

23
2 Glm



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**DETERMINACION DE ANTICUERPOS PARA
CAMPYLOBACTER JEJUNI POR EL
METODO DE E. L. I. S. A.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
MARTHA OFELIA CORONA DIAZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	<u>PAG.</u>
INTRODUCCION	9
OBJETIVOS	11
GENERALIDADES	12
Mecanismos de defensa intestinal	12
Antecedentes históricos	17
Características	22
Clasificación	33
Epidemiología	37
Patogénesis	41
E. L. I. S. A.	44
MATERIAL Y METODO	52
Material	52
Método	55
RESULTADOS	61
DISCUSION	81
CONCLUSIONES	86
ANEXO	88
BIBLIOGRAFIA	90

INTRODUCCION

Los padecimientos gastrointestinales ocupan el tercer lugar como causa de mortalidad entre las enfermedades oficialmente notificadas en nuestro país, aunque años atrás ocupaban el primer lugar por su frecuencia. La gran susceptibilidad de la población a estas infecciones provoca trastornos económicos y sanitarios de índole nacional e internacional.

En la República Mexicana el porcentaje de incidencia dentro de la población infantil es de un 46.2%, recordando a la vez, que la diarrea figura como la causa principal de mortalidad de uno de cada dos niños con gastroenteritis.

Campylobacter jejuni es un patógeno muy importante y se reconoce actualmente como causa de diarrea bacteriana en humanos; en ocasiones su frecuencia de aislamiento es similar o mayor que Salmonella y Shigella.

A partir de que se logró el aislamiento e identificación de Campylobacter de las heces en medios de cultivo selectivos, su importancia epidemiológica ha aumentado y en algunas partes del mundo es uno de los agentes causales más importantes en la producción de infecciones intestinales.

Gran cantidad de estudios han demostrado la patogenicidad

dad de Campylobacter jejuni.

Debido a lo anterior se han intensificado las investigaciones para determinar los mecanismos mediante los cuales causa diarrea, así como la respuesta inmune del huésped hacia este microorganismo. Los estudios sobre la respuesta inmune que se han usado son las técnicas de hemaglutinación, inmunofluorescencia directa y fijación de complemento. En todas estas pruebas se ha demostrado la presencia de anticuerpos específicos frente a Campylobacter jejuni, aunque estos estudios se ven limitados por el pequeño número de pacientes investigados, presentan una buena especificidad, pero baja sensibilidad.

Por ello nos encontramos ante la necesidad de emplear un método inmunológico que nos permita conocer más acerca de la respuesta inmune de los huéspedes hacia este microorganismo.

Se ha reportado que los pacientes con enteritis debida a Campylobacter jejuni presentan niveles detectables de anticuerpos específicos, que disminuyen lentamente a las dos semanas, como sucede con otras enfermedades infecciosas. (36)

OBJETIVOS

- 1.- Aislar e identificar las cepas de Campylobacter jejuni en -
18 niños, seguidos desde su nacimiento, así como en cada -
episodio de diarrea durante 2 años.
- 2.- Determinar la confiabilidad del método de E. L. I. S. A. -
para la detección de IgG contra Campylobacter jejuni.
- 3.- Valorar la respuesta inmune de los niños estudiados ante la
infección por Campylobacter mediante la cuantificación de -
anticuerpos IgG.
- 4.- Valorar la historia natural de la enfermedad por Campylobacter
en 18 niños desde el nacimiento hasta los 2 años de edad.

GENERALIDADES

Mecanismos de defensa intestinal:

El aparato digestivo es la primera línea de defensa - inmunitaria, pues impide el paso de microorganismos, de antígenos derivados de productos alimenticios, de toxinas, enzimas y otras sustancias presentes en la luz intestinal. En condiciones patológicas estos agentes afectan las estructuras intestinales produciendo lesiones locales o generalizadas. En tal virtud la superación de esta primera línea de defensa puede ser el inicio de cuadros clínicos con una amplia gama de manifestaciones de infección, alergia o estados de autoinmunidad.

Para mantener este delicado equilibrio, el huésped cuenta con una serie de elementos que se encargan de preservar su integridad: (58).

a) Mecanismos no inmunitarios: Se encuentran en la luz intestinal o sobre la superficie de la mucosa y tienen a su cargo controlar el crecimiento de los microorganismos presentes habitualmente en dicha luz, así como disminuir o dificultar el contacto y adherencia de los agentes patógenos a la superficie epitelial.

Flora intestinal: En el ser humano, la colonización

microbiana del intestino se inicia desde el nacimiento y es determinada por factores tales como el tipo de alimentación (materna o artificial) y la competencia microbiana. La importancia que tiene el mantener el equilibrio de esta flora se hace evidente en individuos en quienes se ha alterado ese equilibrio, o bien en animales de experimentación criados en medios libres de agentes patógenos.

En tales condiciones, la presencia de microorganismos en el intestino produce alteraciones clínicas.

Secreciones: Las glucoproteínas del moco (mucinas) y los polímeros de la saliva, impiden el contacto y la adherencia de algunos microorganismos a la superficie epitelial de la mucosa bucal. Por su parte, el aseo arrastra a los agentes patógenos impidiendo la colonización. Las glucoproteínas y los glucolípidos tienen una estructura molecular semejante a la parte superficial de las células epiteliales, por lo cual actúan como receptores de los microorganismos. Estas sustancias se encuentran a lo largo del intestino y controlan no sólo a las bacterias, sino también a los virus, toxinas y otras sustancias activas.

Barrera gástrica: La secreción de ácido clorhídrico y de pepsina en el estómago, sirven de factores limitantes para el paso de microorganismos y materiales antigénicos ingeridos.

Motilidad intestinal: Los movimientos peristálticos intestinales son el recurso más importante para controlar la proliferación bacteriana dentro del intestino, pues impiden la adherencia de los microorganismos y dificultan la absorción y fagocitosis de las macromoléculas.

Barrera hepática: El hígado adopta la función de una segunda línea de defensa. Las sustancias absorbidas de la luz intestinal pasan a la circulación portal y son depuradas por el sistema reticuloendotelial hepático, que es capaz de remover más del 30% de las toxinas y sustancias nocivas absorbidas.

Por otra parte, las sales biliares que hay en el intestino son otro medio de control de algunas bacterias, pues inhiben en cierto grado su crecimiento.

b) Factores inmunes locales. Se señala entre éstos a los coproanticuerpos que actúan como una barrera de defensa inmune local. Esto es particularmente cierto en niños alimentados con leche materna, ya que la IgA actúa como anticuerpo anti-bacteriano, directo o contra sitios antigénicos.

El equilibrio de los mecanismos de defensa intestinal se logra mediante la acción de todos los sistemas, actuando como un conjunto.

Prevaleciendo en nuestro medio condiciones sanitarias

deficientes, no es raro que las bacterias sean causa principal de la diarrea, antecediendo en importancia a los virus, parásitos y hongos.

Otra causa frecuente en nuestro medio de diarrea aguda, son las llamadas intoxicaciones alimentarias, que son imputables a la ingesta de alimentos contaminados.

A continuación se mencionan los microorganismos patógenos que más frecuentemente lesionan el tubo digestivo.

Gastroenteritis infecciosa (58)

ETIOLOGIA	AGENTE ETIOLOGICO
Bacteriana	<u>Escherichia coli</u> enterotoxigénica <u>Salmonella</u> <u>Shigella</u>
Parasitaria	<u>Entamoeba histolytica</u> <u>Giardia lamblia</u>
Viral	<u>Enterovirus</u> <u>Adenovirus</u>
Micótica	<u>Candida albicans</u>

Sin embargo, en años recientes, los nuevos agentes -

etiológicos de diarrea, más importantes para niños son:

- . Campylobacter
- . Yersinia
- . Aeromonas
- . Plesiomonas

De estos nuevos agentes bacterianos, se ha encontrado que los del género Campylobacter tienen una mayor incidencia y frecuencia en las infecciones gastrointestinales. (13, 15, 19, 46, 76).

En nuestro país, se sabe que la incidencia de esta infección por el género Campylobacter es alta; sin embargo, no se cuenta con estadísticas confiables que nos den idea exacta de la magnitud del problema. (Esto se debe fundamentalmente, a que esta enfermedad diarreica no es una enfermedad que obligadamente deba reportarse a las autoridades sanitarias, quienes son las encargadas de hacer las estadísticas nacionales).

Las diarreas causadas por el género Campylobacter se clasifican de la siguiente manera: (78, 82).

Diarrea secretora. Se presenta en el 80% de los casos, clínicamente se manifiesta por evacuaciones profusas, líquidas, no presentando ni moco, ni sangre. Si se hace una observación directa de las heces al microscopio, no se observan -

leucocitos, por lo que con estas manifestaciones se dice que se trata de un proceso no-inflamatorio causado por la intervención de una enterotoxina que actúa a través de la activación de la adenil-ciclasa en el tejido, incrementando de esta manera las concentraciones del AMP cíclico (AMP_c) intestinal y produciendo con esto la secreción de líquido. (19, 31, 36).

Diarrea invasiva. Se presenta en un 20% de los casos, clínicamente es líquida con presencia de moco, sangre y pus, es característico la presencia de leucocitos polimorfonucleares en la observación directa de las heces al microscopio, esto indica que se trata de un proceso inflamatorio el cual se produce por la destrucción de las células epiteliales del intestino al penetrar el agente patógeno. (11, 19, 31).

Antecedentes Históricos:

En 1913, Mc Faydean y Stockman (81) encontraron que un microorganismo en forma de vibrio era la causa de aborto en ovejas y ganado de la Gran Bretaña. Posteriormente en 1919, Smith y Taylor (31) realizaron un estudio de infecciones abortivas en el ganado aislando a un espirilo de fluídos fetales en aborto de bovinos, al cual se le dió el nombre de Vibrio fetus.

En 1931, Jones (81) aisló un vibrio de ganado con diarrea y lo nombró Vibrio jejuni. Después, en 1944 se aisló un vibrio del intestino de cerdos con disentería y lo llamó Vibrio coli. Estos microorganismos se caracterizaban por ser vibrios microaerofílicos, catalasa (+), mientras que algunas cepas catalasa (-) se consideraron vibrios de la flora normal y genital, como saprófitos y recibieron el nombre de Vibrio bubulus.

En 1947, Levy (46, 76) asoció por primera vez a Vibrio fetus durante la epidemia de gastroenteritis en Illinois con un episodio de diarrea en humanos. Posteriormente fueron apareciendo datos de cuadros diarreicos bastante graves en ganado, detectándose que los vibrios microaerofílicos eran los responsables de esos episodios, principalmente Vibrio fetus, ahora llamado Campylobacter (por ciertas características que se mencionan después). Posteriormente se pensó que Vibrio fetus era un microorganismo oportunista ya que se le empezó a aislar de sangre, abscesos, etc., junto con alguna enfermedad debilitante como lo es el alcoholismo, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares y neoplasias. (47).

Elizabeth King (46, 76) en 1957, señaló a 2 grupos de Vibrio fetus los cuales presentaban diferencias en cuanto a pruebas bioquímicas diferenciales, a pruebas serológicas y temperatura óptima de crecimiento.

En 1960, Florent (81) dividió a Vibrio fetus en 2 sub-

especies:

Vibrio fetus Causante de aborto en ganado.
subsp. veneralis Transmisión venérea.
 H₂S: Negativo.
 Crecimiento en 1% de glicina o
 3.5% de NaCl: Negativo.

Vibrio fetus Causante de aborto esporádico en gana-
subsp. intestinalis do.
 No se transmite en forma venérea.
 H₂S: Positivo o débilmente positivo.
 Crecimiento en 3.5% de NaCl: Negativo.
 Crecimiento en 1% de glicina: Positivo.

En 1962, se dividió a Vibrio fetus en 3 grupos: (81)

I).- Cepas que no producen H₂S. No crecen en 3.5% de NaCl o en 1% de glicina.

II).- Cepas que sí producen H₂S. No crecen en un me--
 dio salino, pero sí en un medio con 1% de glicina.

III).- Cepas que sí producen H₂S. No crecen en 3.5% de NaCl, ni en 1% de glicina.

Después se realizó un estudio acerca del crecimiento

de cepas de los vibrios microaerofílicos procedentes de humanos encontradas en pacientes con diarrea y se observó que crecían a 42°C pero no a 25°C. Posteriormente en estudios realizados tomando como base el contenido de guanina + citosina en el DNA, se obtuvieron los siguientes resultados. (81)

Vibrio fetus ----- 33-35 mol% de G + C en el DNA.

Vibrio bubulus ----- 29.5 a 30.9 mol% de G + C en el DNA.

Vibrio ----- 47.2 ± 0.7 mol% de G + C en el DNA.

En 1963, Sebald y Veron (46, 76, 81) concluyeron que con las diferencias en el contenido de guanina + citosina en el DNA y ya que Vibrio fetus no es fermentativo, Vibrio fetus y Vibrio bubulus podrían ser removidos del género Vibrio, proponiendo un nuevo género llamado Campylobacter (bacilo curvo). Campylobacter fetus fué propuesto como el representante de este género.

Campylobacter se asoció con una variedad de enfermedades veterinarias, ya que se encontraba un microorganismo semejante al vibrio en ovinos y bovinos con cuadros de infección abortiva. En los últimos años ha habido un incremento en la apreciación de enfermedades humanas debidas a Campylobacter. (81)

Como ya se ha mencionado, en 1957 King (46, 76) des--

cribe en 4 cepas humanas a una especie de vibrio, aislado de sangre e identificado como la posible causa de gastroenteritis en humanos. La designación de este microorganismo como una especie de vibrio fue hecha basándose en la similitud morfológica con Vibrio cholerae, ya que ambos son bacilos delgados, móviles, curvos, Gram (-). Sin embargo, existen diferencias en cuanto a sus características bioquímicas, de crecimiento y en el contenido de guanina + citosina en el DNA entre el vibrio verdadero y el microorganismo ahora clasificado como Campylobacter.

	Fermentación de Carbohidratos	Oxidación de Carbohidratos	G+C en el DNA	Crecimiento
<u>Campylobacter</u>	-	-	32 a 35.5 mol%	Microaerofílico.
<u>Vibrio</u>	+	+	47 mol%	Anaerobios facultativos.

En 1972, Dekeyser y col. (19, 46, 76) reportaron una técnica de filtración selectiva para suspensiones de heces, en la que se utilizaba un filtro millipore de 0.65 μ m., que retenía a la flora normal entérica y permitía el paso de los pequeños bacilos curvados.

En 1977, Skirrow (11, 46, 56, 80) definió un medio selectivo para estos microorganismos, con una técnica más simple, lo que permitió una mayor frecuencia de aislamientos en las

muestras de pacientes con gastroenteritis. La especie de vibrio de King, está ahora clasificada como Campylobacter jejuni o como Campylobacter fetus subsp. jejuni que es patógeno tanto para el hombre como para los animales.

Características :

Los microorganismos del género Campylobacter están comprendidos como bacilos pequeños Gram (-) que van desde curvos a espirales. Son móviles con un movimiento característico de sacacorcho, ésto se debe a la presencia de flagelos polares en 1 o en ambas terminales de la célula, este flagelo polar es 2 o 3 veces más largo que las células. No presenta esporas.

