

ALTERACIONES MORFOLOGICAS OCURRIDAS ESPONTÁNEAMENTE EN CULTIVOS DE *CAMPYLOBACTER FETUS* SSP JEJUNI

Francisco Hernández*, Marco Luis Herrera **
Patricia Rivera**, Rosa María Rodríguez**

Key Word Index: *Campylobacter fetus* ultrastructural morphology, electron microscopy, bacterial morphological alteration

RESUMEN

Se evaluó la morfología de 28 cepas de *Campylobacter fetus ssp jejuni* en el primo aislamiento y en tres sub-cultivos sucesivos. El estudio morfológico se hizo al microscopio electrónico de rastreo y al de transmisión, mediante tinción negativa, sombreado con cromo, réplicas de platino, y cortes ultrafinos. Se encontraron dos alteraciones: la primera fue un predominio de formas alargadas policurvadas en dos primocultivos. No obstante, una de esas se normalizó hacia el segundo pasaje. La otra alteración fue la transformación a estructuras cocoides ocurrida en 4 (14%) de las muestras analizadas. Se describe la posible evolución morfológica de las formas normales a los cocoides. [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1984; 5(1): 61 - 70].

INTRODUCCION

El *Campylobacter fetus ssp jejuni* es considerado como uno de los agentes más importantes en la etiología de las diarreas, y afecta especialmente a niños menores de dos años de edad (1, 4, 7, 14). Se le incrimina con un 8 a 15 por ciento de las diarreas, lo que le da una relevancia mayor que la de shigelas y salmonelas. Puede considerarse como la bacteria más importante en este cuadro clínico (2, 16).

Como etimológicamente lo indica su nombre, *Campylobacter* es un bacilo curvado; además, es monótrico bipolar, gram negativo, oxidasa y catalasa positivo, microaerófilico y capaz de crecer a 42 °C (8, 17). En las cepas de *Campylobacter*, morfológicamente se pueden distinguir cuatro tipos de células: 1. formas cocoides, 2. formas monocurvadas o curvadas en C, 3. formas bi, tri o tetracurvadas y 4. formas filamentosas policurvadas, (11, 15).

Las formas observadas más frecuentemente son los tipos 2 y 3, pudiendo corresponder a células jóvenes y maduras respectivamente (11). Se ha informado que las formas cocoides son frecuentes en algunos cultivos viejos (14), por lo que podría tratarse de células degeneradas. Las formas filamentosas podrían deberse a alteraciones metabólicas (9) o bien a un bloqueo en la síntesis de peptidoglicanas, causado por antibióticos beta lactámicos (3, 5, 6, 13), que posiblemente el paciente haya recibido previamente a la toma de la muestra.

Para dilucidar esas interrogantes se evaluó la morfología del *Campylobacter*, en primo aislamiento y en tres subcultivos sucesivos; además, se investigó si el paciente había recibido algún tipo de tratamiento antimicrobiano en los días previos a la toma de la muestra.

* Unidad de Microscopía Electrónica (UME), Universidad de Costa Rica.

** Laboratorio Clínico, Hospital Nacional de Niños, Caja Costarricense de Seguro Social.

MATERIAL Y METODOS

Bacterias:

Se estudiaron 28 cepas de *C. fetus* ssp *jejuni*, aisladas de heces de niños con diarrea, atendidos en el Hospital Nacional de Niños, durante el primer semestre de 1983. El aislamiento de las cepas se hizo inoculando el material fecal en platos con agar de Butzler, e incubándolos en microaerobiosis a 42° C durante 24 a 48 horas, tal como fue descrito en un informe previo (10).

De cada primo cultivo, se tomaron 4 a 5 colonias y se fijaron en un mililitro de glutaraldehído al 2,5 por ciento en amortiguador de fosfatos (pH 7,2) y se dejó a 4° C durante dos horas. Luego, las bacterias se lavaron en el mismo amortiguador y se procesaron para microscopia electrónica. Además, a partir de cada primo aislamiento se inoculó una placa de agar sangre sin antibióticos, que fue incubada bajo las condiciones mencionadas anteriormente. De cada subcultivo, se fijaron de 4 a 5 colonias y se hizo un nuevo pasaje a platos de agar sangre, proceso que se repitió dos veces, de manera que por cada caso, se estudió la cepa original y tres subcultivos.

