de sus efectos se deba a una alteración en la síntesis y estructuración del peptidoglican (Schockman *et al.* 1979; Tipper, 1979), lo que lleva a una inhibición en la formación de septos transversales en las bacterias en crecimiento, interrumpiendo la división bacteriana y provocando la formación de estructuras filamentosas, lo que se ha descrito entre otros agentes en *Escherichia coli* (Traugaad *et al.* 1977), *Proteus vulgaris* (Fleming *et al.* 1950), *Haemophilus influenzae* (Klein y Luginbuhl, 1977), *Legionella pneumophila* (Smalley *et al.* 1980). En este informe se describe un efecto similar en *Campylobacter fetus* ssp *jejuni*, asociado al uso de ampicilina. Sin embargo, no se observaron otras alteraciones morfológicas, como formación de sáculos o inducción de formas ovoideas.

## RESUMEN

Se evaluaron los cambios morfológicos de *Campylobacter fetus* ssp *jejuni* cultivados en caldo de tioglicolato, conteniendo 0.1, 1,3 y 10 concentraciones mínimas (CMI) de ampicilina. Durante las primeras cuatro horas de incubación en presencia de 0.1. CMI no ocurrieron alteraciones, sin embargo con el resto de las dosis de ampicilina, ya durante la primera hora se encontró una proporción mayor del 5% de formas filamentosas policurvadas, cuya proporción aumentaba con el tiempo de incubación, encon-

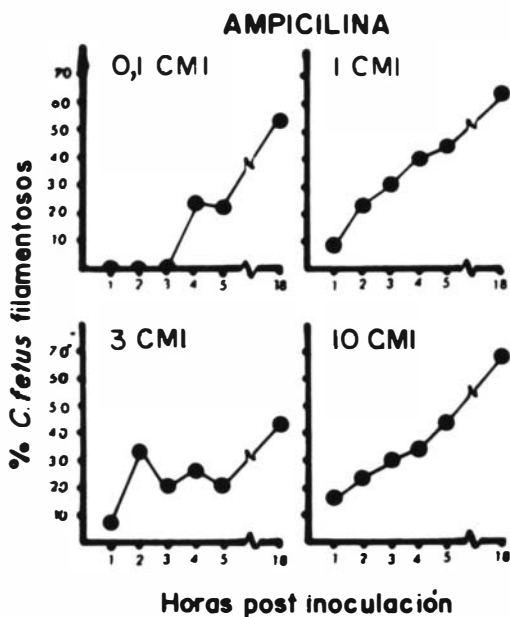


Fig. 1. Porcentaje de formas filamentosas de *Campylobacter* según dosis de ampicilina y tiempo de incubación.

trándose el mayor número de bacterias alteradas cuando se emplearon 10 CMI. No se observaron otras alteraciones morfológicas.

#### AGRADECIMIENTO

Agradecemos el financiamiento tanto de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (Proyecto N810-84-019), que hizo posible la realización de este trabajo; así como al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, cuyo financiamiento permitió la exposición de estos resultados en el VI Congreso Latinoamericano de Microscopía Electrónica (Maracaibo Dic. 1984).

Además, agradecemos el apoyo técnico del personal del Laboratorio Clínico del Hospital Nacional de Niños y de la Unidad de Microscopía Electrónica.

#### REFERENCIAS

Buck, G. E.; K. A. Parshall & C. P. Davis. 1983. Electron microscopy of the coccoid form of *Campylobacter jejuni* J. Clin. Microbiol. 18: 420-421.

Chow, A. W.; V. Patten & D. Bednorz. 1978. Susceptibility of *Campylobacter fetus* to twenty-two antimicrobial agents. Antimicrob. Agents. Chemother. 13: 416-518.

Editorial. 1982. *Campylobacter* enteritis. Lancet. 2: 1437-1438.

Gardner, A.D. 1940. Morphological effects of penicillin on bacteria. Nature, 146: 837-838.

Fleming, A.; A. Vourek & I. R. H. Kramer. 1950. The morphology and motility of *Proteus vulgaris* and organisms cultured in the presence of penicillin. J. Gen. Microbiol. 4: 257-267.