Los extremos de estas células son generalmente muy agudos o puntiformes, miden alrededor de 1.5 a 5 milimicras de largo y 0.2 a 0.5 milimicras de ancho. (19, 63, 64)

Con microscopía electrónica se ha observado que la membrana celular externa es de doble capa. La pared celular de Campylobacter se compone de tres capas: (81)

- a) Capa externa (lipoproteínas).
- b) Capa intermedia (lipopolisacáridos).
- c) Capa interna (mucopéptidos).

El tratamiento con tripsina, ribonucleasas y pepsina, ha permitido detectar en la pared celular la presencia de alanina, lisina, glicina y ácido diaminopimélico. Posee polisacáridos, principalmente glucosa que se encuentra en un 80%, comprobándose diferencias en cuanto a la posición y contenido de los carbohidratos en las diferentes especies de Campylobacter. (65)

Por ejemplo, los carbohidratos encontrados en la pared celular son para:

Campylobacter fetus subsp. fetus ----- galactosa y manosa.

Campylobacter fetus subsp. intestinalis --- galactosa y manosa o solamente galactosa.

Aunque pocas células contienen galactosa y ramosa.

Campylobacter jejuni ----- galactosa y glucosa o galactosa, glucosa y manosa.

Ahora bien, con lo descrito anteriormente, se puede deducir que Campylobacter fetus subsp. intestinalis y Campylobacter fetus subsp. fetus se encuentran muy relacionados entre sí, mientras que Campylobacter jejuni no. También se ha observado que Campylobacter jejuni contiene un lipopolisacárido, lo cual es una característica particular. Este lipopolisacárido presenta propiedades de una endotoxina, contiene un 53% del total de carbohidratos; 43% de hexosa; 4% de metil-pentosa; 28% de lípi-

dos; 2.2% de hexosamina; 2.1% de fósforo; 0.75% de nitrógeno; 2% de proteínas y 0.2% de ácidos nucleicos. Esta endotoxina en un medio de cultivo produce aborto en vacas cuando se inyecta intravenosamente.

Se observó que la composición de aminoácidos de los flagelos era similar para cada serotipo. Están presentes todos los aminoácidos con excepción de cisteína y prolina.

Solo los flagelos tratados con ultrasonido reaccionaron con suero antflagelar. Por métodos de absorción e inmunoprecipitación se encontraron dos antígenos comunes a y c y un antígeno distinto bb.

Los tres antígenos pueden separarse por electroforesis en gel de acrilamida. Los serotipos se clasificaron en tres grupos de acuerdo al antígeno H: el grupo 0-1 tiene antígeno H, a, c y bb; grupo 0-2 tiene antígeno H, a, c y bb₂; y el grupo 0-7 tiene antígeno H, a, c y bb₇.

Al estudiar aproximadamente 40 cepas de Campylobacter fetus procedentes de ovejas, cerdos y pájaros por pruebas bioquímicas diferenciales y electroforesis en gel de poliacrilamida, se dividieron estas cepas en tres grupos:

Grupo I. Todas las cepas de bovinos que se asociaron con infertilidad (posiblemente Campylobacter fetus subsp. fetus)

Grupo II. Cepas aisladas de heces de ovejas y aquellas asociadas con abortos esporádicos en bovinos y ovejas (Campylobacter fetus subsp. intestinalis).

Grupo III. Aislados de heces de puercos (Campylobacter jejuni). (40)

Campylobacter es un microorganismo que requiere para su desarrollo, oxígeno en un 6% el cual puede ser tomado del aire.

Crece en medios con tioglicolato o con cualquier extracto de levadura-peptona, en cultivos de primoaislamiento se pueden encontrar algunas variaciones en la morfología colonial que van desde rugosas a lisas cuyas características son las siguientes:

Colonias lisas: Miden alrededor de 0.5 a 2 mm de diámetro, con bordes enteros y adquieren una coloración tenue o translúcida, son ligeramente elevadas, algunas veces pueden presentar alfa-hemólisis en agar-sangre de carnero y otras veces no.

Colonias rugosas: Son muy difíciles de encontrar.

También se han descrito colonias mucoides y otras que presentan una especie de velo delgado de un color gris claro. (62)

Las diferentes especies de Campylobacter se pueden diferenciar por sus características bioquímicas, dentro de las cuales se incluyen la reducción de nitratos a nitritos, la producción de ácido sulfhídrico en medios de cisteína y con un indicador como el acetato de plomo. (25, 81). No hidrolizan el malonato, esculina, caseína, urea ni la gelatina. Son oxidasa positiva. Son negativas las pruebas de Voges-Proskaver y rojo de metilo. Crecen a diferentes temperaturas: 25°C, 37°C y 42°C. (25, 81).

Recientemente se realizan dos pruebas bioquímicas más para la ayuda de la identificación de Campylobacter jejuni, así como para poder diferenciarlo de Campylobacter coli. La primera es la hibridización del DNA y la segunda, que es la más simple, la hidrólisis del hipurato de sodio, la cual es positiva en un 80% para Campylobacter jejuni y completamente negativa para todas las cepas de Campylobacter coli. (1)

En la siguiente tabla, se muestran las pruebas bioquímicas diferenciales para las sub-especies de Campylobacter.

CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DEL GENERO
CAMPYLOBACTER.

	Catalasa	Red. NO ₃	Red. NO ₂	H ₂ S en TSI	H ₂ S en cistefna	Crec. en 1% de gli- cina.	Crec. en 25°C	Crec. en 42°C
<u>Campylobacter</u>								
<u>sputorum</u>								
<u>subsp. sputorum</u>	-	+	+	+	+	+	+	-
<u>subsp. dubulus</u>	-	+	+	+	+	+	v	v
<u>subsp. mucosalis</u>	-	+	+	+	+	+	v	v
<u>Campylobacter</u>								
<u>fetus</u>								
<u>subsp. fetus</u>	+	+	-	-	-	-	+	-
<u>subsp. intestinalis</u>	+	+	-	-	+	+	+	-
<u>subsp. jejuni</u>	+	+	-	+	+	+	-	+
<u>Campylobacter</u>								
<u>fecalis</u>	+	+	-	+	+	+	-	-

(81)

En 1953, Marsh y Firehammer en Bozeman, Montana, reportaron 5 serotipos de Campylobacter fetus, usando el método de aglutinación en tubo: (89) 4 serotipos de ovino y 1 serotipo de bovino. -

Se llamaron "Serotipos de Montana".

En 1958, Morgan en Gran Bretaña, usando pruebas de aglutinación dividió a Campylobacter fetus en 2 serotipos: A y B basándose en los antígenos somáticos estables al calor. Posteriormente, usando extractos de fenol de cepas de Campylobacter fetus y pruebas de fijación del complemento, se dividió a Campylobacter fetus en dos serotipos 1 y 2. Este sistema de serotipificación ahora contiene 13 serotipos de Campylobacter estables al calor. (60)

En 1971, Berg y col hicieron un estudio masivo sobre Campylobacter fetus y reportaron 5 serotipos basados en los antígenos somáticos estables al calor por medio de métodos de aglutinación en tubo y en placa, a los cuales se les llamó: Serotipo A-1, A-sub-1; A-2; B y C. (60, 89)

Haciendo una comparación de este sistema de serotipificación con los anteriores tenemos lo siguiente:

Berg y col	Morgan	Mitscherlich y Liess	Marsh y Firehammer
Serotipo A-1	Serotipo A	Serotipo 1	Serotipo III
Serotipo A-sub-1	Serotipo A	Serotipo 1	Serotipo III, V
Serotipo A-2			Serotipo V, III
Serotipo B	Serotipo B	Serotipo 2	Serotipo II
Serotipo C		Serotipo 13	Serotipo I

Berg y col, Morgan y Mitscherlich y Liess (81) usaron antígenos estables al calor, mientras que Marsh y Firehammer - (81) usaron como antígeno a la bacteria completa.

El grupo de serotipos de Berg y col, correlacionaron bien con el biotipo del sistema de Bryner y col y la clasificación en el Manual de Bergey. En la siguiente tabla se muestra una comparación de esas clasificaciones.

Berg y col	Bryner y col	Smibert	Veron y Chatelain
Serotipo A-1	Biotipo sub-1	<u>Campylobacter fetus</u> <u>subsp.</u> <u>fetus</u>	<u>Campylobacter fetus</u> <u>subsp.</u> <u>veneralis</u>
Serotipo A-sub-1	Biotipo sub-1	<u>Campylobacter fetus</u> <u>subsp.</u> <u>fetus</u>	<u>Campylobacter fetus</u> <u>subsp.</u> <u>veneralis</u>
Serotipo A-2	Biotipo 2	<u>Campylobacter fetus</u> <u>subsp.</u> <u>intestinalis</u>	<u>Campylobacter fetus</u> <u>subsp.</u> <u>fetus</u>
Serotipo B		<u>Campylobacter fetus</u> <u>subsp.</u> <u>intestinalis</u>	<u>Campylobacter fetus</u> <u>subsp.</u> <u>fetus</u>
Serotipo C		<u>Campylobacter jejuni</u>	<u>Campylobacter jejuni</u> <u>Campylobacter coli.</u> (81)

Se reportaron siete determinantes antigénicas lábiles al calor dentro de Campylobacter fetus de las cuales de 1 a 5 - pueden encontrarse en cualquier cepa.

La presencia de múltiples determinantes antigénicas - en una misma bacteria dificulta su tipificación mediante las de terminantes antigénicas lábiles al calor.

Walsh y White (91) reportaron que 18 cepas de bovinos de Campylobacter fetus subsp. fetus y Campylobacter fetus subsp. veneralis utilizando a la bacteria completa tratada con formol, se encontraban serológicamente relacionadas entre sí, mientras que cepas de Campylobacter fetus tipo 2 (una de Campylobacter fetus subsp. fetus y las otras dos representadas por Campylobacter jejuni) presentaron grandes variaciones serológicas, sin que cruzaran entre ellas, por lo que se puede decir que Campylobacter fetus subsp. fetus representa a un grupo antigénicamente más homogéneo que el de Campylobacter jejuni, se encontró también que cuatro cepas de Campylobacter sputorum subsp. bubulus no presentaban reacción cruzada con Campylobacter jejuni o Campylobacter fetus subsp. intestinalis y representaban al mínimo dos grupos serológicamente distintos. (81)

La mayor parte de estos estudios sobre las determinantes antigénicas de Campylobacter, se han llevado a cabo en cepas aisladas de animales (ovinos y bovinos). En aislamientos -

de humanos no ha sido posible este estudio tan extensamente - - como se quisiera.

Posteriormente las investigaciones se han encaminado a describir técnicas para serotipificar a Campylobacter jejuni de acuerdo a sus distintas determinantes antigénicas.

Abbot y col, (1) han utilizado el método de aglutinación en tubo con antígenos estables y lábiles al calor.

Cuando se estudió la especificidad de Campylobacter fetus en pruebas de hemaglutinación, se vió que no existía reacción cruzada con sueros contra Escherichia coli; Shigella gpos. A-D; Salmonella gpos. A-1; Streptococcus gpos. A-G; Mycoplasma hominis; Treponema pallidum y Brucella abortus. Reportes anteriores muestran que existe cierta aglutinación cruzada entre cepas de Campylobacter fetus y Brucella abortus. Sin embargo, el antígeno de Brucella abortus no aglutina con cualquier suero de Campylobacter fetus.

Penner y Hennesey y Lauwers y col, (69) mediante el método de hemaglutinación pasiva con antígenos estables al calor, encontraron 23 serotipos en una selección de 114 cepas obtenidas en humanos.

Ahora bien, se ha aislado de cepas de bovinos un poli-sacárido que es inmunológicamente activo y se denominó fracción

HS. Usando eritrocitos de carnero sensibilizados con este polisacárido HS, se vió que aglutinaban con suero de ganado infectado. Sin embargo, esta prueba no fué de mucha utilidad, ya que se probaron 21 sueros de cepas de bovinos, ovinos y humanos y con los resultados que se obtuvieron, se vió que era una prueba hemolítica y no una prueba de aglutinación. Después, usando el polisacárido HS de una cepa mediante la prueba de difusión en agar, se probaron 16 cepas de Campylobacter aisladas de bovinos, ovinos y humanos y los resultados indicaron que no todos los sueros reaccionaban con el antígeno HS de una sola cepa. Por lo tanto, el antígeno HS no era una simple entidad antigénica que se encontraba distribuida en todas las cepas de Campylobacter fetus. Sin embargo, cuando se mezcló el antígeno HS de 2 cepas se vió que todos los sueros de Campylobacter fetus daban líneas de precipitados en el agar de las pruebas de inmunodifusión contra las 16 cepas.

Lior y col, (60) utilizando aglutinación en placa con bacterias vivas, y Últimamente Hebert (41) y col, desarrollando el método de detección de anticuerpos por inmunofluorescencia directa, han identificado y serotipificado a Campylobacter jejuni encontrando 10 serogrupos.

A pesar de la serie de estudios que se han realizado en cuanto a la composición antigénica de Campylobacter y a los diferentes métodos inmunológicos establecidos para su serotipi-

ficación, aún no se han podido encontrar las determinantes antigénicas que resultarían ser tipo específicas, permitiendo conocer más acerca de la composición de Campylobacter y estandarizando un método inmunológico para ser aplicado como diagnóstico en el laboratorio.

Clasificación

Con todos estos datos, actualmente la clasificación aceptada para Campylobacter es la que se basa en los datos de Skerman y col, (14) colocando a este microorganismo en dos grupos, basándose en la capacidad para producir catalasa.

1.- Catalasa (-) :

Este grupo de microorganismos están representados por Campylobacter sputorum, los cuales se aislaron de órganos reproductivos de ganado y se consideraron como patógenos. Se denominaron como Vibrio sputorum por Prevot y se vió que eran similares al microorganismo aislado de esputo en 1914 por Tunnicliff. De Campylobacter sputorum existen descritas hasta la fecha tres sub-especies.

- a) Campylobacter sputorum subsp. sputorum.
- b) Campylobacter sputorum subsp. bubulus.

c) Campylobacter sputorum subsp. mucosalis.

Campylobacter sputorum subsp. sputorum y Campylobacter sputorum subsp. bubulus, se ha visto que son muy similares. Ambos microorganismos no utilizan a los carbohidratos y son indol, lipasa, gelatina, ureasa y acetyl-metil-carbinol negativos.

La tercera sub-especie de Campylobacter sputorum, está representada por microorganismos microaerofilicos no fermentativos, que se aislaron de la mucosa intestinal de casos de adenomastosis intestinal de porcinos, enteritis necrótica, ileftis regional y enteropatía proliferativa hemorrágica.

II.- Catalasa (+) :

Este grupo está constituido por las especies:

Campylobacter fetus, el cual a su vez se divide en dos sub-especies:

a) Campylobacter fetus subsp. fetus.

b) Campylobacter fetus subsp. veneralis.

a) Campylobacter fetus subsp. fetus parece ser el responsable del aborto enzoótico y de la infertilidad infecciosa - de bovinos y ovinos; se han presentado casos de enfermedad sistémica en el hombre.

b) Campylobacter fetus subsp. veneralis causa aborto en ganado ovino y bovino, siendo su transmisión por vía venérea.

Campylobacter jejuni. Se considera como el agente - causal de la infección abortiva en ovinos y bovinos, disentería en cerdos, hepatitis en aves, enteritis en pavos y recientemente como el causante de infecciones gastrointestinales en el hombre.