Algunas de las cepas se cultivaron también en caldo de tioglicolato, conteniendo 30 ug/ml de ampicilina, y se procesaron para microscopia electrónica.

MICROSCOPIA ELECTRONICA:

- a. **Tinción negativa:** Con cada una de las muestras fijadas se impregnaron rejillas recubiertas con membrana soporte de formvar, se tiñeron con ácido fosfotúngstico al 1 por ciento (pH 5,5) y se analizaron al microscopio electrónico de transmisión (MET) (Hitachi HU-12A).
- b. **Sombreado:** Algunas de las rejillas impregnadas con la suspensión de bacterias, se sombrearon con cromo, en un ángulo de incidencia de aproximadamente 15°, empleando un evaporador de metales (Hitachi RU-S5) y se analizaron al MET.
- c. **Réplicas metálicas:** Algunos de los especímenes se deshidrataron en una serie de alcohol etílico de 30 a 100 por ciento. Una porción de cada muestra se desecó en un secador de punto crítico (Hitachi CDP) y posteriormente se recubrieron con platino-carbón, en un ángulo de incidencia de aproximadamente 300, rotando la muestra. En este paso, las muestras se analizaron en el microscopio electrónico de rastreo (MER). Luego, la superficie sombreada con platino se recubrió con cemento plástico y la preparación se sumergió en hipoclorito de sodio (3%), para digerir la materia orgánica. Una vez digerido el espécimen, la nueva superficie expuesta se recubrió con carbón, se disolvió el plástico en acetona, de manera que las réplicas de carbón-platino-carbón se liberaron y fueron recogidas sobre rejillas para microscopia electrónica. Este método fue diseñado por el doctor Hiroshi Akahori y se ha descrito en detalle (12).
- d. **Cortes ultrafinos:** La otra porción de cada muestra deshidratada se embebió en resma (spurr) y se cortó en un ultramicrotomo (Sorval MT-28) las secciones finas (50 a 90 nm de espesor), se recogieron sobre rejillas, se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se analizaron al MET.

RESULTADOS

De las 28 cepas de *Campylobacter* estudiadas, 26 (93%) presentaron una morfología normal, o sea, que más del 90 por ciento de las células observadas en cada uno de esos especímenes, correspondía a los tipos morfológicos 2 y 3 (Fig. 1). Empero, 2 (7%) de las muestras se consideraron anormales, ya que aproximadamente un 25 por ciento de las células observadas correspondía a formas alargadas (Fig. 2). Una de esas cepas se normalizó hacia el segundo o tercer pasaje, pues el porcentaje de células alargadas disminuyó a menos del 5 por ciento. La otra cepa, aún en el tercer pasaje, conservaba una alta proporción de formas alargadas.

No obstante la alteración morfológica observada, en las cepas provenientes de esos dos casos, su historia clínica no registraba que hubiesen recibido ningún tipo de tratamiento antimicrobiano previo a la toma de la muestra. Sin embargo, los *Campylobacter* filamentosos hallados en las muestras de esas dos pacientes, son morfológicamente similares a las células observadas cuando cepas morfológicamente normales de esta bacteria, se cultivan en medios líquidos conteniendo ampicilina, como las que se muestran en la Figura 3.

Por otra parte, 4 (14%) de las cepas que habían presentado una morfología normal en el primocultivo sufrieron alteraciones hacia el segundo pasaje, transformándose una gran proporción de las células en estructuras esferoides o cocoides, como se ilustra en la Figura 4.

En las muestras con predominio de formas esferoides, fue posible observar células con una morfología intermedia entre la estructura normal y las cocoides. Según el grado de evolución de esas formas intermedias, pueden aparecer estructuras con aspecto de raqueta o de pera (Fig. 5). Además, en los cortes ultrafinos, esas formas intermedias aparentemente presentan una concentración de citoplasma en uno de sus extremos, quedando el otro extremo vacío (Fig. 6). En los cortes transversales, aparecen estructuras vacías, en las que puede identificarse la pared bacteriana, pero no aparece citoplasma; es posible que esas estructuras correspondan a los extremos vacíos de las formas intermedias.

