



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMPARACION DE TRES TÉCNICAS  
DE MICROAEROBIOSIS PARA EL AISLAMIENTO  
DE *Campylobacter jejuni*  
A PARTIR DE POLLOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

Guillermo Patiño Domínguez  
Asesor: Raúl Vázquez Martínez  
México D.F.  
1988





## **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.

**COMPARACION DE TRES TECNICAS DE MICROAEROBIOSIS PARA  
EL AISLAMIENTO DE *Campylobacter jejuni* A PARTIR DE POLLOS**

Tesis presentada ante la División de Estudios Profesionales de la  
Universidad Nacional Autónoma de México para la obtención del título de  
Médico Veterinario Zootecnista

por

Gabriela Patiño Domínguez

Asesor: Raúl Vázquez Martínez

México, D.F.

1968

## CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
MATERIAL Y METODOS.....	17
RESULTADOS.....	24
DISCUSION.....	29
LITERATURA CITADA.....	31

## RESUMEN

PATÍÑO DOMINGUEZ, GABRIELA. Comparación de tres técnicas de microaerobiosis para el aislamiento de *Campylobacter jejuni* partir de pollos (bajo la dirección de: Raúl Vázquez Martínez).

*Campylobacter jejuni* es una bacteria patógena entérica reconocida en todo el mundo como causante de diarrea. Su aislamiento requiere de ambiente microaerófilo. Con el fin de determinar el método óptimo para crear las condiciones atmosféricas necesarias en el aislamiento primario de *Campylobacter jejuni* fueron comparadas tres técnicas de microaerobiosis diferentes: velobiosis, principio de Fortner y mezcla de gases en tanque. Se utilizaron 50 ciegos de pollo, ya que *C. jejuni* es habitante normal de estas aves. El medio selectivo utilizado en todos los casos fué Butzler con 7 unidades de clistina. Cada muestra fué sometida a las tres técnicas de microaerobiosis e incubada a 42 °C durante 48 horas. Una vez detectado el desarrollo de colonias, se realizaron frotis húmedos con el fin de determinar la forma y movimiento característicos de *Campylobacter*. La técnica que mostró un mayor porcentaje de aislamientos fué la de velobiosis con un 70%. El porcentaje de casos positivos hallados en el procedimiento de la mezcla de gases en tanque fué de 67% y en el principio de Fortner solo se logró un 36%. Este trabajo demostró que la técnica de velobiosis es eficaz y económica en el aislamiento primario de *Campylobacter jejuni*.

## INTRODUCCION

En menos de una década, *Campylobacter jejuni* se ha convertido en uno de los más importantes agentes patógenos causantes de diarreas, tanto en humanos como en animales domésticos en diferentes partes del mundo (9,12,14,16,19,22,30,39,45,56). Algunos autores suponen que esta bacteria debería ser aislada por lo menos tan frecuentemente como los géneros *Salmonella* y *Shigella* (9,17,29,34,43,46,53). Sin embargo, los métodos utilizados para lograr el cultivo óptimo de *Campylobacter jejuni* requieren de varias condiciones especiales: atmósfera de microaerobiosis (5% O<sub>2</sub> y 10% CO<sub>2</sub> y 75% N<sub>2</sub>), una incubación a 42°C y medios selectivos (1,16,23,25,48,51,54). En la actualidad, en los países desarrollados, un gran número de laboratorios investigan el cultivo de *Campylobacter jejuni*. Diferentes medios de cultivo han sido descritos para su aislamiento y se han propuesto varios métodos para proveer las condiciones atmosféricas adecuadas (4,5,6,10,15,17,21). Con la introducción de técnicas simplificadas para el aislamiento de *Campylobacter jejuni*, el número de casos confirmados de la enfermedad causada por esta bacteria, se ha incrementado notablemente; en algunos países desarrollados como Inglaterra, Alemania, Canadá y Estados Unidos, esta bacteria es la principal causa de diarrea en humanos (3,22,31,36,45,54). En los países en vías de desarrollo, en donde las enfermedades gastroentéricas juegan un papel preponderante en la salud pública,

*Campylobacter jejuni* se ha colocado entre los principales agentes causantes de diarrea como *E. coli*, *E. Hystolitica*, *Salmonella* y *Shigella* (39,45,46,57). Sin embargo, en nuestro país, los trabajos realizados han sido escasos, en relación con los efectuados en los países desarrollados.