Campylobacter fecalis. Se aisló de heces de ovejas y del semen y la vagina de bovinos, es un microorganismo microaerofílico. No se ha descrito asociación con el hombre.

Campylobacter coli. Agente etiológico del aborto en bovinos y ovinos, de la disentería de los cerdos y actualmente se le reconoce como el responsable de gastroenteritis en el hombre.

Campylobacter presenta alguna semejanza con Spirillum volutans, sin embargo, muchas características no son las mismas, al igual que con Spirillum minor, causante de la fiebre por mordedura de la rata. (91)

(En la siguiente tabla se resumen los diferentes sinónimos de diversos autores para la clasificación de Campylobacter).

CLASIFICACION TAXONOMICA DEL GENERO

CAMPYLOBACTER

Manual de Bergey Veron y Chatelain

King

Florent ó
Jones

I.- <u>Campylobacter fetus</u>	<u>Campylobacter fetus</u>	<u>Vibrio fetus</u>	<u>Vibrio fetus</u>
<u>subsp. fetus</u>	<u>subsp. veneralis.</u>		<u>subsp. veneralis</u>
	<u>Campylobacter fetus</u>		
	<u>subsp. veneralis bio</u>		
	tipo intermedio.		
<u>Campylobacter fetus</u>	<u>Campylobacter fetus</u>	<u>Vibrio fetus</u>	<u>Vibrio fetus</u>
<u>subsp. intestinalis</u>	<u>subsp. fetus</u>		<u>subsp. intestinalis</u>
<u>Campylobacter fetus</u>	<u>Campylobacter jejuni</u>	<u>Vibrios</u>	<u>Vibrio jejuni</u>
<u>subsp. jejuni.</u>	<u>Campylobacter coli.</u>	relacionados	
II.- <u>Campylobacter</u>	<u>Campylobacter</u>	<u>Vibrio</u>	
<u>sputorum subsp.</u>	<u>sputorum</u>	<u>sputorum</u>	
<u>sputorum.</u>			-----
<u>Campylobacter</u>	<u>Campylobacter</u>	<u>Vibrio</u>	
<u>sputorum subsp.</u>	<u>bubulus.</u>	<u>bubulus.</u>	
<u>bubulus.</u>			-----
III.- <u>Campylobacter</u>			
<u>fecalis</u>	-----	-----	-----

Epidemiología:

El primer caso reportado en humanos de infección por Campylobacter fué en 1913 por Curtis, (81) quien observó un gran número de bacilos curvos, móviles, Gram (-) en la descarga vaginal de dos pacientes. Sin embargo, no fué hasta 1947 en que se reportaron los primeros casos provenientes de humanos. Vinzent y col, describieron a una mujer de 39 años de edad en el sexto mes de embarazo, quien tuvo una enfermedad de gripe, con fiebre y cefalea, se le aisló Vibrio fetus de dos hemocultivos. Desde entonces, se han reportado cerca de 100 ejemplos de enfermedades septicémicas y otras no entéricas causadas por Campylobacter. Sin embargo, aún la enteritis por Campylobacter jejuni tiene muchos puntos oscuros ya que es muy compleja.

Un análisis de 102 casos reportados de infecciones humanas no entéricas, revelaron que el 69% de los casos ocurrieron en varones. La edad promedio de los pacientes fue de 53 años oscilando entre 35 y 70 años. Muchos de estos pacientes habían presentado los siguientes padecimientos: alcoholismo o cirrosis (17 pacientes); diabetes mellitus; leucemia y otras enfermedades linfoproliferativas; esplenectomía; terapia con esteroides e inmunosupresores y tuberculosis; 24 de estos pacientes tuvieron contacto con animales de granja y 5 de ellos eran carniceros. En algunos casos, los pacientes ingirieron carne cruda o leche sin

pasteurizar. Por lo que nos damos cuenta que los reservorios - para Campylobacter son muchos, siendo todos ellos una forma de transmisión para el hombre. (19, 31, 46, 76, 80).

Campylobacter fetus es la causa de una enfermedad infecciosa enzootica del ganado, dando como resultado abortos y - problemas reproductivos, caracterizados por la incapacidad de - las vacas y terneras para preñarse. El habitat natural para - Campylobacter fetus es la mucosa del pene y la porción distal - de la uretra del toro.

La enfermedad se transmite durante el acto sexual, - por lo tanto se considera como una transmisión venérea. En las terneras y vacas, los sitios de infección son el lumen de la va - gina, cérvix y útero. (19, 31, 46).

En las aves, anteriormente se había reportado el ais - lamiento de Campylobacter y lo relacionaron con hepatitis infec - ciosa. En gallinas se han reportado cepas de Campylobacter si - milares a las aisladas de humanos. De estos animales, incluyen - do a pollos, pavos y algunas otras aves silvestres se ha aisla - do a Campylobacter de las heces en un 30%. Sin embargo Bruce, - Zochowski y Ferguson aislaron a Campylobacter jejuni en un 68% de las heces de las aves aparentemente sanas. (8, 19, 31, 46).

En cuanto al ganado porcino, se encontró que - Campylobacter jejuni es habitual en la flora intestinal de los

lechones. También se ha encontrado que causa enteritis en perros. (10)

Ahora bien, la enfermedad en ovejas es diferente de la enfermedad venérea en ganado, ya que se desarrolla primero bacteremia, antes de la localización del microorganismo en la placenta.

La transmisión de Campylobacter jejuni se considera por vía orofecal, ya sea a través de agua o de alimentos contaminados; teniendo contacto directo con la materia fecal de los animales o con personas infectadas. (19, 45, 46, 67, 70, 78, 86)

Enseguida se resumen las diferentes vías de transmisión:

a) De persona a persona. Se presenta principalmente en los niños que han tenido contacto con personas a las cuales se les ha aislado Campylobacter (19, 46).

b) De animales a personas. Las más expuestas son aquellas personas que tienen un mayor contacto con aquellos animales que excretan Campylobacter por las heces, como son carniceros, veterinarios, etc. (12, 19, 31, 46)

c) A partir de agua. Esta forma de transmisión se vio en 1980 en Suecia en donde se aisló Campylobacter del agua durante una epidemia. Se piensa que se trató de una contamina-

ción de origen fecal ya sea animal o humano. Lo que sí se ha observado es que este microorganismo puede permanecer en el agua durante un mes a temperaturas de 4°C. (19, 31, 67)

d) A partir de alimentos contaminados. Se ha visto que es principalmente la leche no pasteurizada o que está contaminada fecalmente, producto en el que Campylobacter puede vivir durante tres semanas a 4°C. No se ha podido lograr que el microorganismo se multiplique en la leche por métodos artificiales, por lo que no se conoce muy bien la manera por la cual la contamina. (19, 31, 86)

e) Por vía venérea. Como sucede en los animales, principalmente por Campylobacter fetus que es el agente causal del aborto enzoótico y de problemas de infertilidad en el ganado, por ejemplo: Un toro asintomático puede transmitir venéreamente el agente a las vacas quienes subsecuentemente desarrollan endometritis, la cual es la responsable del aborto espontáneo e incapacidad temporal para concebir. (45, 70)

f) Transmisión vertical de la madre al niño. Aquí la infección ocurre durante el nacimiento en el momento del parto. (45, 70)

g) Por vía transfusional. Se han reportado algunos casos en individuos sanos que han sido transfundidos con sangre obtenida de pacientes a los cuales se les había aislado

Campylobacter. (70)

En cuanto a la distribución geográfica, se ha visto - que se encuentra distribuido por todo el mundo, principalmente en países sub-desarrollados ya que el porcentaje de aislamiento ha sido muy alto, varía entre un 30 a 40% por diferentes estudios realizados por Bokkenhauser y Blaser (16, 17). Presenta - una mayor incidencia durante el mes de junio ya que la infección se presenta principalmente durante la época más cálida del año. (11, 19, 46, 76)

Con todos estos datos, se observa la importancia clínica de Campylobacter jejuni, que es semejante a la de Salmonella, Shigella y Yersinia, en las que la infección comienza en el - tracto gastrointestinal. •

Patogénesis:

La patogénesis de una campylobacteriosis sistémica - aún no se encuentra bien clara, pero a continuación se mencionan algunos datos que indican a Campylobacter jejuni como el - agente causal.

Campylobacter jejuni se ha aislado de las heces y san - gre de pacientes con enteritis.

Existe correlación importante entre la presencia de Campylobacter jejuni en las heces y las manifestaciones clínicas, aunque este microorganismo se ha aislado en un 1% en personas asintomáticas. (46, 79).

La infección gastrointestinal se ha postulado como una predisposición a la enfermedad sistémica.

La transmisión venérea en humanos se ha propuesto como una analogía del modelo bovino, pero la confirmación de esta hipótesis aún no está bien determinada.

Campylobacter jejuni puede producir la enfermedad por diferentes mecanismos.

1.- Invasividad. La presencia de sangre y leucocitos en las heces de humanos, la congestión, edema, lesiones ulcerativas de la mucosa en el examen recto-sigmoidoscópico y, en ocasiones, sepsis, sugieren que el microorganismo después de ser ingerido pasa a través de la mucosa produciendo una reacción inflamatoria, encontrándose después en el torrente sanguíneo. (11, 19, 31, 80)

2.- Producción de enterotoxinas. Campylobacter jejuni causa también una diarrea secretora producida por enterotoxinas que actúan sobre los receptores intestinales estimulando la producción del AMP cíclico (AMPC) cuya acción principal es estimu-

lar la secreción de electrolitos (Cl^- y HCO_3^-). (19, 31, 36)

Cuadro Clínico :

Las infecciones por Campylobacter jejuni en humanos - no siempre producen síntomas.

La severidad de la enfermedad puede ser variable; ya que la enteritis por Campylobacter es una infección autolimitada que se caracteriza por la presencia de diarrea aguda de pocos días de duración o en otras ocasiones como una enfermedad severa. (11, 19)

El período de incubación es de 2 a 11 días con un rango de 1 a 5 días, en la mayoría de los casos, en los pacientes con diarrea continúa un período febril con temperaturas que oscilan entre 38°C y 40°C . Existe malestar general, cefalea, dolor abdominal y muscular. El frío por las noches es característico, así como una pérdida de peso en una enfermedad prolongada. Alteraciones a nivel del sistema nervioso central como confusión y letargia. Puede existir además hepatoesplenomegalia pero no ictericia.

En algunos casos se puede presentar una bacteremia - asintomática la cual desaparece sin terapia antimicrobiana, pero otras veces puede ocurrir una sepsis fatal fulminante por una prolongada bacilemia, que persiste a lo largo de 8 a 13 se-

manas con síntomas aumentados.

Algunos autores han reportado casos de meningitis en niños, endocarditis, neumonías, abscesos pulmonares, tromboflebitis, peritonitis, antritis séptica, etc. (36, 46, 55, 76, - 86)

Ensayo Inmunoenzimático E. L. I. S. A. (Enzyme Linked - Immunosorbent Assay).

Uno de los métodos inmunológicos más utilizados actualmente es el de E.L.I.S.A. el cual también se ha aplicado para la determinación de anticuerpos IgG contra Campylobacter jejuni, ya que se ha demostrado que es un método muy sensible, además de ser económico y con resultados confiables. (42, 93)

El ensayo inmunoenzimático se ha ido desarrollando para la detección confiable de algunos antígenos microbianos importantes en los fluidos del cuerpo, incluyendo antígenos de rotavirus, virus de la hepatitis B y Haemophilus influenzae tipo b. (93)

Sin embargo, las técnicas del ensayo inmunoenzimático estándares no son lo suficientemente sensibles para la cuantificación de otros antígenos y de otros virus, bacterias y parási-

tos en las concentraciones en que comúnmente se presentan en los fluidos del cuerpo durante el curso de una enfermedad infecciosa. (26, 42)

Tradicionalmente, las enfermedades infecciosas se han diagnosticado por el cultivo del agente responsable en un sistema in vitro o en animales. Pero existen un gran número de limitaciones como por ejemplo el que algunos agentes virales que causen enfermedades importantes no pueden ser cultivados en un sistema de tejidos o de animales. Ahora bien, otros agentes infecciosos que pueden ser cultivados, requieren de un largo período antes de su identificación. En algunos casos este período es tan largo que los resultados no son útiles en el manejo de una enfermedad. Campylobacter se debe incubar por 48 horas bajo condiciones de tensión de oxígeno reducida, por lo que se necesita esperar que transcurra este tiempo y así poderlo identificar.

Por estas razones ha sido de gran interés el desarrollo de ensayos capaces de detectar agentes infecciosos directamente de muestras clínicas. Muchos de estos ensayos se basan en el hecho de que los agentes infecciosos pueden identificarse por una reacción específica antígeno-anticuerpo.

El ensayo inmunoenzimático ha adquirido gran importancia en la detección directa de antígenos microbianos en los

fluidos del cuerpo. (93)

Entre las ventajas del ensayo inmunoenzimático se tiene su alto grado de sensibilidad y especificidad, además de que no implica riesgos a la salud ya que los reactivos utilizados son inocuos.

Fundamento:

Se basa en la inmovilización de anticuerpos o antígenos solubles unidos a una superficie sólida insoluble, con el fin de capturar al antígeno o anticuerpo presente en la solución problema y así poder detectar el complejo inmunológico por medio de un anticuerpo o antígeno marcado con una enzima. Finalmente, se revela el sistema con la adición del sustrato específico, produciéndose una coloración debida a la hidrólisis del sustrato, que es proporcional a la cantidad de antígeno o anticuerpo presente en la solución problema. (3, 4, 5, 6, 7)

Sensibilización:

Es la unión del antígeno o del anticuerpo a la fase sólida uniéndose covalentemente a ciertos materiales como celulosa, poliestireno o polivinilo. El antígeno o anticuerpo usado debe tener un alto grado de pureza y así hay mayor especificidad en el método ya que si se usa un antígeno o anticuerpo crudo, los resultados no son confiables, puesto que son altamen

te inespecíficos. La sensibilización se lleva a cabo por absorción pasiva con soluciones alcalinas conteniendo 1 a 10 micro--gramos/mililitro de proteína, incubándose a 4°C o a la temperatura óptima que se requiera, por lo tanto sería de 4°C a 37°C - por espacio de 4 a 24 horas. Se disuelve la proteína en una solución amortiguadora de carbonato - bicarbonato pH = 9.6 (3,4)

Factores que intervienen en la técnica:

a) Fases sólidas:

Los materiales varían pudiendo ser celulosa, poliacrilimida, dextranas y plásticos tales como polivinilo, poliestireno o polipropileno. Usando placas de microtitulación de inmún como fase sólida pueden obtenerse magníficos resultados, ya que permiten trabajar a gran escala usando una mínima cantidad de reactivos. (6)

b) Conjugados:

Para llevar a cabo un acoplamiento enzima-proteína, se busca el uso de sustancias que tengan grupos reactivos capaces de dar enlaces cruzados entre la enzima y el reactivo a conjugar. Se han descrito los siguientes agentes: (5, 93)

- 1.- 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenilsulfona.
- 2.- Toluen-2,4-disocianato.
- 3.- Cloruro de cianógeno.