En las réplicas de platino, se estudió la superficie externa del *Campylobacter* encontrándose que esa superficie aparece surcada por una serie de estrías profundas, que le confieren un aspecto cerebriforme. Sin embargo, en las formas filamentosas esos pliegues son inconspicuos, dándole una apariencia más lisa a la bacteria. Por otra parte, las formas cocoides presentan menos surcos, pero más profundos, además de un cráter central y un solo flagelo.

DISCUSION

Las observaciones realizadas, confirman la existencia de cuatro tipos morfológicos en *Campylobacter*. Además, se encontraron dos tipos de alteraciones que aparentemente ocurrieron espontáneamente: La primera consiste en un predominio de formas filamentosas policurvadas, morfológicamente similares a las observadas cuando las bacterias se cultivan en presencia de ampicilina. Es posible que en la génesis de esas formas filamentosas, intervengan algunas drogas antimicrobianas; sin embargo, esto no se pudo confirmar.

La segunda alteración encontrada fue la transformación de células normales a estructuras cocoides; fenómeno que ya había sido descrito en *Campylobacter* y

que se ha asociado a cultivos viejos. Aparentemente, esas células esferoides son formas degeneradas, cuya evolución se inicia con una concentración de citoplasma en uno de los extremos de la bacteria. El hecho de que las formas cocoides presenten un solo flagelo parece reforzar esta posibilidad. En la Figura 7 se muestra un esquema de la posible esferopoyesis del *Campylobacter*.

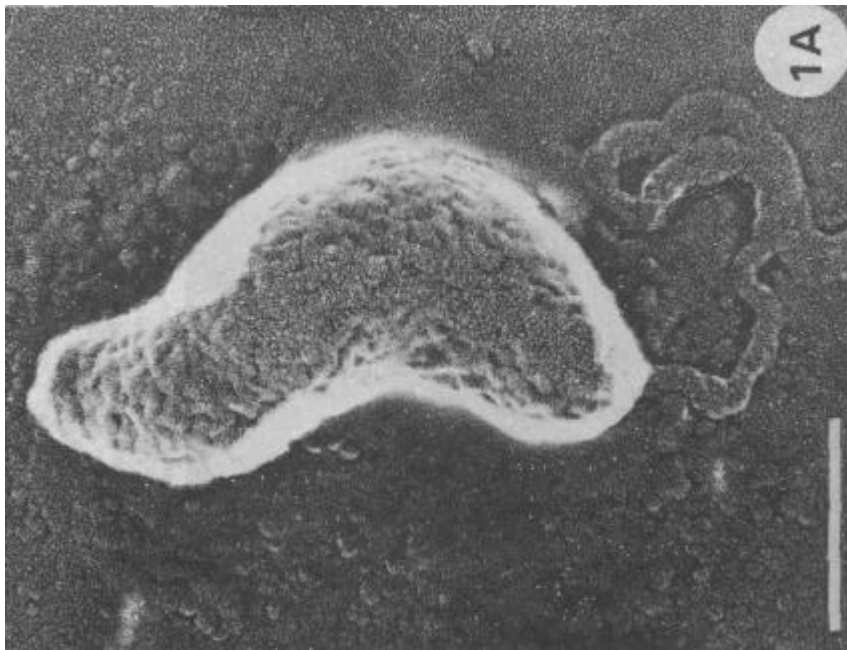
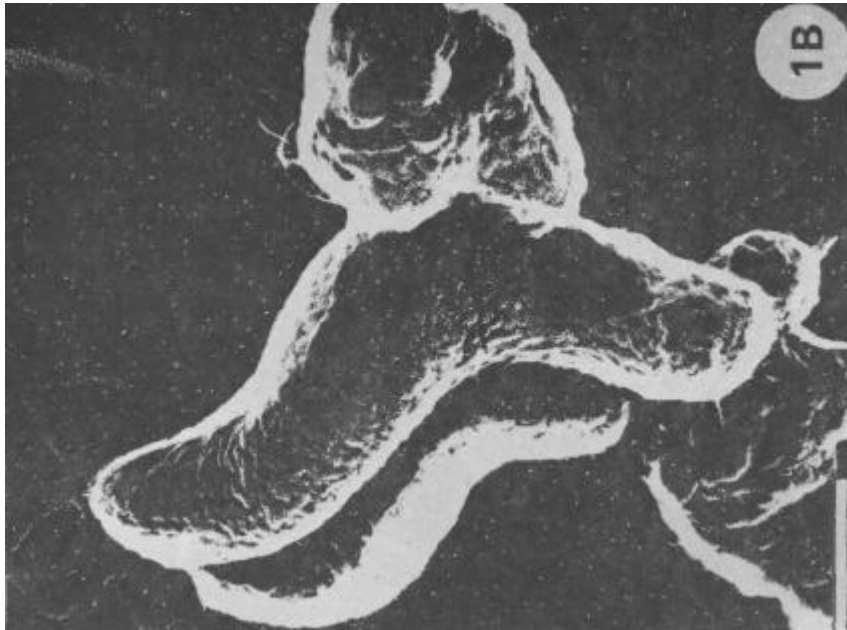
Es posible que al menos la transformación cocoide se deba a un proceso degenerativo, que podría estar asociado con el envejecimiento de la cepa cultivada in vitro, aunque también podría tratarse de una estructura de resistencia. Esto plantea una serie de interrogantes sobre la virulencia y resistencia de esas cepas cocoides, lo que debe evaluarse mediante inoculaciones experimentales en animales de laboratorio.

