

Campylobacter fetus ssp. *jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, bacterias helicoidales y coronavirus en intestino murino*

Francisco Hernández

Unidad de Microscopía Electrónica, Universidad de Costa Rica

Patricia Rivera y Marco Luis Herrera

Hospital Nacional de Niños, Caja Costarricense de Seguro Social

(Recibido para su publicación el 10 de abril de 1985)

Abstract: Intestinal contents of 28 laboratory-bred white mice and 6 wild-caught rats were extracted and observed with phase-contrast and transmission electron microscopy; cultures were made in Butzler agar and aeromonas, incubated in microaerobiosis, at 37° C for 5 days. In three mice and two rats, helicoidal bacteria were observed, with 8 to 11 periplasmic fibers and terminal branches of 8 to 11 structures, similar to flagella. In one of the rats, coronavirus-like particles were observed. *Campylobacter fetus* ssp. *jejuni* was isolated in cultures from two mice and *Aeromonas hydrophila* from two rats.

La etiología de las enfermedades diarreicas representa una verdadera trama multicausal, en la que suelen participar parásitos, bacterias y virus. El principal mecanismo de transmisión de esos agentes es la contaminación fecal, ya sea directamente de individuo a individuo, o bien, a través de vectores mecánicos o biológicos. Así, algunos agentes relacionados con la etiología de las diarreas, se aíslan de una amplia variedad de animales, incluyendo múridos que podrían intervenir en su epidemiología (Karmali y Fleming, 1979; Tsipori *et al.*, 1980).

Por otra parte, tanto ratas como ratones, han sido empleados como modelos en estudios de ultraestructura y microecología intestinal (Savage y McAllister, 1971; Davies *et al.*, 1973; Savage y Blumeshine, 1974; Davies y Savage, 1974; Chase y Erlandsen, 1976; Rozee *et al.*, 1982). Sin embargo, no se ha logrado cultivar todas las bacterias observadas en ese microhabitat, por lo que se hace alusión a algunas de ellas, únicamente con base en características morfológicas. En este sentido, Davies *et al.*, 1972, clasificaron las bacterias espirilares murinas en tres tipos morfológicos: 1) bacterias semejantes a *Borrelia*; 2) bacterias espirilares con fibras periplásmicas; y 3) bacterias

espirilares sin fibras periplásmicas. Las bacterias espirilares con fibras periplásmicas han recibido un interés especial, debido a la íntima relación que tienen con la mucosa intestinal, así como por su curiosa morfología (Phillips y Lee, 1983). El conocimiento de la microflora intestinal podría complementar algunos aspectos epidemiológicos de las enfermedades diarreicas; también ayudaría a la comprensión de las relaciones ecológicas existentes entre la flora indígena intestinal y el huésped.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 28 ratones blancos de un bioterio de la Universidad de Costa Rica y 6 ratas silvestres atrapadas en el *campus*. Cada animal fue sacrificado por dislocación cervical e inmediatamente se extrajo el intestino delgado y se le inyectó con 2 ml de solución salina estéril (NaCl 0,85%), a nivel de ileon, para extraer el contenido intestinal. Ese material se observó al microscopio de contraste de fases y al microscopio electrónico de transmisión mediante preparaciones teñidas con ácido fosfotúngstico (AFT). Además, ese contenido intestinal se inoculó en platos de petri con agar de Butzler y agar-Aeromonas, los que

* Este estudio fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

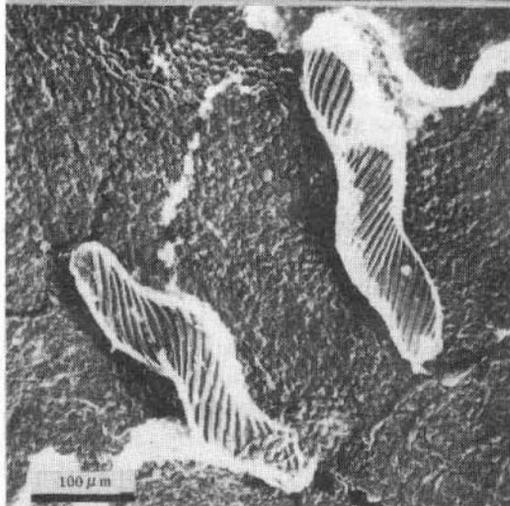
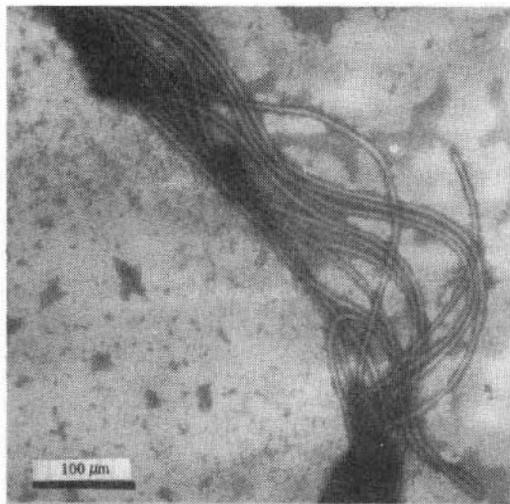