- 4.- Bis-diazobencidina.
- 5.- N,N'-o-fenilendiamina.
- 6.- Carbodiimida.
- 7.- Periodato de sodio.
- 8.- Glutaraldehído.
- 9.- Parabenzoquinona. (5)

Una reacción de acoplamiento ideal, debe rendir un 100% de conjugado, cuya composición debe ser una molécula de enzima por una de proteína, en la cual se conserva la actividad enzimática e inmunológica. Es evidente que ninguna de las reacciones anteriores reúnen estos requisitos, por lo tanto se elige aquel procedimiento que da mayores ventajas.

c) Enzimas:

Las enzimas que se usan deben reunir las siguientes características: (93)

- 1.- Una actividad específica y alta.
- 2.- Estabilidad relativa a temperatura ambiente.
- 3.- Que no se presente una pérdida considerable de actividad después del acoplamiento.
- 4.- Que se encuentre disponible en el mercado, en un alto grado de pureza.
- 5.- Utilización del sustrato con gran rapidez.

Las enzimas más usadas son: fosfatasa alcalina, β - D galactosidasa, peroxidasa y glucosa oxidasa.

También se debe mencionar que el sustrato usado debe ser soluble en un medio acuoso, como por ejemplo la fosfatasa - alcalina, que aunque no es tan barata es fácil de conseguir, el sustrato específico para esta enzima es el paranitrofenilfosfato, que es soluble en agua y da como producto de hidrólisis el p-nitrofenol, el cual también es altamente soluble en medio acuoso. (7)

Existen dos métodos de conjugación: (5)

- a) Procedimiento de un paso.
- b) Procedimiento de dos pasos.

El primero consiste en la reacción del anticuerpo con la enzima mediante un agente acoplante que produce un enlace covalente, teniendo de esta manera el conjugado. (4)

El segundo método consiste en activar a la enzima mediante un agente acoplante, después se pone en contacto el anticuerpo que va a unirse por su fracción cristalizable con la enzima activada. Este método es más homogéneo y presenta un rendimiento que va del 50 al 75%. (6, 7)

d) Anticuerpos:

En los ensayos inmunoenzimáticos, se obtienen mejores

resultados usando anticuerpos que provienen de un suero hiperinmune, porque éstos presentan una gran actividad. No se debe - conjugar al suero completo, ya que pueden obtenerse reacciones inespecíficas, para evitarlas se deben separar las gamma-globulinas del suero y después conjugarlas con la enzima correspondiente; se obtienen todavía mejores resultados si además se separan las diferentes clases de inmunoglobulinas y posteriormente se les acopla la enzima. (5)

e) Lavados:

Se necesitan lavados después de las diferentes incubaciones, este procedimiento consiste en llenar los pozos de la - placa de microtitulación con una solución amortiguadora que con - tenga un agente tensoactivo como el monolaurato de sorbitan - - Tween 20, este paso debe repetirse al menos tres veces, con lo que se eliminan al máximo las reacciones inespecíficas. (7)

El método de E.L.I.S.A. puede ser de dos tipos:

- 1.- E.L.I.S.A. para la detección de antígeno.
- 2.- E.L.I.S.A. para la detección de anticuerpo.

El primero se subdivide en dos:

a) Método del doble sandwich.- Se hace una curva es--
tándar con cantidades conocidas de antígeno (determinación cuan

titativa del antígeno probado).

b) Método competitivo.- La muestra compete con un antígeno marcado para unirse al anticuerpo absorbido. La concentración de antígeno en la muestra problema es inversamente proporcional a la cantidad de actividad enzimática presente al final del ensayo, y puede determinarse cuantitativamente usando cantidades conocidas de antígeno para la curva estándar.

El segundo método también se divide en dos tipos:

a) Método indirecto.- La cantidad de anticuerpo específico presente en la muestra, es proporcional a la cantidad de actividad enzimática. Los resultados se expresan cualitativa y cuantitativamente.

b) Método indirecto enzima-antienzima.- La cantidad de anticuerpo presente es directamente proporcional a la cantidad de hidrólisis. Sus resultados se expresan según el método anterior, pero este método no puede utilizarse en humanos, ya que no es posible obtener una antienzima humana. (79)

MATERIAL Y METODO

Material Biológico

Se colectaron heces de 18 niños (14 con diarrea y 4 - controles), desde su nacimiento así como a los 3, 6, 12, 18 y - 24 meses de edad y durante las fases agudas y convalecientes de cada episodio de diarrea por un período de 2 años.

También se colectaron sueros de estos niños al nacimiento, a los 3, 6, 12, 18 y 24 meses de edad.

Albúmina sérica bovina libre de gamma-globulinas (Sigma)
 Anti IgG humana
 Conjugado (Fosfatasa alcalina + Anti IgG humana
 en conejo) (Sigma)

Material de vidrio y equipo:

Agitador magnético
 Agitador Vortex (Corning)
 Baño María a una temperatura de 92°C
 Celdas de cuarzo de 250 mg/ml. (Gilford)
 Centrífuga refrigerada (Sorvall RC-5B)
 Espectrofotómetro 250 (Gilford)

Estufa a 42°C	(Thelco)
Jarras anaeróbicas.	(BBL)
Matraces Erlenmeyer.	(Pyrex)
Matraces volumétricos	(Pyrex)
Micropipeta manual de 50 μ l.	(Oxford)
Micropipeta manual de 200 μ l.	(Oxford)
Micropipeta manual de 1 ml.	(Oxford)
Micropipeta manual multicanal 200 μ l.	(Dynatech)
Pipetas Pasteur	(Intramedic. S.A.)
Pipetas serológicas	(IVA)
Placas de microtitulación (Inmulón II)	(Dynatech)
Selladores de plástico para placas de microtitulación	(Dynatech)
Sobres de Gas-Pak de 4%.	(BBL)
Tubos de ensayo de 16 x 150 mm con tapón de hule	(Pyrex)
Vasos de precipitados	(Pyrex)

Medios:

Medio Campy-Bap

Agar Brucella + 5% de sangre de carnero + antibióticos	(Difco-B964)
Agar Citrato de Simmons	(Difco-B91)
Agar de TSI (Triple Azúcar e Hierro)	(Difco-B265)
Agar Fenil Alanina	(Difco-B745)

Agar Lisina-Hierro	(Difco-B849)
Caldo base de ornitina	(BBL)
Caldo base rojo de fenol-manitol	(Difco-B097)
Caldo Brucella	(Difco-B495)
Medio SIM	(Difco-B271)

Reactivos

Agua deionizada	
Acido fosfórico	(Merck)
Equipo de Gram:	
Cristal violeta	(Merck)
Lugol	(Sigma)
Alcohol-Acetona	(Drogas Tacuba, S.A.)
Safranina	(Sigma)
Etanol	(Merck)
Formaldehído al 0.5%	(Merck)
Glutaraldehído	
N-N-dimetil-p-fenilendiamina	(Sigma)
Pastillas de p-nitrofenilfosfato de 5 mg, cada una	(Sigma)
Peróxido de hidrógeno	(Drogas Tacuba, S.A.)

Soluciones

Solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato 0.05 M PH = 9.6	(Merck)
Solución amortiguadora de dietanolamina 0.05 M PH = 9.8	(Sigma)
Solución amortiguadora de fosfatos (PBS-Tween 20) 0.05 M PH = 7.4	(Sigma)
Solución amortiguadora de glicina - HCl 0.05 M PH = 2.5	(Sigma)
Solución amortiguadora Tris-HCl 0.01 M PH = 8.0	(Sigma)
Solución de hidróxido de sodio (3 M)	(Merck)
Solución salina al 0.85% PH = 6.8	

Método

Una vez que Campylobacter se aisló a partir de las heces, se almacenó en un medio de caldo Brucella + 0.16% de agar, adicionado de sangre de carnero y una solución de antibióticos a una temperatura de -70°C.

Cuando se obtuvieron todas las muestras hasta el final de los dos años que duró la recolección, se sembraron en medio de Campy-Bap durante 48 hrs. a una temperatura de 42°C y -

con una atmósfera de 5% de oxígeno + 8 a 10% de dióxido de carbono. Se volvieron a realizar sus pruebas bioquímicas como son: producción de catalasa; producción de oxidasa; reducción de nitratos a nitritos; crecimiento en glicina al 1%; crecimiento en cloruro de sodio al 3.5%; crecimiento en sales biliares al 1% y producción de ácido sulfhídrico en TSI.

Obtención del antígeno. De la cepa ya identificada - con crecimiento de 48 horas, se hace una suspensión con solución salina pH = 7.4, se agrega formaldehído al 0.5% y posteriormente se agita en vortex. Después se coloca en baño María (aproximadamente a una temperatura de 92°C) durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo se hacen dos lavados con solución salina isotónica estéril en centrifuga refrigerada a 4,000 r.p.m. por 10 minutos. Al final se decanta el sobrenadante y se resuspende con solución salina isotónica estéril.

De esta manera se obtiene el antígeno estable al calor, al cual se le determina la concentración de proteínas por el método de Bio-Rad, llevándose a una concentración final de 10 g/ml de proteína.

Conjugado. Se prepara por el procedimiento de dos pasos utilizando glutaraldehído, fosfatasa alcalina de intestino de ternera y anti-gamma-globulina humana del tipo IgG de fuente comercial.

La inmunoglobulina se reconstituye en solución salina al 0.85% y pH = 6.8, se dializa a 4°C durante toda la noche y se determina concentración de proteínas por el método de Bio-Rad.

Aparte la enzima se homogeniza y se centrifuga a 8,000 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C, se disuelve en solución salina y se dializa en las mismas condiciones.

La relación de conjugación es de 1 mg de proteína por 3 mg de enzima, por lo que para 10 mg de enzima se requieren de 3.3 mg de anti IgG.

Posteriormente se le adiciona a la enzima 20 μ l de glutaraldehído al 25% y se deja reposar durante dos horas a temperatura ambiente. Una vez activada la enzima se adiciona IgG y se incuba durante dos horas, agitando suavemente cada 15 minutos. Después se dializa en contra de solución amortiguadora - Tris base 0.01 M pH = 8.0 durante toda la noche a 4°C. Al dializado se le adiciona un volumen igual de la solución amortiguadora Tris base con NaN_3 al 0.02% y albúmina bovina libre de gamma-globulinas al 1% para neutralizar los sitios activos que no reaccionaron.

Los sueros colectados se almacenaron a -70°C. En todos ellos se detectaron anticuerpos contra el antígeno estable al calor (previamente preparado) de cada uno de los aislados homólogos de las heces.

Para la realización del método de E.L.I.S.A. se procede de la siguiente manera:

Paso 1.

a) Se sensibiliza la placa con cada antígeno de los aislados autólogos en una concentración de $10 \mu\text{g/ml}$ de proteína en una solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato. Se depositan $200 \mu\text{l}$ en cada pozo.

b) Se incuba a 37°C durante 18 a 24 horas.

c) Se lava con PBS/Tween tres veces durante 3 minutos en cada lavado.

Paso 2.

a) Se bloquea con solución amortiguadora de glicina -HCl para quitar reacciones inespecíficas, depositando $200 \mu\text{l}$ en cada pozo.

b) Se incuba a 37°C durante dos horas.

c) Se lava con PBS/Tween tres veces durante tres minutos en cada lavado.

Paso 3

a) Se coloca por duplicado el suero problema con diluciones de 1:100, 1:200, depositando $200 \mu\text{l}$ por dilución en cada pozo.

b) Se incuba a 37°C durante dos horas.

c) Se lava con PBS/Tween tres veces durante tres minutos en cada lavado.

Paso 4.

a) Se coloca el conjugado anti-IgG humana en conejo + F.A. a una dilución de 1:5,000. Se depositan 200 μ l en cada pozo.

b) Se incuba a 37°C durante dos horas.

c) Se lava con PBS/Tween tres veces durante tres minutos en cada lavado.

Paso 5.

a) Se coloca el sustrato, p-nitrofenil-fosfato (Merck) en una solución amortiguadora de dietanolamina, concentración = 1 mg/ml (usar 4 pastillas para 5 ml de agua deionizada). Se depositan 200 μ l en cada pozo.

b) Se incuba a 37°C durante 30 minutos.

Paso 6.

a) Se coloca NaOH 3 M para detener la reacción, depositando 50 μ l en cada pozo.

Se lee en "Titertek, Dynatech" (lector de E.L.I.S.A.) a una absorbancia de 405 nm.

Se usó como control negativo el suero de un niño de -
seis meses de edad, a quien nunca se le aisló Campylobacter -
jejuni.

Se llevó otro control negativo con PBS.

R E S U L T A D O S

Se estudiaron 18 esquemas completos (el total de muestras recolectadas y un control médico de los niños a través del Centro de Salud y de una trabajadora social que los visitaba periódicamente en su casa) pertenecientes a un grupo de niños durante el transcurso de sus primeros 2 años de edad. Los métodos utilizados en el presente estudio permitieron el aislamiento e identificación de Campylobacter jejuni de las heces de dichos niños, obteniendo de esta manera el antígeno somático estable al calor de cada uno de los aislamientos. De la misma manera se obtuvieron sueros de estos pacientes para demostrar la presencia de inmunoglobulina G dirigida contra el antígeno somático estable al calor de Campylobacter jejuni.

Se utilizó el método de E.L.I.S.A. para la detección del anticuerpo contra el antígeno estable al calor, de cada uno de los aislados autólogos (proveniente de la misma persona).

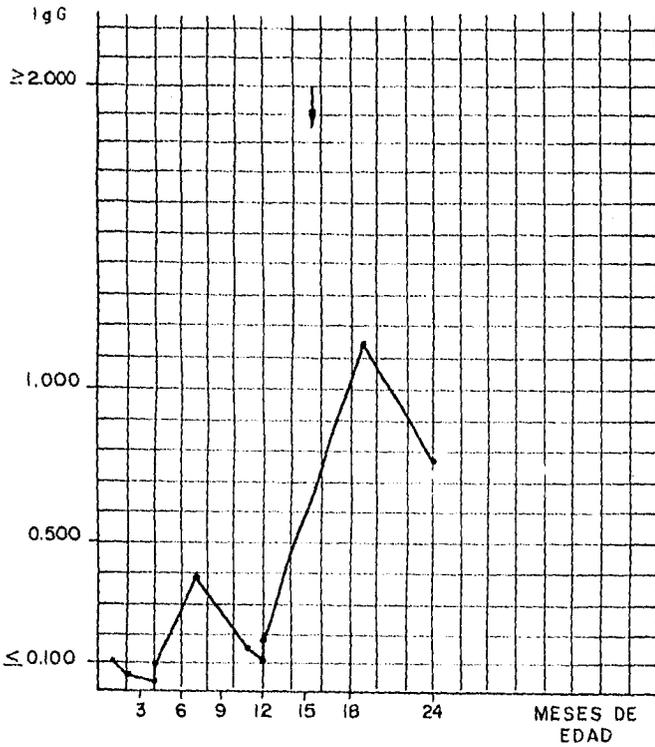
Los resultados que se obtuvieron se leyeron a una absorbancia de 405 nm considerando como positivos aquellos valores mayores de 0.2.

Los resultados están representados en las siguientes 18 gráficas correspondientes a cada uno de los niños, indicando las lecturas que se obtuvieron en las diferentes fechas de ob--

tención de las muestras, así como las fechas de los nacimientos de los niños y cuando se aisló a Campylobacter.

La respuesta inmunológica de los 18 niños, en las -
muestras de sueros antes y después del aislamiento de -
Campylobacter se encuentran ahí señaladas.