Hernández, F.; M.L. Herrera; P. Rivera & R.M. Rodríguez. 1984. Alteraciones morfológicas ocurridas espontáneamente en cultivos de *Campylobacter fetus* ssp *jejuni*. Rev. Cost. Cienc. Med. 5: 61-70.

Hernández, F.; L. Cipagauta; P. Rivera; M.L. Herrera & R.M. Rodríguez. 1985. Estudio ultraestructural de *Campylobacter fetus* ssp *jejuni* Rev. Latinoamer. Microbiol. 27: 11-20.

Karmali, M.A. & P.C. Fleming. 1979. *Campylobacter* enteritis C M A J. 120: 1525-1532.

Klein, R.D. & G.H. Luginbuhl. 1977. Ampicillin induced morphological alterations of *Haemophilus influenzae* type B. Antimicrob. Agents Chemother. 11: 559-563.

Richardson, N.J.; H.J. Koornhof & V. D. Bokkenheuser. 1981. Long-term infections with *Campylobacter fetus* subsp *jejuni* J. Clin. Microbiol., 13: 846-849.

Rodríguez, R.M.; P. Rivera; M.L. Herrera & F. Hernández. 1985. Antibiótico sensibilidad en *Campylobacter fetus* ssp *jejuni*. Rev. Hosp. Nal. Niños. (En prensa).

Schockman, G.D.; I. Daneo-Moore, J.B. Cornett & M. Mychajlonka. 1979. Does penicillin kill bacteria? Rev. Infect. Dis. 1: 787-796.

Smalley, D.L.; P.A. Jaques; D.D. Ourth & J. Layne. 1980. Antibiotic-induced filament formation of *Legionella pneumophila*. Amer. J. Clin. Pathol. 74: 488-495.

Staugaard, P.m F.M. Vanden-Berg, C.L. Woldringh & N. Nanninga. 1976. Localization of ampicillin-sensitive sites in *Escherichia coli* by electron microscopy. J. Bacteriol., 127: 1376-1381.

Svedhem, A.; B. Kaijser & E. Sjogren. 1981. Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* isolated from humans with diarrhea and from healthy chickens. J. Antimicrob. Chem. 7: 301-305.

Tipper, D.J. 1979. Mode of action of Bactam antibiotics. Rev. Infect. Dis. 1: 39-53.

Tomasz, A. 1979 a. From penicillin-binding proteins to the lysis and death of bacteria: A 1979 View. Rev. Infect. Dis. 1: 434-464.

Tomasz, A. 1979 b. The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: How the beta-