AGRADECIMIENTO

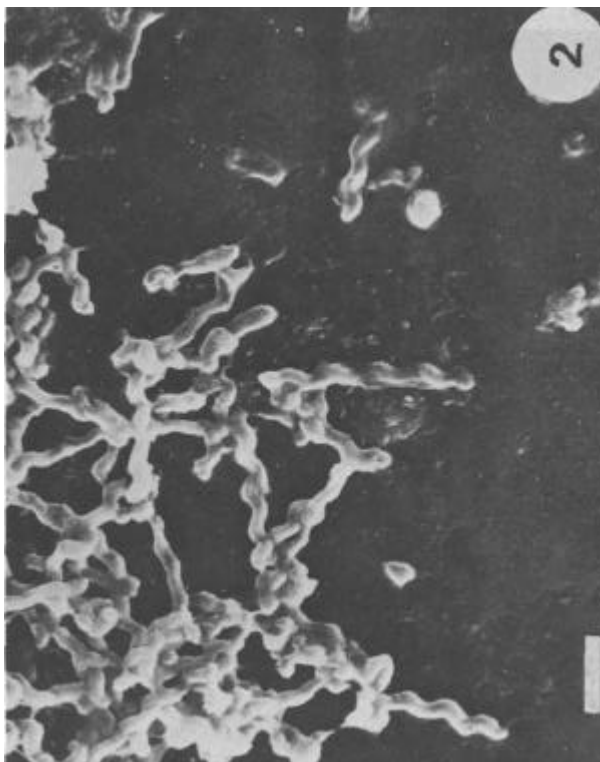
Se agradece el apoyo dado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica y la colaboración de la Unidad de Investigación del Hospital Nacional de Niños (HNN). Además, agradecemos la ayuda brindada por el personal técnico de la Unidad de Microscopia Electrónica de la Universidad de Costa Rica y del Laboratorio Clínico del HNN.