Los resultados positivos se indican por un producto -
de reacción colorido cuya absorbancia debe estar entre 0.2 y 1.0
por razones de linealidad. De esta manera los resultados se ex-
presan como positivos, es decir con anticuerpos presentes en el
suero, y negativos indicando la ausencia de ellos, cuando el va-
lor de absorbancia es por abajo de 0.2.



NACIMIENTO DEL NIÑO

16-IV-80

F E C H A

16-IV-80
 27-V-80
 14-VII-80
 18-VII-80
 20-X-80
 06-II-81
 19-III-81
 31-III-81
 19-X-81
 16-IV-82

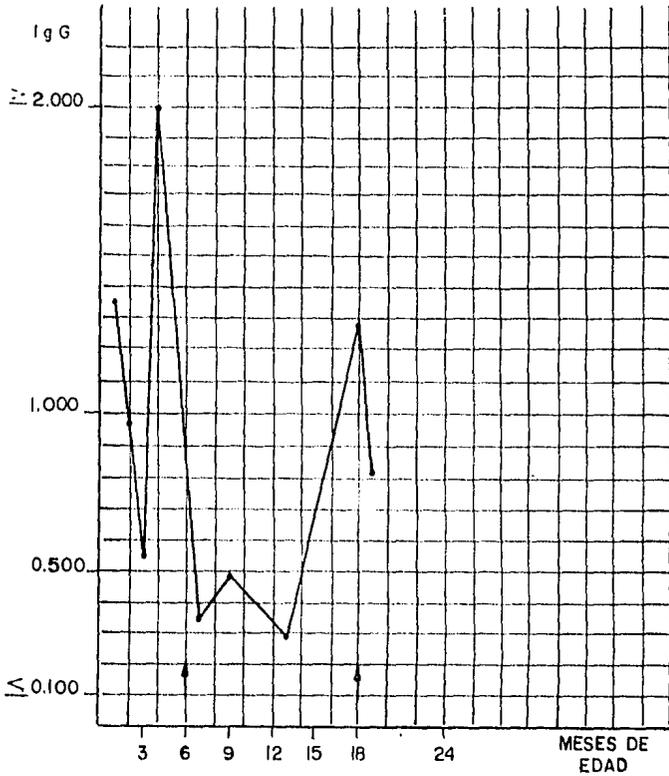
↓ AISLAMIENTO DE CAMPYLOBACTER

16-VI-81

ABSORBANCIA

0.145
 0.068
 0.047
 0.093
 0.290
 0.167
 0.111
 0.182
 1.142
 0.773

GRAFICA 1



NACIMIENTO DEL NIÑO

12-V-80

F E C H A

12-V-80

10-VI-80

28-VII-80

22-VIII-80

14-XI-80

29-I-81

19-V-81

27-X-81

06-X-81

↓ AISLAMIENTO DE CAMPYLOBACTER

26-X-80

10-X-81

ABSORBANCIA

1.350

0.953

0.553

> 2.0

0.350

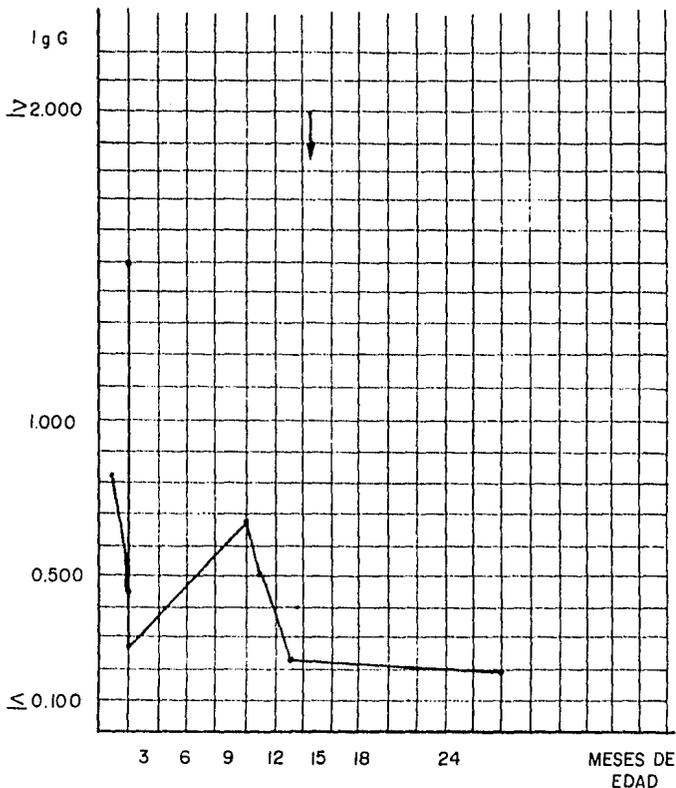
0.495

0.281

1.285

0.821

GRAFICA 2



NACIMIENTO DEL NIÑO

11-VI-80

F E C H A

11-VI-80
 06-VII-80
 07-VII-80
 11-VII-80
 16-VII-80
 23-VII-80
 30-VII-80
 11-XII-80
 24-III-81
 03-IV-81
 12-VI-81
 24-V-82

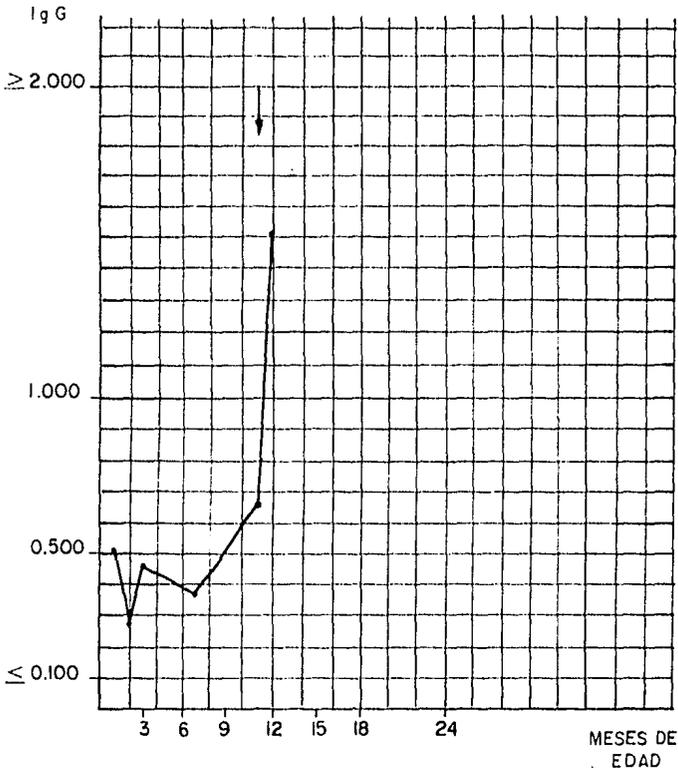
AISLAMIENTO DE CAMPYLOBACTER

16-VII-80

ABSORBANCIA

0.822
 0.559
 0.446
 1.507
 0.449
 0.562
 0.276
 0.530
 0.685
 0.508
 0.227
 0.0

GRAFICA 3



NACIMIENTO DEL NIÑO

01-VII-80

F E C H A

01-VII-80

01-VIII-80

02-IX-80

22-I-81

26-V-81

19-VI-81

↓ AISLAMIENTO DE CAMPYLOBACTER

26-V-81

ABSORBANCIA

0.506

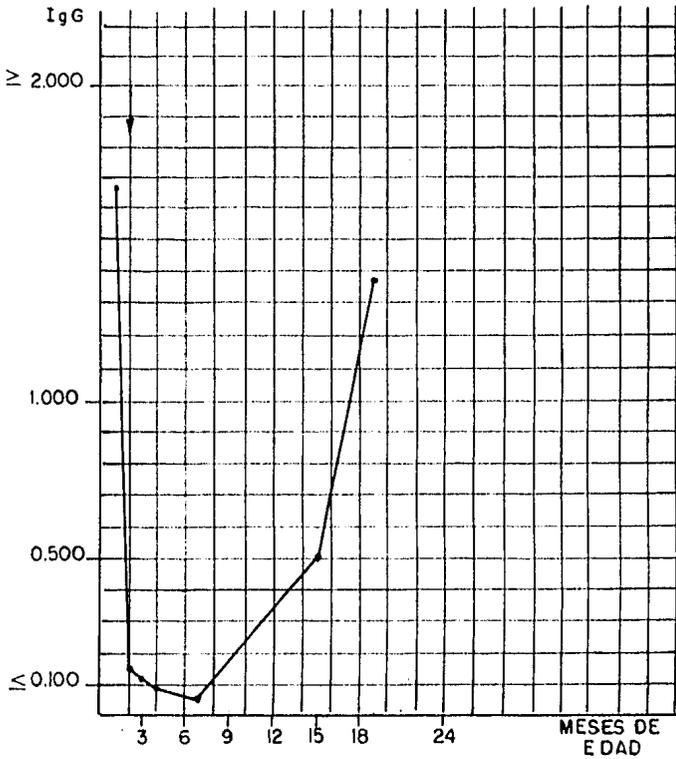
0.277

0.457

0.379

0.670

1.516

**NACIMIENTO DEL NIÑO**

16-VII-80

F E C H A

16-VII-80

12-VIII-80

12-IX-80

13-X-80

15-I-81

15-IX-81

18-I-82

 AISLAMIENTO DE CAMPYLOBACTER

02-VIII-80

 ABSORBANCIA

1.664

0.158

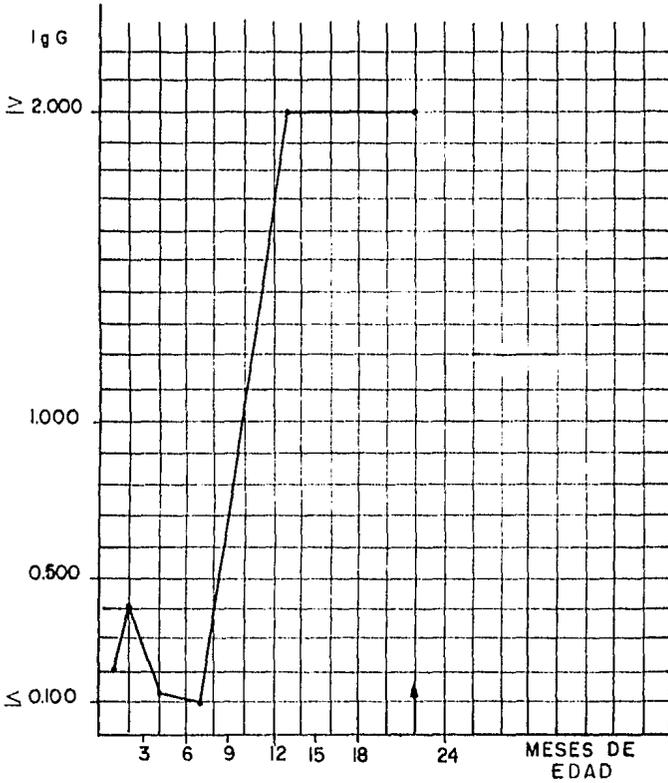
0.124

0.093

0.061

0.504

1.372

**NACIMIENTO DEL NIÑO**

12-VIII-80

F E C H A

12-VIII-80

16-IX-80

14-XI-80

06-II-81

03-VIII-81

12-V-82

↓ AISLAMIENTO DE CAMPYLOBACTER

12-V-82

ABSORBANCIA

0.210

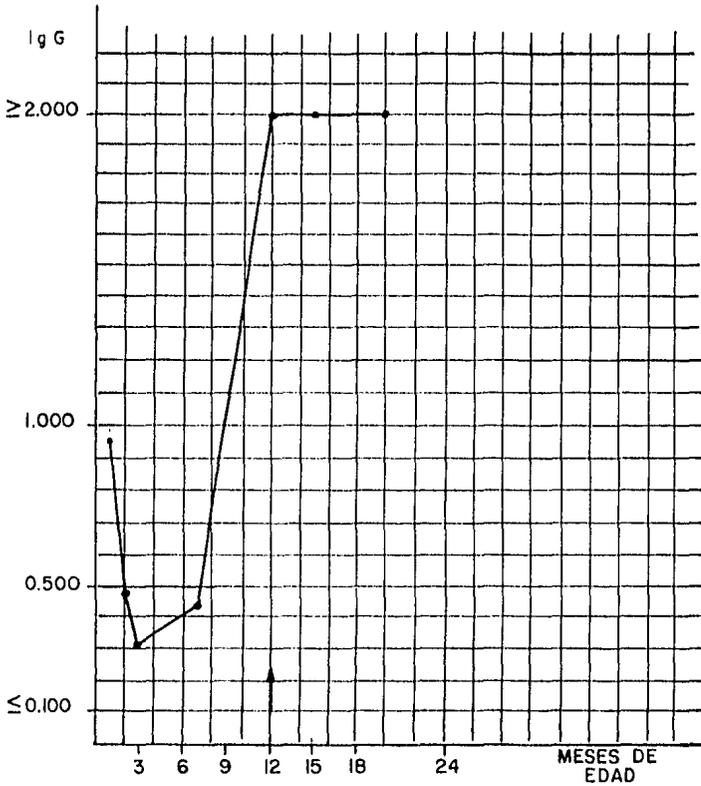
0.404

0.131

0.061

> 2.0

> 2.0



NACIMIENTO DEL NIÑO

26-VIII-80

F E C H A

26-VIII-80

26-IX-80

27-X-80

06-II-81

08-VII-81

17-VII-81

05-X-81

17-III-82

30-VII-82

AISLAMIENTO DE CAMPYLOBACTER

08-VII-81

ABSORBANCIA

0.947

0.484

0.308

0.445

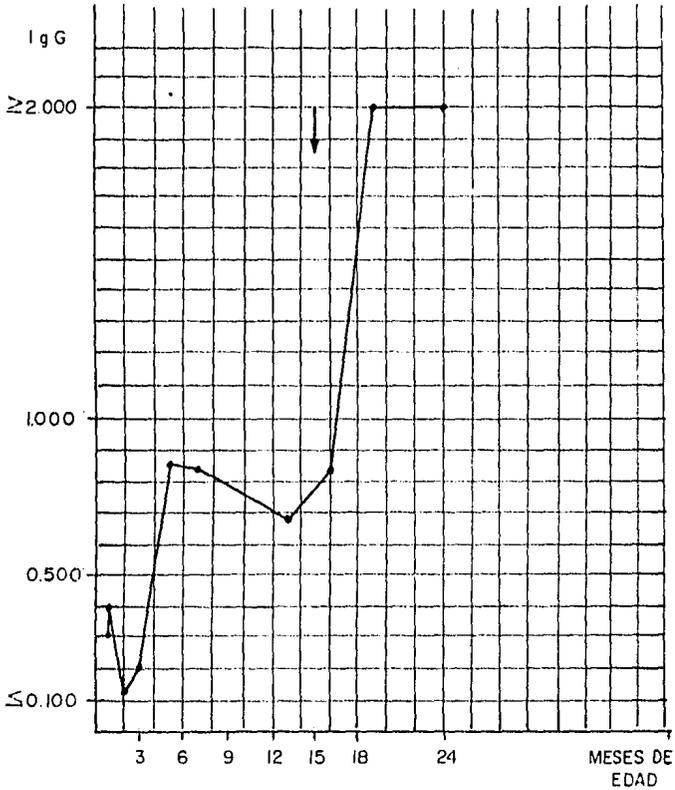
>2.0

>2.0

>2.0

>2.0

>2.0



NACIMIENTO DEL NIÑO

02-IX-80

F E C H A

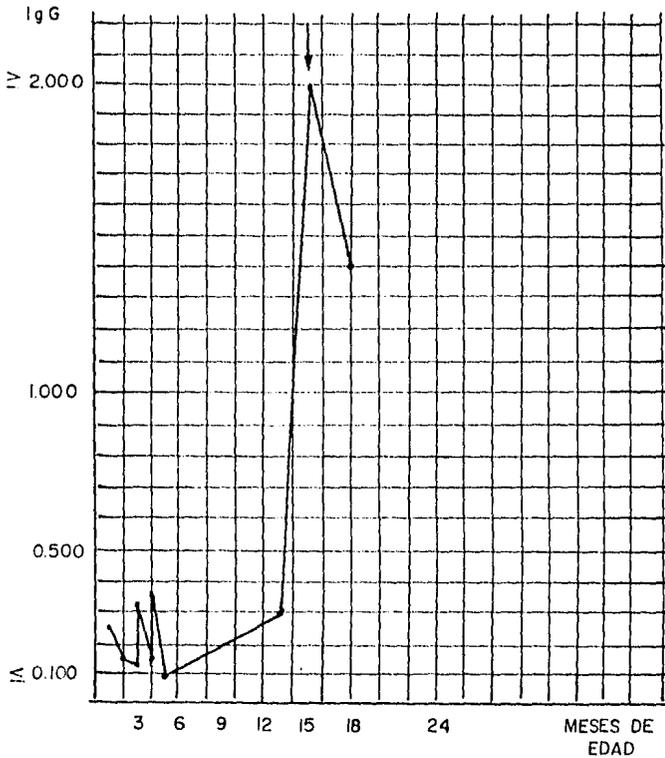
04-IX-80
 05-IX-80
 03-X-80
 12-XI-80
 13-I-81
 06-III-81
 03-IX-81
 04-XII-81
 17-III-82
 06-VIII-82