Fig. 1. Bacterias espirales, observadas en contenido intestinal de murinos.

A. Tinción negativa. Extremo de la bacteria con un ramillete de apéndices semejantes a flagelos. (Barra = 0.5 μm).

B. Copia al platino. Dos bacterias con sus características fibras periplásmicas arrolladas helicoidalmente alrededor de sus cuerpos. (Barra = 1 μm).

fueron colocados en jarras de anaerobiosis, con sobre generador de GasPack sin catalizador y se incubaron de 35 a 37°C durante cinco días (Phillips y Lee, 1983).

De las bacterias aisladas se estudió la movilidad en gota pendiente empleando un microscopio de contraste de fases; también se hicieron pruebas bioquímicas: catalasa, oxidasa, sensibilidad a la cefalotina, crecimiento en glicina al 1% y a temperaturas de 37 y 42°C. Además se tiñeron con AFT y se procesaron mediante la técnica de copias al platino, a temperatura

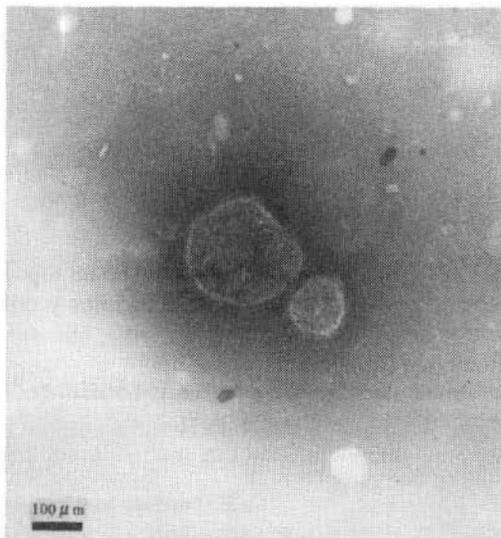


Fig. 2. Tinción negativa. Dos partículas pleomórficas, similares a coronavirus (Barra = 100 μm).

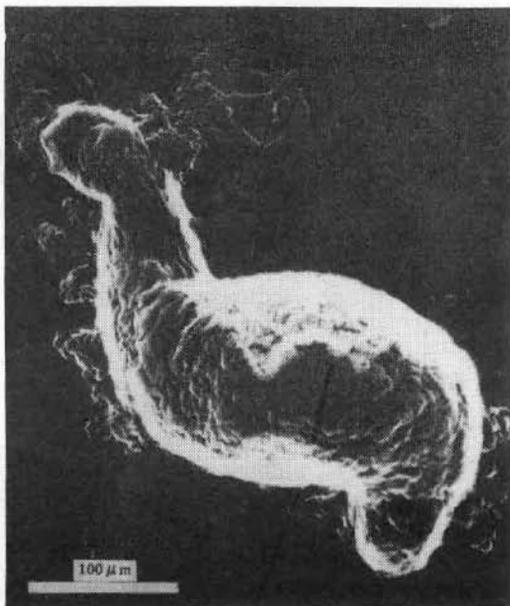


Fig. 3. Copia al platino de *Campylobacter*, se aprecia la forma curvada característica de esta bacteria y la superficie cerebriforme de su pared (Barra = 0.5 μm).

ambiente. Estas preparaciones se analizaron en un microscopio electrónico de transmisión (Hitachi Hu-12A).