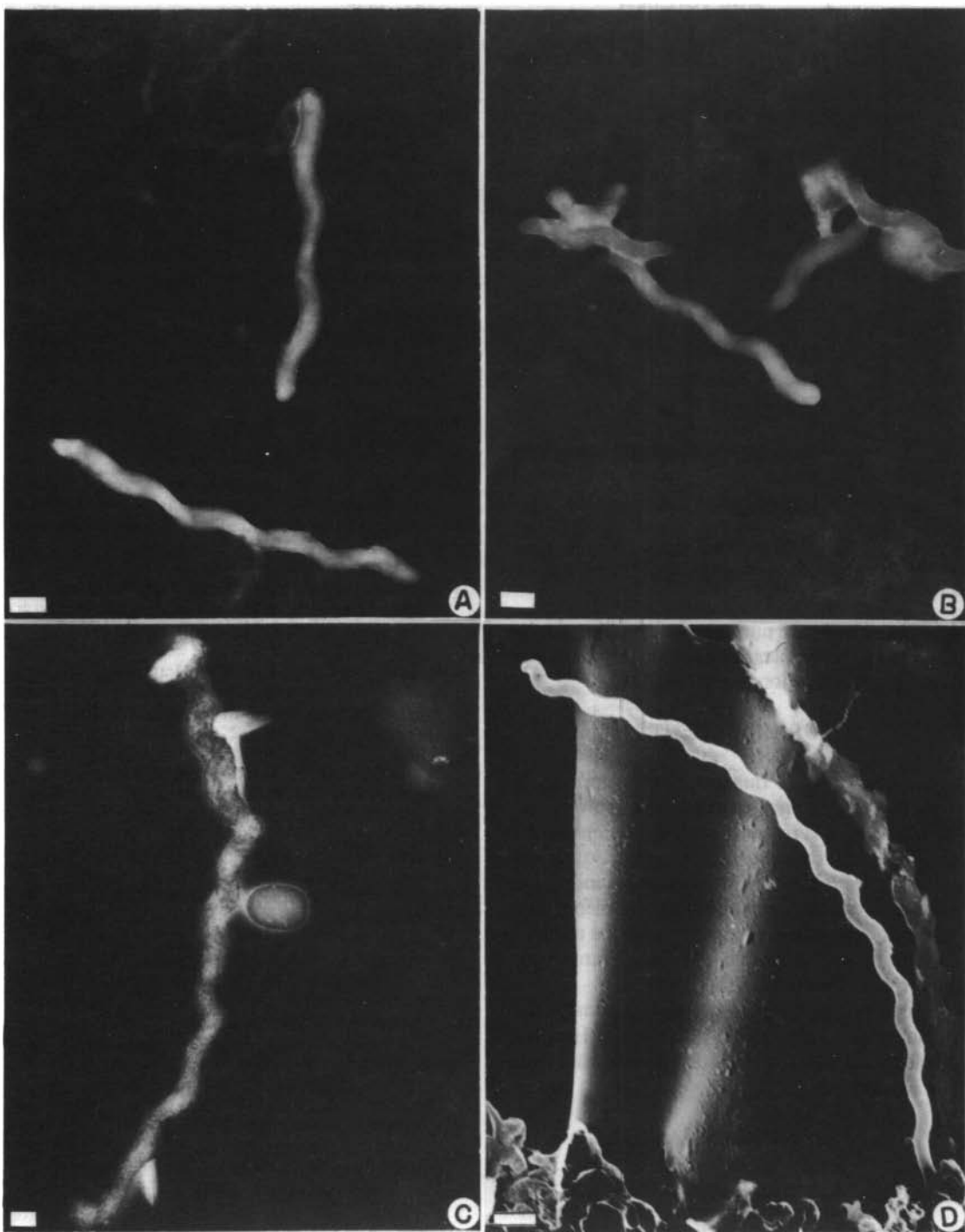


Fig. 2. Formas filamentosas de *Campylobacter* observadas en cultivos tratados con 10 CMI de ampicilina. ABC corresponde a tinción negativa. D. réplica de platino. (Barra = 0.5  $\mu$ m).