↓ AISLAMIENTO DE CAMPYLOBACTER

24-XI-81

ABSORBANCIA

0.314
 0.401
 0.135
 0.154
 0.868
 0.848
 0.688
 0.841
 >2.0
 >2.0

**NACIMIENTO DEL NIÑO**

08-IX-80

F E C H A

08-IX-80

06-X-80

06-XI-80

28-XI-80

05-XII-80

09-XII-80

14-I-81

08-IX-81

19-XI-81

07-II-82

LAISLAMIENTO DE CAMPYLOBACTER

18-XI-81

ABSORBANCIA

0.251

0.156

0.133

0.322

0.144

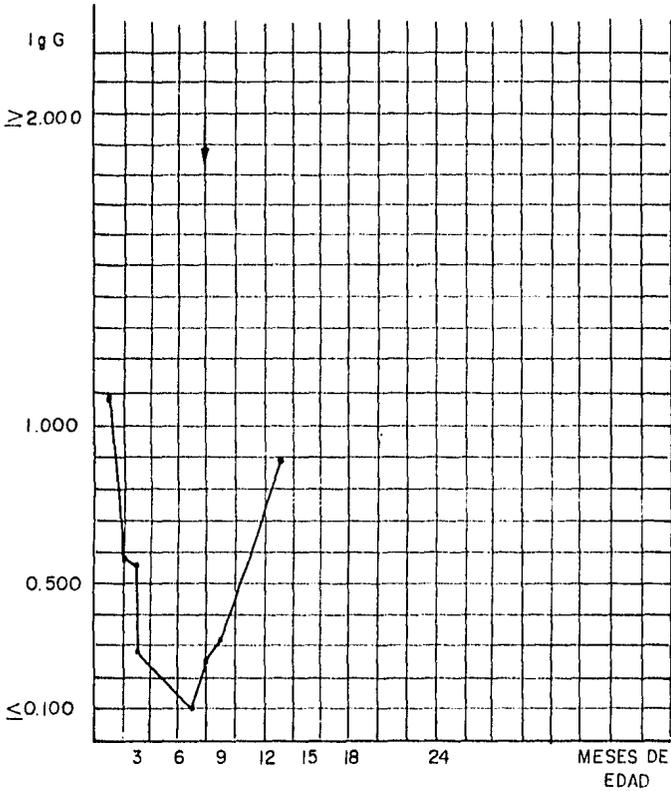
0.358

0.094

0.299

>2.0

1.35



NACIMIENTO DEL NIÑO

18-XI-80

F E C H A

18-XI-80

27-XI-80

18-XII-80

19-I-81

29-I-81

11-V-81

16-VI-81

01-VII-81

24-XI-81

↓ AISLAMIENTO DE CAMPYLOBACTER

16-VI-81

ABSORBANCIA

1.093

1.102

0.595

0.581

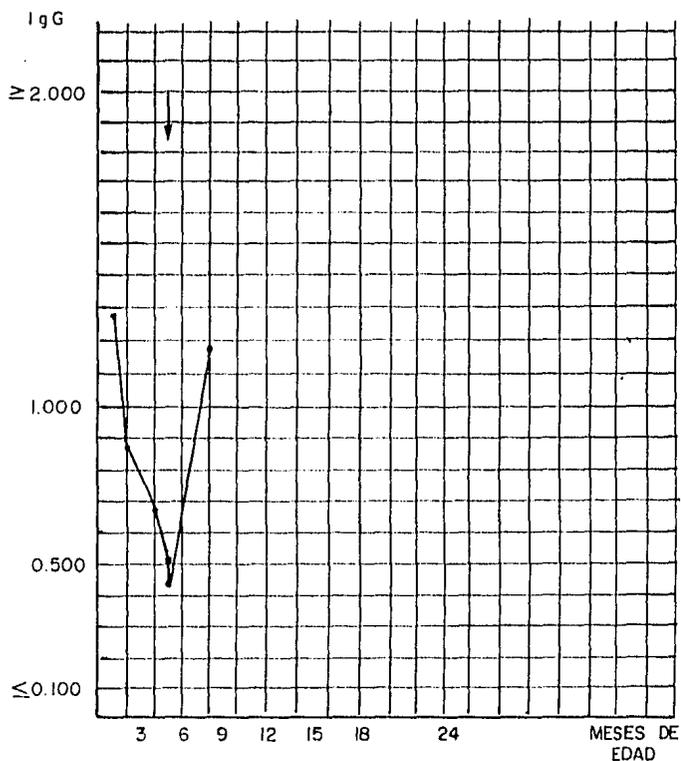
0.291

0.091

0.248

0.311

0.892

**NACIMIENTO DEL NIÑO**

29-XI-80

F E C H A

29-XI-80

29-XII-80

02-II-81

06-III-81

19-III-81

17-VI-81

↓ AISLAMIENTO DE CAMPYLOBACTER

19-III-81

ABSORBANCIA

1.283

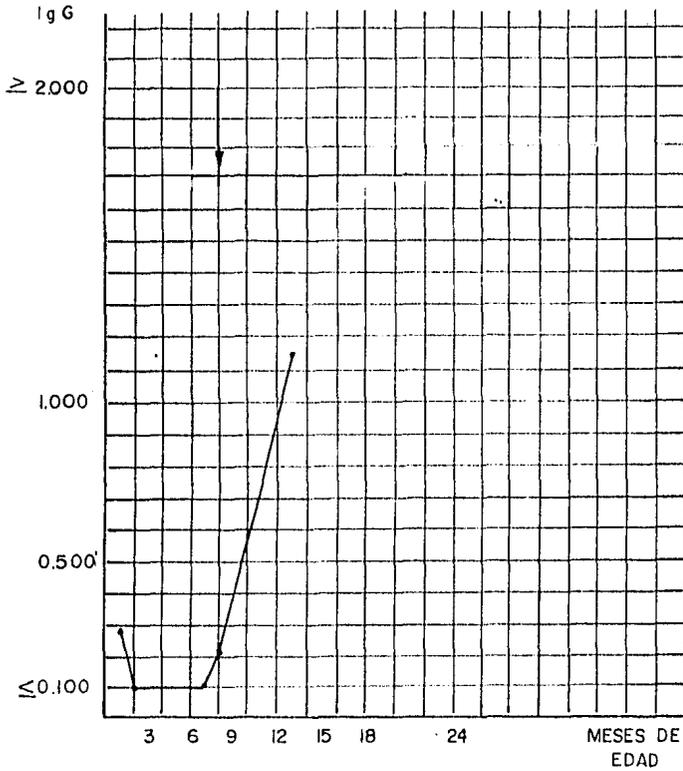
0.884

0.685

0.468

0.512

1.184

**NACIMIENTO DEL NIÑO**

21-III-81

F E C H A

21-III-81

23-IV-81

13-VII-81

27-IX-81

14-X-81

12-III-82

↓ AISLAMIENTO DE CAMPYLOBACTER

03-X-81

ABSORBANCIA

0.298

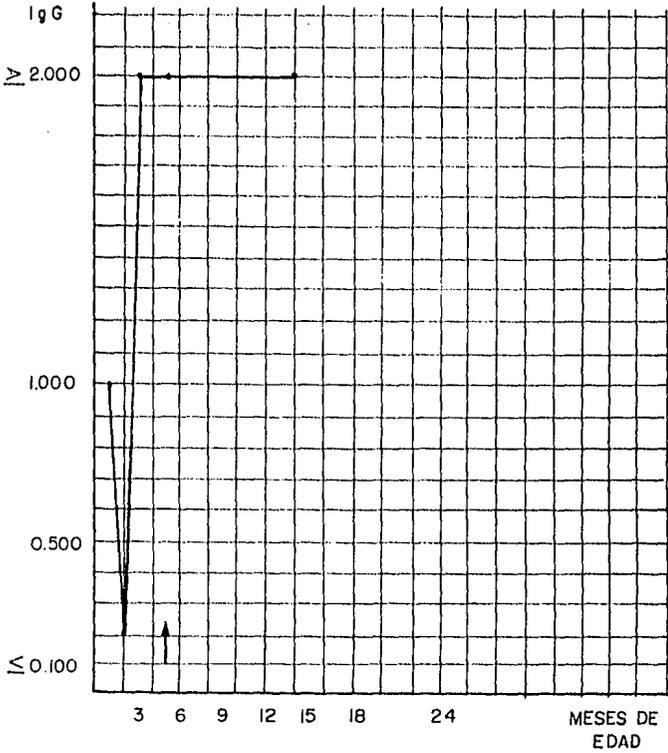
0.009

0.059

0.139

0.210

1.168



NACIMIENTO DEL NIÑO

22-III-81

F E C H A

22-III-81

24-IV-81

21-V-81

23-VII-81

20-IV-82

↓ AISLAMIENTO DE CAMPYLOBACTER

30-VII-81

ABSORBANCIA

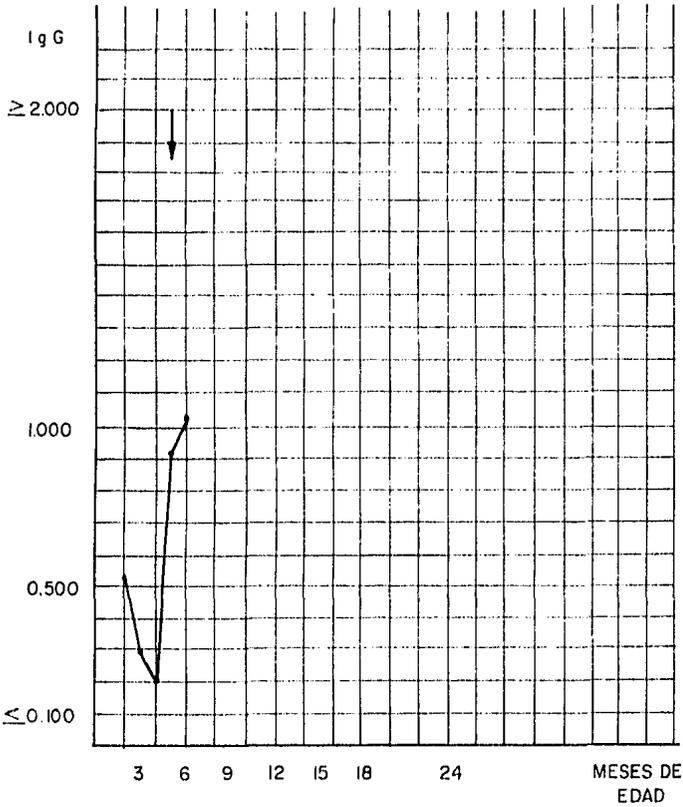
1.066

0.222

>2.0

>2.0

>2.0

**NACIMIENTO DEL NIÑO**

22-III-82

F E C H A

22-IV-82

25-V-82

20-VI-82

19-VII-82

21-VIII-82

↓ AISLAMIENTO DE CAMPYLOBACTER

01-VII-82

ABSORBANCIA

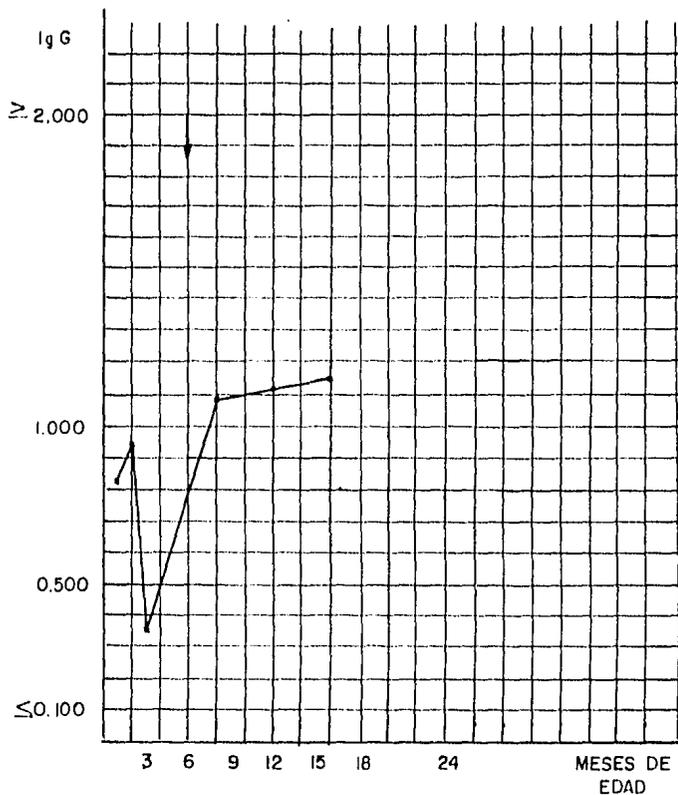
0.524

0.294

0.203

0.922

1.035



NACIMIENTO DEL NIÑO

20-VI-82

F E C H A

20-VI-82

18-VII-82

16-VIII-82

20* I-83

17-V-83

13-IX-83

↓ AISLAMIENTO DE CAMPYLOBACTER

11-XI-82

ABSORBANCIA

0.828

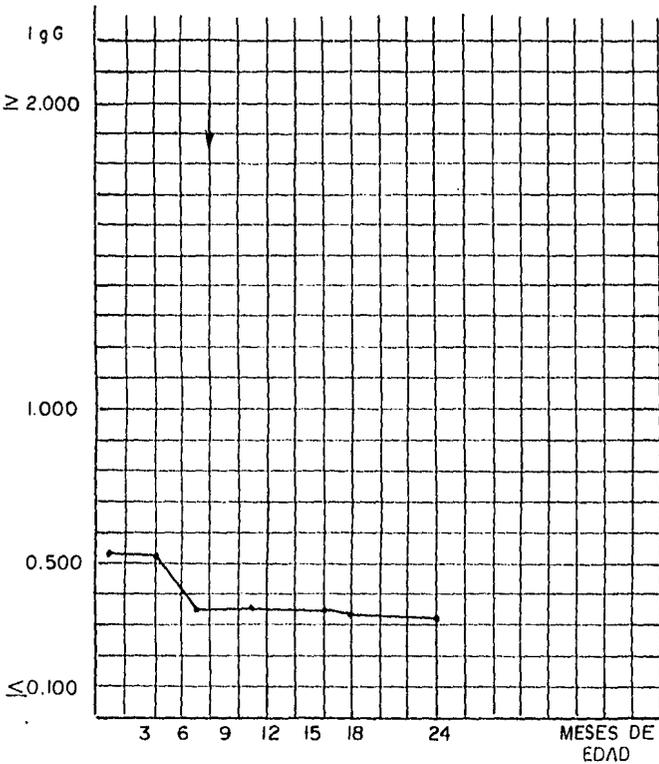
0.953

0.341

1.081

1.123

1.152

**NACIMIENTO DEL NIÑO**

22-VII-80

F E C H A

22-VII-80

22-X-80

16-I-81

19-V-81

09-X-81

31-XII-81

28-VII-82

↓ AISLAMIENTO DE CAMPYLOBACTER

23-11-81

ABSORBANCIA

0.520

0.510

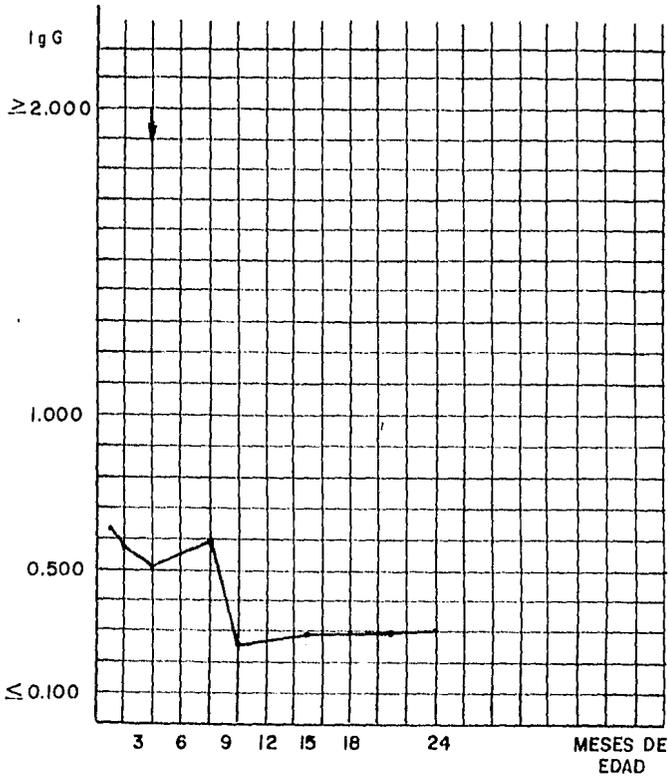
0.341

0.350

0.349

0.339

0.320



NACIMIENTO DEL NIÑO

08-X-80

F E C H A

08-X-80

10-XI-80

16-I-81

21-V-81

30-VII-81

02-XII-81

16-VI-82

12-IX-82

↓ AISLAMIENTO DE CAMPYLOBACTER

22-I-81

ABSORBANCIA

0.637

0.573

0.517

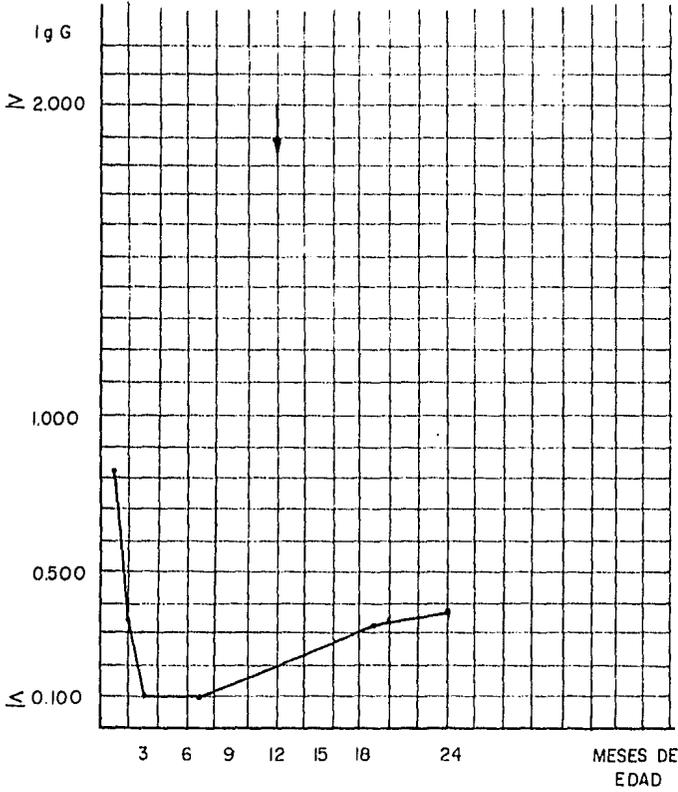
0.593

0.250

0.280

0.298

0.310



NACIMIENTO DEL NIÑO

08-X-80

F E C H A

09-X-80

07-XI-80

09-XII-80

21-I-81

23-IV-81

16-X-81

12-IV-82

11-IX-82

↓ AISLAMIENTO DE CAMPYLOBACTER

13-IX-81

ABSORBANCIA

0.816

0.261

0.0

0.0

0.103

0.0

0.329

0.392

DISCUSION

En el seguimiento longitudinal se pudo observar que la gran mayoría de los niños poseen en sus sueros anticuerpos IgG contra Campylobacter desde el momento del nacimiento. Posteriormente adquieren de nuevo estos anticuerpos por infecciones que pueden ser asintomáticas o sintomáticas. Además, se observó que cuando los niños tenían un episodio de diarrea en el que se aislaba a Campylobacter, se observaba una buena respuesta inmune - aún a edades muy tempranas.

Se puede observar que hubo algunos niños que tuvieron una respuesta inmune semejante, por lo que para no hacer tan repetitiva la explicación de cada gráfica se decidió agruparlos - por comportamiento ante la infección por Campylobacter jejuni. - Resultaron ser 4 diferentes tipos de respuesta inmune de los huéspedes hacia este microorganismo.

Grupo I

Gráfica 1 - Caso 002

Gráfica 6 - Caso 042

Gráfica 7 - Caso 039

Gráfica 13 - Caso 045

Gráfica 15 - Caso 065

Grupo II

Gráfica 2 - Caso 005

Gráfica 8 - Caso 038

Grupo III

Gráfica 4 - Caso 015

Gráfica 5 - Caso 028

Gráfica 9 - Caso 004

Gráfica 10 - Caso 032

Gráfica 11 - Caso 037

Gráfica 12 - Caso 044

Gráfica 14 - Caso 060

Grupo IV (Control)

Gráfica 3 - Caso 016

Gráfica 16 - Caso 003

Gráfica 17 - Caso 017

Gráfica 18 - Caso 018

Grupo I.- En este primer grupo se puede observar que todos los niños tuvieron niveles altos de anticuerpos IgG contra el antígeno somático estable al calor, ya que en el momento del aislamiento de Campylobacter se observa una buena respuesta inmune y que estos anticuerpos permanecen altos durante meses después.

En el momento de la infección se observa que la mayoría de los niños cursaban asintomáticos, sin embargo, era evidente que habían adquirido una infección previa ya sea asintomática o sintomática, que no fué posible detectarse.

Con excepción de las gráficas 1 y 6, también se observa que estos niños al nacer ya presentaban anticuerpos IgG contra Campylobacter, que fueron transmitidos por la madre, pero que al cabo de 1 a 3 meses éstos bajaban.

Grupo II.- Sólo se tuvieron a dos niños con un comportamiento semejante. El primero (gráfica 2) con un título bastante alto de anticuerpos IgG al nacimiento, transmitidos a través de la vía placentaria y el segundo (gráfica 8) casi sin anticuerpos y que a pesar de esto se comportaron casi de igual manera en el transcurso de los dos años.

En la gráfica 2 se observan dos picos pertenecientes a dos episodios de diarrea por Campylobacter. En la gráfica 8 también se observan dos picos pero solamente en el segundo se pudo aislar a Campylobacter.

Aquí, en general, nos damos cuenta que después de los episodios de diarrea, los anticuerpos IgG bajan quedando el individuo susceptible a una reinfección, en este momento tiene nuevamente títulos altos de IgG que pueden permanecer constan--

tes unos meses después o caer inmediatamente después, como se observa en la gráfica 2.