ABSTRACT

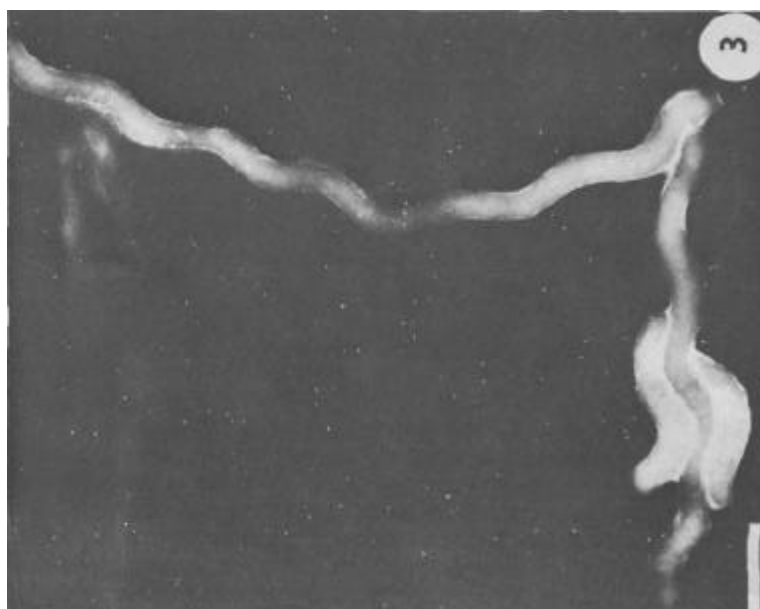
The morphology of 28 strains of Campylobacter fetus ssp jejuni was evaluated, by scanning and transmission electron microscopy, using negative staining, thin sections, chromium shadowing and platinum replicas. The study was made with the first isolate and in three sub-cultures. Two alterations were found: two strains exhibited a spiral morphology; one of these was normalized at the second culture. The other alteration consisted of coccoid forms, observed in 4 (14%) of the analyzed specimens: a possible mechanism for the coccoid alteration is described.



Microfotografías electrónicas de transmisión. Réplicas de platino de *Campylobacter* A. Forma monocurvada o en "C"
B. Forma bicurvada o en "S". (Barra = 0.5 μ m)



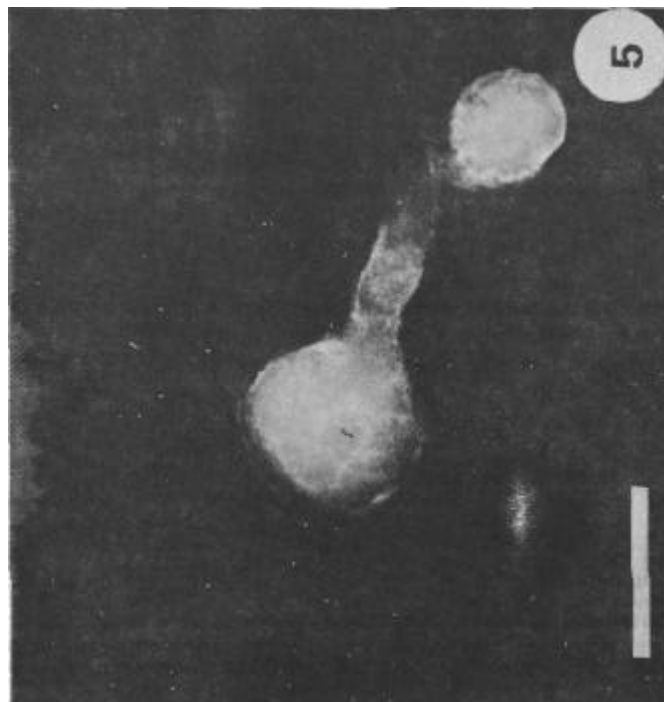
Microfotografía electrónica de rastreo. Formas alargadas o espirales de *Campylobacter*, obtenidas de un primo-aislamiento en agar de Butzler. (Barra = 2 μ m)