RESULTADOS

En el contenido intestinal de tres de los ratones y en el de dos de las ratas analizadas se observó bacterias con movimiento "tipo dardo",

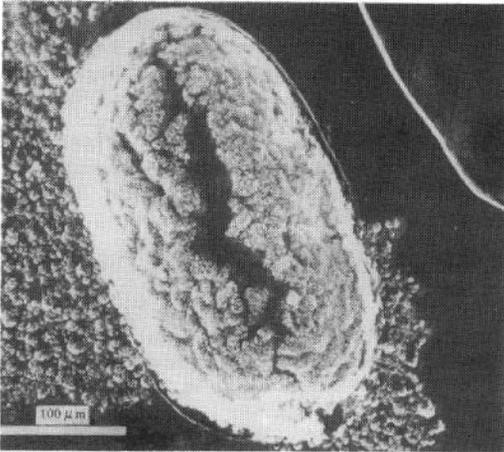


Fig. 4. Copia al platino de *Aeromonas hydrophila*. Estructura baciliforme, corta y de extremos redondeados, también su superficie muestra un aspecto cerebri-forme. (Barra = 0.5 μ m).

que vistas al microscopio electrónico, resultaron ser organismos espirilares, con fibras periplásmicas arrolladas helicoidalmente y un ramillete terminal en ambos extremos, compuesto por 8 a 11 estructuras similares a flagelos. Esta bacteria mide 3,75 a 2,50 μ m de largo y 0,55 a 0,48 μ m de diámetro (Fig. 1). También, en el contenido intestinal de una de las ratas se observó una gran cantidad de partículas virales pleomórficas, semejantes a coronavirus (Fig. 2).

En los medios de cultivo se aislaron cuatro cepas de bacterias con movimiento "tipo dardo"; dos provenían de ratones y dos de ratas. Sin embargo, al analizarlas al microscopio electrónico, se encontró que eran morfológicamente diferentes de las bacterias helicoidales descritas anteriormente. Las bacterias aisladas de los ratones eran bacilos mono o bicurvados, monotricos, bipolares, similares a *Campylobacter* sp. (Fig. 3). Las otras dos cepas correspondían a bacilos cortos, monotricos bipolares (Fig. 4). Las dos primeras cepas fueron identificadas bioquímicamente como *Campylobacter fetus* ssp. *jejuni*, y las provenientes de las ratas correspondieron a *Aeromonas hydrophila*.

DISCUSION

Las bacterias helicoidales observadas en el contenido intestinal murino no se lograron cultivar *in vitro*; sin embargo, el empleo de copias al platino, nos permitió dilucidar claramente la estructura helicoidal de esta bacteria,

que tiene de 8 a 11 fibras periplásmicas arrolladas helicoidalmente y presenta un ramillete en cada extremo, compuesto por 8 a 11 estructuras similares a flagelos, lo que le brinda una alta movilidad, cuyo desplazamiento es similar al exhibido por *Campylobacter* (Paisler et al., 1982; Hernández et al., 1984). En cuanto a la clasificación, este agente no se ha podido relacionar con *Spirillaceae* ni con *Spirochaetaeae*, pudiendo constituir una nueva familia (Phillips y Lee, 1983).

Por otra parte, *Campylobacter fetus* ssp. *jejuni* y *Aeromonas hydrophila* son bacterias incriminadas con la etiología de las diarreas en humanos. *Campylobacter fetus* ssp. *jejuni* ha sido estudiado en Costa Rica desde 1979, demostrándose que es el agente bacteriano más importante en la causalidad de las diarreas en niños menores de dos años de edad, siendo aislado con igual o mayor frecuencia que *Shigella* sp. y *Salmonella* sp. (Rivera et al., 1984). Epidemiológicamente, esta bacteria se comporta como un agente zoonótico, por cuanto es aislada de una amplia serie de animales domésticos y silvestres que pueden actuar como reservorios (Karmali y Fleming, 1979).

En contraste, *Aeromonas hydrophila* no obstante que se relacionó con la causalidad de las diarreas desde 1967 (Graevenitz y Mensch, 1968; Ljungh et al., 1977; Gracey et al., 1982, Srahmann y Willoughby, 1980), ha sido aislada en nuestro país sólo recientemente por uno de los autores (M.L.H.). Esta bacteria se aísla de seres humanos a partir de heces, sangre, exudados de heridas, úlceras y osteomielitis; también se encuentra en el suelo y agua y es patógena para animales como peces, anfibios y reptiles (Graevenitz y Mensch, 1968).

Debe prestarse atención al hallazgo de *Campylobacter fetus* ssp. *jejuni* en ratones de un bioterio destinado a investigación, pues tal colonización podría inducir inmunidad en esos animales, que podría interferir con inoculaciones experimentales o en estudios de microecología intestinal.

En el caso de *A. hydrophila*, su hallazgo se hizo en ratas silvestres, lo que indica que esos animales pueden actuar como reservorios para la infección en humanos.