Grupo III.- Se observa que la mayoría de los niños de este estudio longitudinal presentan una respuesta inmunológica parecida, de 18 niños que lo comprenden, 7 tuvieron casi el mismo comportamiento quedando en este tercer grupo, en el que no se pudo observar qué pasó después de la infección, si estos anticuerpos se mantuvieron altos o si bajaron, ya que no fué posible continuar el estudio con estos niños por más tiempo.

Unos presentaban anticuerpos IgG altos al nacer, otros los presentaban bajos o no los tenían. Lo que sí se observa es que al momento de la infección por Campylobacter estos anticuerpos subieron por lo que decimos que, en general, el huésped presenta una buena respuesta inmunológica ante esta infección.

Grupo IV.- Quedan comprendidos los niños considerados como controles, a quienes se les aisló Campylobacter y nunca mostraron anticuerpos detectables contra el antígeno homólogo, con excepción del caso 016 (gráfica 3) que a los tres meses de edad tuvo un título alto (probablemente anticuerpos transmitidos a través de la leche materna), pero que cayó inmediatamente después, manteniéndose bajo hasta el momento en que terminó este estudio.

En cuanto al método de E.L.I.S.A. éste resultó ser ade

cuado para esta cuantificación de anticuerpos, además de ser accesible y fácil ya que no se necesitan de medios de cultivo y reactivos que fueran caros. Estos reactivos se utilizan en volúmenes pequeños.

CONCLUSIONES

1.- E.L.I.S.A. fué útil para detectar anticuerpos IgG ya que presenta ventajas que son importantes para nuestras necesidades en el laboratorio. Presenta un tiempo corto para su realización y obtención de resultados y, lo más importante, el costo del ensayo no es tan caro relativamente.

2.- Se pueden definir con base a este seguimiento longitudinal, varios patrones de comportamiento serológico.

Infecciones sintomáticas con respuesta inmune.

Infecciones asintomáticas con respuesta inmune.

Portadores sin evidencia de respuesta inmune. Aquí se pueden presentar dos casos: a) Anticuerpos altos que no se modifican. b) Sin presencia de anticuerpos y que no cambian.

3.- Se observan altos títulos de anticuerpos específicos contra Campylobacter jejuni en pacientes que han padecido la infección. La mayoría de los huéspedes forman anticuerpos específicos contra Campylobacter jejuni y a menudo aparecen los títulos elevados en la etapa inicial de la enfermedad y declinan en pocos meses.

4.- A pesar de todos los estudios realizados aún no se

conoce si los anticuerpos séricos específicos protegen contra -
una reinfección.

5.- Existe el inconveniente de utilizar el antígeno ho
mólogo para la prueba, ya que siempre deberá contarse con el -
aislamiento de Campylobacter y, como se vió, implica ciertas -
condiciones especiales.

A N E X O

Medio Campy-Bap (con antibióticos)

.Agar Brucella + 5% de sangre de carnero.

Vancomicina 10 mg/lt

Trimetoprim 5 mg/lt

Polimixina 2,500 I.U./lt

Anfotericina 2 mg/lt

Cefalotina 15 mg/lt

.Caldo Brucella

Caldo Brucella + 0.16% de agar + 1% de glicina.

Caldo Brucella + 0.16% de agar + 3.5% de NaCl.

Caldo Brucella + 0.16% de agar + 1% de sales biliares.

Solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato.

-Na₂CO₃ 1.59 gr.

-NaHCO₃ 2.93 gr.

-NaN₃ 0.1 gr.

-Agua destilada 1.0 lt

Solución amortiguadora de dietanolamina.

-Dietanolamina 97.0 ml

-MgCl₂. 6H₂O 0.1 gr

-NaN ₃	0.2 gr
-Agua destilada	1.0 lt

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS-Tween 20)

-NaCl	8.0 gr
-KH ₂ PO ₄	0.4 gr
-Na ₂ HPO ₄	2.9 gr
-KCl	0.2 gr
-NaN ₃	0.2 gr
-Tween 20	0.5 ml
-Agua destilada	1.0 lt

Solución amortiguadora de glicina - HCl

-Solución A

NH ₂ CH ₂ COOH	15.01 gr
Agua destilada	1.0 lt

-Solución B

HCl 0.2 M 10 ml de HCl (1N) + 40 ml de H₂O

Mezclar 50 ml de la solución A + 50 ml de la solución B.

Solución amortiguadora Tris-HCl

Tris-HCl	31.6 gr
NaCl	116.8 gr
Agua destilada cbp	2.0 lt

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abbot J.D., Dale B., Serotyping Campylobacter jejuni/coli.
J. Clin. Pathol. 33: 762-766, (1980).
- 2.- Arroyo J.C., Lipton S., Hypocloplementemia and Campylobacter fetus infection. South. Med. J. 17: 921-922, (1980).
- 3.- Avrameas S. and Guedson A. Magnetic solid phase enzyme -
immunoassay. Immunochem. 14: 433-447, (1977).
- 4.- Avrameas S., Polymerization and Immobilization of Proteins -
using ethylchloroformate and glutaraldehyde. Scand. J. -
Immunol. 3: 29-35, (1975).
- 5.- Avrameas S., Coupling of enzymes to antibodies and antigens.
Scand J.Immunol. 8: 7-23, (1978).
- 6.- Avrameas S., Coupling of enzymes to proteins with
glutaraldehyde. Immunochem. 6: 43-52, (1969).
- 7.- Avrameas S., Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA).
Quantitative assay Immunoglobulina G. Immunochem. 8: 871-874,
(1971).

- 8.- Barot M., Mosenthal A.C., Location of Campylobacter jejuni infected chicken livers. J. Clin. Microbiol. 17: 921-922, (1983).
- 9.- Berden J.H.M., Muytjens H.L., Reactive arthritis associated with Campylobacter jejuni enteritis. Br. Med. J.; 1: 380-381, (1979).
- 10.- Blaser M.J., Gravens J., Campylobacter enteritis associated with canine infection. Lancet. 2: 978-981, (1978).
- 11.- Blaser M.J., Berkowit I.D., Campylobacter enteritis. Clinical and epidemiologic features. Ann. Int. Med. 91: 179-185, (1979).
- 12.- Blaser M.J., Reservoirs for human Campylobacteriosis. J. Infect Dis. 141: 665-669, (1980).
- 13.- Blaser M.J., Campylobacter fetus subsp. jejuni: The need for surveillance. J. Infect. Dis. 141: 670-671, (1980).
- 14.- Blaser M.J., Hardesty H. L. y col., Survival of Campylobacter fetus subsp. jejuni in biological milieus. J. Clin. Microbiol. 11: 309-313, (1980).