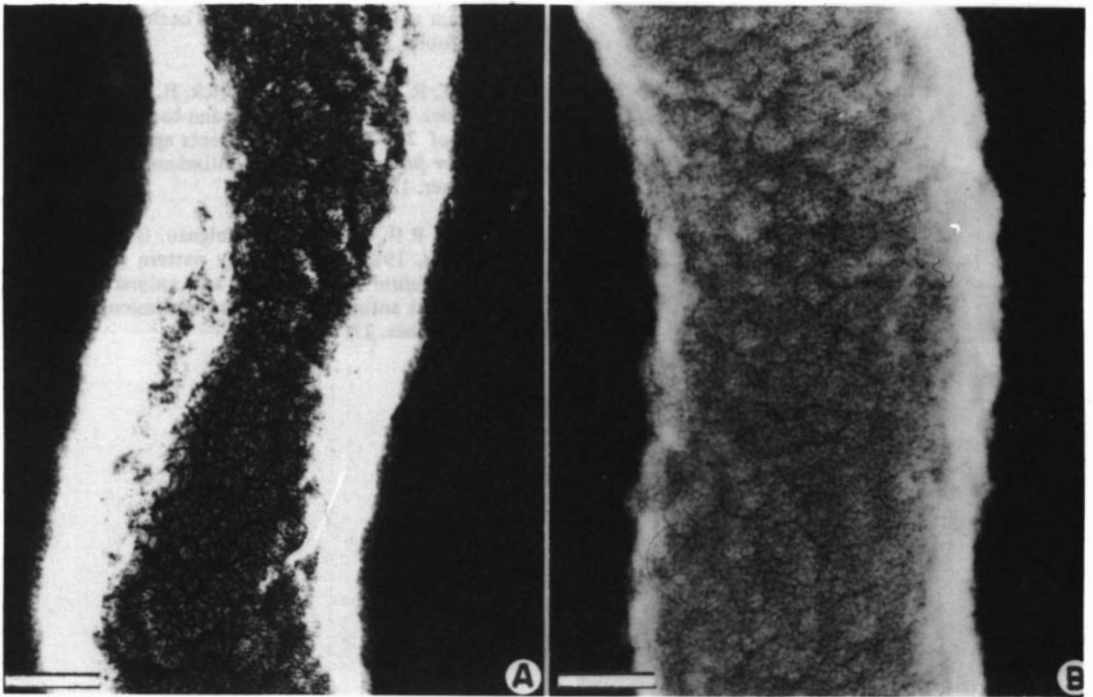


Fig. 3. Réplica de platino de formas filamentosas de *Campylobacter*. A. forma aparecida espontáneamente en un cultivo (Hernández *et al.* 1984). B. Forma observada en un cultivo tratado con 10 CMI de ampicilina. (Barra = 100 nm).

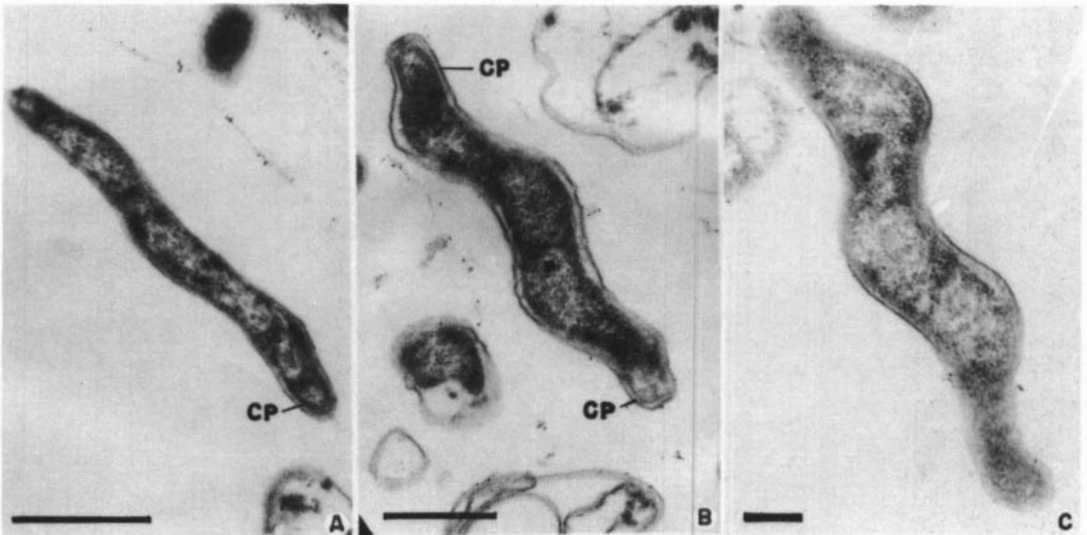


Fig. 4. Cortes ultrafinos de formas filamentosas de *Campylobacter* cultivadas en presencia de 10 CMI de ampicilina. cp. cilindro polar (Barra = 0.5  $\mu$ m).



Fig. 5. Réplica de platino de *Campylobacter* tratado con 10 CMl de ampicilina. Las flechas señalan posibles sitios de división celular. (Barra = 0.5um).

lactam antibiotics kill and lyse bacteria. Ann. Rev. Microbiol., 33: 113-137.

Vanhoof, R., B. Gordts, R. Dierick, H. Coignau & J.P. Butzler. 1980. Bacteriostatic and bactericidal activities of 24 Antimicrobial agents against *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* Antimicrob. Agents Chemother. 18: 118-121.

Vanhoof, R.H. Goossens, H. Coignau, G. Stas. & J.P. Butzler. 1982. Susceptibility pattern of *Campylobacter jejuni* from human and animal origins to different antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother. 21: 990-992.