RESUMEN

Se analizó la microflora intestinal de 28 ratones, criados en un bioterio y de 6 ratas

silvestres. De cada animal se extrajo el contenido intestinal y se observó al microscopio de contraste de fases y al microscopio electrónico de transmisión. También, se hicieron cultivos en agar de Butzler y agar aeromonas, que fueron incubados en microaerobiosis a 37°C, durante cinco días.

A partir del contenido intestinal de tres de los ratones y de dos de las ratas se observó bacterias helicoidales, con 8 a 11 fibras periplásmicas y ramilletes terminales de 8 a 11 estructuras similares a flagelos. También, en una de esas ratas se observó partículas similares a coronavirus. En los cultivos de dos de los ratones se aisló *Campylobacter fetus* ssp. *jejuni* y de dos de las ratas se aisló *Aeromonas hydrophila*.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos el apoyo y la financiación de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, y la colaboración del personal técnico del Laboratorio Clínico del Hospital Nacional de Niños y de la Unidad de Microscopía Electrónica.

REFERENCIAS

- Chase, D.G., & S.L. Erlandsen. 1976. Evidence for a complex life cycle and endospore formation in the attached filamentous, segmented bacterium from murine ileum. *J. Bacteriol.*, 127: 572-583.
- Davies, C.P., J.S. McAllister, & D. C. Savage. 1973. Microbial colonization of the intestinal epithelium in suckling mice. *Infect. Immun.*, 7: 666-672.
- Davies, C.P., D. Malcahy, A. Takeychi, & D. C. Savage. 1972. Location and description of spiral-shaped microorganisms in the normal rat cecum. *Infect. Immun.*, 6: 184-192.
- Davies, C. P., & D. C. Savage. 1974. Habitat, sucesion, attachment, and morphology of segmented filamentous microbes indigenous to the murine gastrointestinal tract. *Infect. Immun.*, 10: 948-956.
- Gracey, M., V. Baurke, & J. Robinson. 1982. *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Lancet*, 2: 1304-1306.
- Graevenitz, A. V., & A. Mensch. 1968. The genus *Aeromonas* in human bacteriology. Report of 30 cases and review of the literature. *N. Engl. J. Med.*, 178: 245-249.
- Hernández, F., J. Vincenti, & P. Rivera. 1984. Estudio de la movilidad y velocidad bacteriana empleando televisión en circuito cerrado. *Rev. Biol. Trop.*, 32: 309-312.
- Karmali, M. A., & P. C. Fleming, 1979. *Campylobacter* enteritis. *CMAJ.*, 120: 1525-1532.
- Ljungh, A., M. Popoff, & T. Wadstrom. 1977. *Aeromonas hydrophila* in acute diarrheal disease: detection of enterotoxin and biotyping of strains. *J. Clin. Microbiol.*, 6: 96-100.
- Paisler, J. W., S. Mirrett, B. A. Laver, M. Rose, & L. B. Reller. 1982. Dark field microscopy of human feces for presumptive diagnosis of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* enteritis. *J. Clin. Microbiol.*, 15: 61-63.
- Phillips, M., & A. Lee. 1983. Isolation and characterization of a spiral bacterium from crypts of rodent gastrointestinal tracts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45: 675-683.
- Rivera, P., F. Hernández, R. Rodríguez, & M. L. Herrera. 1983. Observaciones sobre la epidemiología de las infecciones por *Campylobacter fetus* ssp. *jejuni*. *Rev. Med. Hosp. Nal. Niños*, 18: 21-29.
- Roze, K. R., D. Cooper, K. Lam, & J. W. Costerton. 1982. Microbial flora of the mouse ileum mucous layer and epithelial surface. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43: 1451-1463.
- Savage, D.C., & R. V. H. Blumonshine. 1974. Surface-surface associations in microbial communities populating epithelial habitats in the murine gastrointestinal ecosystem: Scanning electron microscopy. *Infect. Immun.*, 10: 240-250.
- Savage, D.C., & J. S. McAllister, 1971. Cecal enlargement and microbial flora in suckling mice given antibacterial drugs. *Infect. Immun.*, 3: 342-349.
- Srahman, A. F. M., & J. M. T. Willoughby. 1980. Dysentery-like syndrome associated with *Aeromonas hydrophila*. *Brit. Med. J.*, 281: 976.
- Tzipori, S., K. W. Angus, I. Campbell, & E. W. Gray. 1980. *Cryptosporidium*: evidence for a single species genus. *Infect. Immun.*, 30: 884-886.