- 15.- Blaser M J., Wayne C.M., Weaver R.E., Cellular faty -
Composition of Campylobacter fetus. J. Clin. Microbiol. -
11: 448-451, (1980).
- 16.- Blaser M.J., Gass R.I., Hug M.I., Stoll B., Isolation of -
Campylobacter fetus subsp. jejuni from Bangladesh children. -
J. Clin. Microbiol. 12: 744-747, (1980).
- 17.- Bokkenkeuser V.D., Richardson N.J., Detection of enteric -
Campylobacteriosis in children. J. Clin. Microbiol. -
9: 227-232, (1979).
- 18.- Bradshaw M.J., Swallow J.H., Brown R., Campylobacter -
enteritis in Chelmsford. Postgrad. Med. J. 56: 80-84, -
(1980).
- 19.- Butzler J.P., Skirrow M.B., Campylobacter enteritis. Clin.-
Gastroenterol. 8: 737-765, (1979).
- 20.- Cadranel S., Rodesch P., Butzler J.P., Enteritis due to -
"related vibrio" in children. Am. J. of Dis. Children. -
126: 152-155, (1973).
- 21.- Cooper I.A. y H.J. Slee, Human infection by Vibrio fetus.
Med. J. 1: 1263, (1971).

- 22.- Darrell J. H., Farrell B.C., Mulligan R. A., Case a human -
vibriosis. Br. Med. J. 2: 287-289, (1967).
- 23.- Dekeyser P., M. Detrain y J. P. Butzler, Acute enteritis -
due related vibrio; First positive stool cultures. J. Infect.
Dis 125: 390, (1972).
- 24.- Drake A. A., Gilchrist M. J., Washington J.A., Diarrhea due
to Campylobacter fetus subsp. jejuni. Mayo Clin. Proc. -
56: 414-423, (1981).
- 25.- Drasar B.S. y M.K. Hudson, Spiral organisms in intestinal -
disease. R. Adv. Infect. 41-53, (1979).
- 26.- Draw. D. and Mannina G., Indirect Sandwich Enzyme Linked -
Immunsorbent Assay for Rapid Detection of Haemophilus -
influenzae type B infection. J. Clin. Microbiol. -
10: 442-450, (1979).
- 27.- Evans R.G., Dadswell J., Human vibriosis. Br. J. Med. 3: 240,
(1967).
- 28.- Fernández H., Fernández F., Culture supernatants of -
Campylobacter jejuni induce a secretory response in jejunal
segments of adults rats. Infect. Immun. 40: 429-431, (1983).

- 29.- Fick R. B., Isturiz R., Cadman E. C., Campylobacter fetus -
septic arthritis: Report of a case. Yale J. Biol. Med. -
52: 339-344, (1979).
- 30.- Forgeaux B., D. Lesage y B. Faucqueur, La Campylobacteriosé
Humainé: A propor de six observations. Sem. Hosp. Paris. -
197: 417-423, (1979).
- 31.- Fox J. G., Campylobacteriosis - A New disease in laboratory
animals. Lab. Animal Science. 32: 625-637, (1982).
- 32.- George H. A., P. S. Hoffman, R. M. Smibert y N. L. Frieg, -
Improved media for growth and aerotolerance of Campylobacter
fetus. J. Clin. Microbiol. 8: 36-51, (1978).
- 33.- Grant H. L., J. R. Richardson y V. D. Bokkenheuser, Broiler
chickens as potential source of Campylobacter infections in
humans. J. Clin. Microbiol. 11: 508-509, (1980).
- 34.- Golfdinger S. E. Constipation diarrhea and disturbance of -
anorectal function. Harrison's principles of Internal -
Medicine. New York. Mc. Graw Hill Brook Co. pág. 210, -
(1977).
- 35.- Goodman L. J., Kaplan R. L., Trenholme G. M., Campylobacter
fetus subsp. jejuni; Experience in a large Chicago Medical -
Center. Am. J. of Med. Sci. 282: 125-130, (1981).

- 36.- Guerrant R. L., Lahita R. G., Win W. C., Campylobacteriosis in man: Pathogenic mechanisms an review of 91 bloodstream - Infections. Am. J. Med. 65: 584-592, (1978).
- 37.- Hallet A. F., Botha P. L., Isolation of Campylobacter fetus from recent cases of human vibriosis. J. Hyg. Camb. - 79: 381-389, (1977).
- 38.- Hastings D. H., Campylobacter enteritis in pets. (Letter) - Lancet. 11: 1249-1250, (1978).
- 39.- Hay D. J., Ganguli L. A., Campylobacter enteritis presenting as an acute abdomen. Postgrad. Med. D. J. 56: 203-206, - (1980).
- 40.- Hebert G. A., Hollis D. G., Weaver R. E., Lambert M. A., - Thirty years of Campylobacter: Biochemical characteristics - and a biotyping proposal for Campylobacter jejuni. J. Clin. Microbiol. 15: 1065-1073, (1982).
- 41.- Hebert G. A., Hollis D. G., Weaver R. E. Steigerwalt A. G., - Serogroups of Campylobacter jejuni, Campylobacter coli and - Campylobacter fetus defined by direct immunofluorescence. - J. Clin. Microbiol. 17(3): 529-538, (1983).

- 42.- Holmgren J., Svennerholm A. M., E.L.I.S.A. for the study of Enterotoxic Diarrhoeal Diseases. *Ins. of Med. Microbiol.* 8: 111-118, (1978).
- 43.- Hood M. y J. Tood, Vibrio fetus: a cause of human abortion. *Am. J. Obst. Gynecol.* 80: 506, (1960).
- 44.- Jones D.M., Eldridge J., Dale B., Serological response to Campylobacter jejuni coli infection. *J. Clin. Pathol.* 33: 767-769, (1980).
- 45.- Jones D. M., Robinson D. A., Occupational exposure to Campylobacter jejuni infection. *Lancet.* 11: 440-441, (1981).
- 46.- Karmali M. A., Fleming P. C., Campylobacter enteritis. *C.M.A. Journal.* 120: 1525-1532, (1979).
- 47.- Karmali M. A., Penner J. L., Fleming P. C., Williams A., The serotype and biotype distribution of clinical isolates of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli over a three years period. *J. Infect. Dis.* 147 (2): 243-246, (1983).
- 48.- Karmali M. A. y Fleming P. C., Application of the Fortner principle to isolation of Campylobacter from stools. *J. Clin. Microbiol.* 10: 245-247, (1979).

- 49.- Keith T., Kworkning Ch. y Ribeiro C. D., Campylobacter jejuni/coli meningitis in an neonate. Br. Med. J. 280: 1301-1302, (1980).
- 50.- Kendall E. J., Tanner E., Campylobacter enteritis in general practice. J. Hyg. Camb. 88: 155-163, (1982).
- 51.- King E. O., The laboratory recognition of Vibrio fetus and a closely related vibrio isolated from cases of human vibriosis. Ann New York Academy of Science. 8: 700-711 (1962).
- 52.- Kosunen T. V., Danielsson D., Kjellander J., Serology of Campylobacter fetus subsp. jejuni ("Related Campylobacters"). Acta Path. Microbiol. Scand Sect B. 88: 207-218, (1980).
- 53.- Kosunen T. V., Kauranen O., Martin J., Pitkanen T., Hortling L., Mutru O., Koskimies S., Reactive arthritis after Campylobacter jejuni enteritis in patients with HLA-327. Lancet. 11: 1312-1313, (1980).
- 54.- Kowalec J. K., Kaminski Z. C., Krey P. D., Campylobacter arthritis. Arth. Rhem. 23 (1): 92-94, (1980).
- 55.- Lambert M. E., Schofield P. E., Ironside A. G. and Mandal B. K., Campylobacter colitis. Br. Med. J. 1: 857-859 (1979).

- 56.- Lawson G. H. y Rowland A. C., The characterization of Campylobacter sputorum subsp. mucosalis isolated from pigs. Res. Vet. Science. 18: 121-126, (1975).
- 57.- Lauwers S., Vlaes L., Butzler J. P., Campylobacter serotyping and epidemiology. Lancet. 11: 158-159, (1981).
- 58.- Lennette E. H., Laboratory test in chemotherapy: Manual of Clinical Microbiology. Second Edition. American Society for Microbiology. Pág. 407, (1974).
- 59.- Levy A. J., Gastroenteritis outbreak probably due to a bovine strain of Vibrio. Yale J. Biol. Med. 18: 243, (1946).
- 60.- Lior H., Woodward D. L., Edgar J. A., Laroche L. J., Serotyping of Campylobacter jejuni by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. J. Clin. Microbiol. 15: 761-768, (1982).
- 61.- Luechtefeld N. A., Blaser M. J., Barth L., Isolation of Campylobacter fetus subsp. jejuni from migratory water fowl. J. Clin. Microbiol. 12: 406-407, (1980).
- 62.- Martin W. T., Patton C. M., Morris G. K., Potter M. E., Selective enrichment broths medium for isolation of Campylobacter jejuni. J. Clin. Microbiol. 17: 853-859, (1983).

- 63.- Mc Coy E. C., Doyle D., Burda K., Corbeil L. B., Superficial antigens of Campylobacter (Vibrio) fetus: Characterization of an antiphagocytic component. *Infect. Immun.* 11: 517-525, (1975).
- 64.- Mc Coy E. C., Wiltberger H. A., Winter A. J., Antibody mediated immobilization of Campylobacter fetus: inhibition by somatic antigen. *Infect. Immun.* 13: 1266-1272, (1976).
- 65.- Mc Coy E. C., Wiltberger H. A., Winter A. J., Major outermembrane protein of Campylobacter fetus: physical and immunological characterization. *Infect. Immun.* 13(4): 1258-1265, (1976).
- 66.- Mc Myne P.M.S., Penner J.L., Mathias R.G., Black W., Hennessy J.N., Serotyping of Campylobacter jejuni isolated from sporadic cases and outbreaks in British Columbia. *J. Clin. Microbiol.* 16: 281-285, (1982).
- 67.- Mentzing L.O., Waterborne outbreaks of Campylobacters enteritis in Central Sweden. *Lancet.* 11: 352-354, (1981).
- 68.- Norby R., Mc. Closkey R. V., Zackrisson G., Meningitis caused by Campylobacter fetus subsp. jejuni. *Br. Med. J. Clin. Microbiol.* 12: 732-737, (1980).

- 69.- Penner J. L., Hennessy J. N., Passive hemagglutination -
technique for serotyping Campylobacter fetus subsp. jejuni
on the basis of soluble heat stable antigens. J. Clin. -
Microbiol. 12: 732-737, (1980).
- 70.- Pepersack F., Prigogynet T., Butzler J. P., Campylobacter
jejuni post-transfusional septicemia. Lancet. 11: 911 -
(1979).
- 71.- Piemont Y., Abanamy A., Campylobacter jejuni agent de -
diarrhées: Expérience D' un an de recherches systematiques.
Med. Maladies Infect. 10: 294-300, (1980).
- 72.- Pitkanen T., Ponkah A., Pettersson T., Kosunen T. V., -
Campylobacter enteritis in 188 hospitalized patients. Arch.
Intern. Med. 143: 215-219, (1983).
- 73.- Prescott J. F., Karmali M. A., Attempts to transmit -
Campylobacter enteritis to dogs and cats. C.M.A. Journal -
119: 1001-1002, (1978).
- 74.- Preston N. W., Campylobacter serotypes and epidemiology. -
Lancet. 11: 1283, (1981).
- 75.- Rautelin H., Kosunen T. V., An acid extract as a common -
antigen in Campylobacter jejuni strains. J. Clin. Microbiol.
17: 700-701, (1983).

- 76.- Retting P., Campylobacter infection in human beings. -
J. Pediatrics. 94: 855-864, (1979).
- 77.- Ringertz S., Rockhill R. C., Sutoma A., Campylobacter fetus
subsp. jejuni as a cause of gastroenteritis in Jakarta, -
Indonesia. J. Clin. Microbiol. 12: 538-540, (1980).
- 78.- Robinson D. A., Jones D. M., Milk-Campylobacter infection -
Br. Med. J. 282: 1374-1376, (1981).
- 79.- Skirrow M. B., Benjamin J., 1001 Campylobacters: Cultural -
characteristics of intestinal Campylobacters from man and -
animals. J. Hyg. Cam. 85: 427-442, (1980).
- 80.- Skirrow M. B., Turnbull G. L., Walker R. E., Campylobacter
jejuni: Enteritis transmitted from cat to man. Lancet. -
11: 1188, (1980).
- 81.- Smibert R. M., The Genus Campylobacter. Ann. Rev. Microbiol.
32: 673-709, (1978).
- 82.- Steele T. W., Mc Dermott S., Campylobacter enteritis in -
South Australia. Med. J. Australia. 404-406, (1978).

- 83.- Svedhem A., Kaijser B., Campylobacter fetus subsp. jejuni.
A common cause of diarrhea in Sweden. J. Infect. Dis. -
142: 353-359, (1980).
- 84.- Targan S. R., Chow A. W., Guze L. B., Campylobacter fetus -
associated with pulmonary abscess and empyema. Chest. -
71: 105-108, (1977).
- 85.- Taylor D. E., De Grandis S., Karmali M. A., Fleming P. C., -
Transmissible plasmids from Campylobacter jejuni. -
Antimicrob. Agents. Chemoter. 19(5): 831-835, (1981).
- 86.- Taylor P. R., Weinstein W. M., Bryner J. H., Campylobacter
fetus infection in human subjects: Association with raw milk.
Am. J. Med. 66: 779-783, (1979).
- 87.- Thomas K., Chan K., Campylobacter jejuni / coli meningitis -
in a neonate. Br. Med. J. 1301-1302, (1980).
- 88.- Urman J. D., Zurier R. B., Rothfield N. F., Reiter's -
Syndrome associated with Campylobacter fetus infection. -
Ann. Intern. Med. 85: 444-445, (1977).

- 89.- Watson K. C., Kerr E. J. C., Comparison of Agglutination, - complement fixation and immunofluorescence tests in - Campylobacter jejuni infections. J. Hyg. Cam. 82: 165-171, (1982).
- 90.- Weir W., Neat A. C., Welsby D., Brear G., Reactive arthritis associated with Campylobacter infection in the bowel. J. - Infect. Dis. 1: 281-284, (1979).
- 91.- White W. D., Human vibriosis: Indigenous cases in England. Br. Med. J. 285-287, (1967).
- 92.- Wosniak R., Middleton J., Chmel H., De la Cruz C., Young - J. R., Gram-negative endocarditis caused by Campylobacter - fetus. South Med. J. 71: 1311-1312, (1978).
- 93.- Yolken R. H., Enzyme Immunoassays for the Detection of - Infectious Antigens in Body Fluids: Current limitations and future prospects. Rev. of Infec. Dis. 4: 35-68, (1982).
- 94.- Young J. R., Callahan P., Drew W. I., Diarrheal disease - associated with isolation of Campylobacter fetus subsp. - jejuni in adults. Am Soc. for Microbiol. 939:940, (1980).