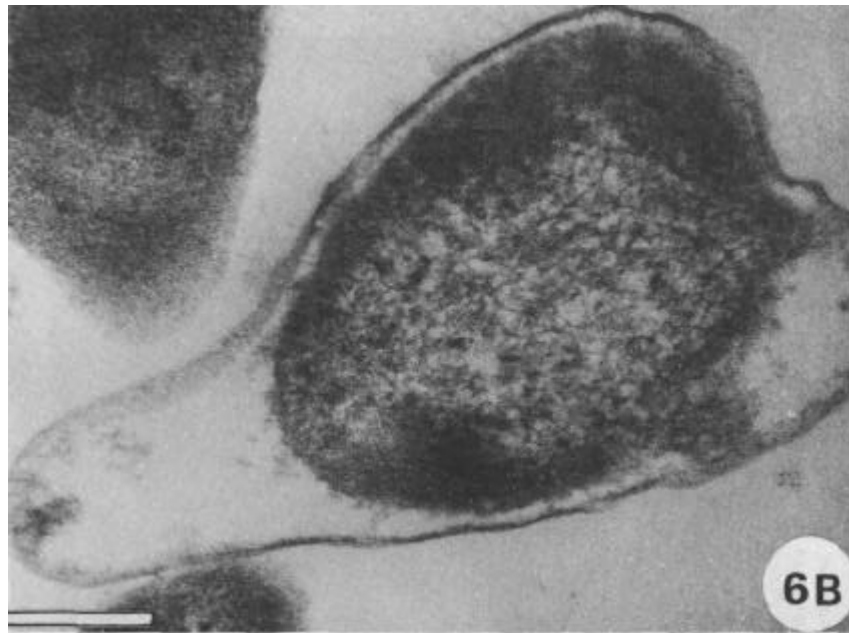
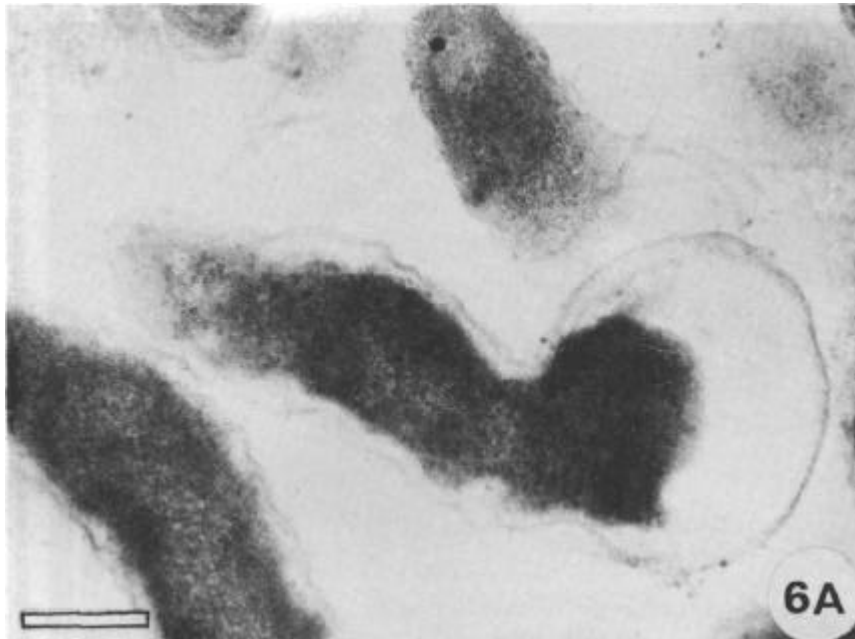
Microfotografía electrónica de transmisión. Tinción netativa de una cepa de *Campylobacter* cultivada en caldo de tioglicolato con 30 μ g/ml de ampicilina. Se observan dos bacterias filamentosas policurvadas formando una "L" invertida y dos bacterias aparentemente normales adosadas a una de las bacterias alteradas. (Barra = 1 μ m)



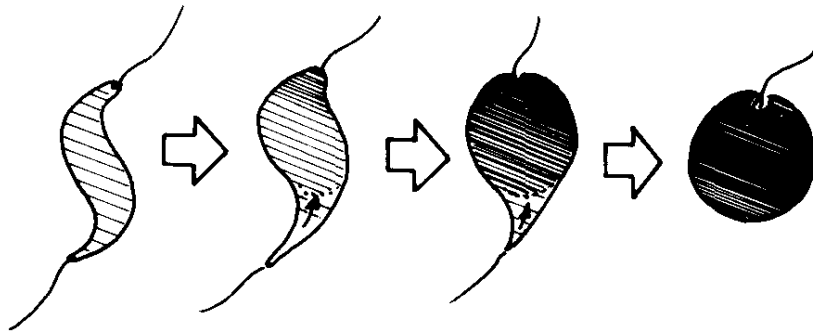
Microfotografía electrónica de transmisión. Réplica de platino de una forma cocoide de *Campylobacter*. Se observan algunos surcos profundos y un cráter central en la superficie de la bacteria; además, aparece un flagelo doblado sobre sí. (Barra = 0.5 μ m)



Microfotografía electrónica de transmisión. Tinción negativa de *Campylobacter*. Aparece una forma intermedia con aspecto de raqueta (Barra = 0.5 μ m)



Microfotografías electrónicas de transmisión. Corte ultrafino de *Campylobacter*. A. Se observa una célula con un extremo globoso hacia el cual comienza a desplazarse el citoplasma. B. Célula con aspecto periforme, con un extremo vacío, ya que el citoplasma se ha desplazado hacia el otro extremo. (Barra = 0.2 μ m)



Esquema del posible mecanismo de formación de las estructuras coccoides de *Campylobacter*
(Para más detalles ver el texto)

BIBLIOGRAFIA

1. Blaser, M.J.; Berkowitz, I.D.; La Force, F.M.; Gravens, J.; Reller, L.B. Wong, W.L.L. *Campylobacter enteritis: Clinical and epidemiologic features. Ann Int. Med.* 1979; 91:179-185.
2. Blaser, M.J. *Campylobacter fetus* sub species *jejuni*: the need for surveillance *J. Infect. Dis* 1980; 141:670-671.
3. Catlin, W. Cellular elongation under the influence of antibacterial agents: way to differentiate cocobacilli from cocci. *J. Clin. Microb.* 1975; 1:102-105.
4. Editorial. *Campylobacter enteritis. Lancet.* 1982; 2:1437-1438.
5. Lida, K.; Hirata, S.; Nakamuta, S. Koibe, M. Inhibition of cell division of *Escherichia coli* by a new synthetic penicillin, piperacillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1978; 14:257-266.
6. Lida, K.; Nakamuta, S.; Hirata, S. Koibe, M. Resumption of cell division in piperacillin-induced filaments of *Escherichia coli* B/M. *J. Antimicrob. Chemother.* 1982; 9:451-459.
7. Karmali, M.A. Fleming, P.C. *Campylobacter enteritis. CMAJ.* 1979; 120:1525-1532.
8. Hebert, G. A.; Hollis, D.C.; Weaver, R. E.; Lambert, M. A.; Blaser, M.J. y Wayne-Moss, C. 30 years of *Campylobacter*: biochemical characteristics and a biotyping proposal for *Campylobacter jejuni* *J. Clin. Microbiol.* 1982; 15:1065-1073.
9. Hernández, F. J.; Kirby, B. D. Stanley, T. M. Legionnaires' disease. *Post mortem* pathology findings of 20 cases. *Am. J. Clin. Pathol.* 1980; 73:488-495.
10. Hernández, F.; Rivera, P.; Herrera, M. L. Rodríguez, R. M. Aislamiento y diagnóstico de *Campylobacter fetus* ssp *jejuni*. *Rev. Hosp. Nal. Niños.* 1983. (En prensa).
11. Hernández, F.; Cipagauta, L.; Rivera, P.; Herrera, M. L. Rodríguez, R. M. Estudio ultraestructural de *Campylobacter fetus* ssp *jejuni*. *Rev. Latinoamer. Microbiol.* 1983. (En prensa).
12. Hernández, F. Akahori, H. Réplicas tisulares de platino: Un método estereológico. *Patología* 1983. (En prensa).
13. Moore, B. A.; Jevons, S. Brammer, K. W.. Peptidoglycan transpeptidase inhibition in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* by penicillins and cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1979; 15:513-517.

14. Retting, P. J. *Campylobacter* infections in human beings. *J. Pediatr.* 1979; 94:855-864.
15. Ritchie, A. E.; Keeker, R. F. Bryner, J. H. Anatomical features of *Vibrio fetus*: electron microscopy survey *J. Gen. Microbiol.* 1966; 43:427-438.
16. Rivera, P.; Hernández, F.; Rodríguez, R. m. Herrera, M. L. Epidemiología de las infecciones por *Campylobacter fetus* ssp *jejuni*. *Rev. Hosp. Nal. Niños.* 1983. (En prensa).
17. Skirrow, M. B. Benjamin, J. "1001" *Campylobacter*: Cultural characteristics of intestinal *Campylobacter* from men and animals. *H. Hyg. Camb.* 1980; 85:427-442.