La comparación de las diferentes técnicas para lograr el aislamiento primario de *Campylobacter jejuni*, se justifica por el hecho de que, aún cuando se han descrito varios métodos para lograr las condiciones atmosféricas apropiadas para dicha bacteria, no siempre pueden realizarse en los laboratorios de diagnóstico, ya sea por falta de recursos materiales o económicos.

### Revisión bibliográfica.

Debido a que *Campylobacter jejuni* es una bacteria muy exigente en cuanto a las condiciones necesarias para su crecimiento, la identificación de este enteropatógeno progresó muy lentamente.

Al ser descubiertas por primera vez, las diferentes especies de *Campylobacter* fueron clasificadas entre los *Vibrios*. De hecho, el nombre del género fue *Vibrio* durante muchos años, hasta que Sebald y Veron (28) en 1963 propusieron el nuevo término genérico de *Campylobacter* en virtud de que estos organismos mostraban suficientes diferencias en cuanto a sus características bioquímicas y serológicas en comparación con los *Vibrios*. Las diferencias significativas en las bases de DNA fueron determinantes para su clasificación bajo un género separado.

*Campylobacter*, fué conocido primeramente como *Vibria* microaerófilo y reconocido por McFaydean y Stockman (8), los cuales en una extensa descripción sobre el aborto en ganado vacuno, hicieron mención de una forma de aborto en ovejas, causado por un agente en forma de curva y de rápida movilidad, por lo que se le clasificó como *Vibria* Smith y Taylor (46) confirmaron esta observación y le designaron el nombre de *Vibria fetus* en 1919.

Años más tarde, en 1939 Jones y Little (46) relacionaron a un vibrio microaerófilo como el agente causal de la disenteria de invierno o diarrea negra del ganado vacuno. Esta enfermedad caracterizada por una severa diarrea y una marcada supresión en la producción láctea, inicialmente apareció en unos cuantos individuos y fué diseminada subsecuentemente en el hato. Los animales afectados, presentaron una diarrea mucohemorrágica y dolor abdominal. Al llevar a cabo las necropsias se encontró inflamación en la mucosa del intestino delgado, de la cual se obtuvieron muestras para cultivo. La enfermedad se pudo reproducir en animales sanos alimentandolos con un cultivo puro de vibrio microaerófilo designado *Vibria jejuni* por Jones Orcutt y Little (26).

En 1944, Doyle (14) descubrió una diarrea de los cerdos causada por vibriones y sugirió que el agente etiológico\* de la disentería porcina era un vibrio denominándole *Vibria coli*.

Actualmente se sabe que esta enfermedad esta asociada con *Trepanema hyacisenterise*, asociado a *Campylobacter jejuni* y otros agentes.

La primera asociación del *Vibria* microaerófilo con enfermedades diarréicas en humanos fué descrita por Levy (1) en 1946, durante la descripción de un gran brote de gastroenteritis en Illinois. Se identificó microscópicamente a



unos organismos parecidos a vibrios en frotis directos de muestras diarreicas, pero no le fué posible cultivarlo a partir de las heces. No obstante, el reconocimiento del vibrio microaerófilo aislado de la sangre de estos pacientes, lo implicaba forzosamente como la causa de la enfermedad. Se sugirió además, que estas bacterias pudieran ser las mismas que las descritas por Jones y colaboradores en la disentería de invierno.

Cerca de diez años más tarde King (12) comparó las características de los vibrios microaerófilos entre varios aislamientos logrados a partir de muestras humanas y distinguió dos diferentes grupos de organismos, uno de los cuales crece a alta temperatura y corresponde a los aislados de pacientes con gastroenteritis.

El primer intento exitoso para aislar *Campylobacter* de las heces fué logrado por Cooper y Slee (8) en 1971. Estos investigadores notaron que *C. jejuni* era resistente a la cefalotina. Guiados por esta observación, sembraron una muestra fecal en agar sangre, agregándole discos de cefalotina. Después de cultivar en condiciones de microaerobiosis, las colonias de *Campylobacter* fueron observadas cerca de los discos con este antibiótico.

En 1972 Dekeyser y colaboradores (11) descubrieron un método para aislar *Campylobacter* pasando una suspensión de muestra a través de un filtro milipore (.65  $\mu$ m). Esto se basó en que muchos organismos fecales son demasiado grandes para pasar a través del filtro. Con este método, Dekeyser y col. lograron aislar *C. jejuni* a partir de heces humanas.

Al año siguiente Butzler y colaboradores (8), utilizaron esta técnica para examinar las heces de un gran número de pacientes con diarrea. Ellos lograron aislar *C. jejuni/coli* en un 5.2% de 800 niños con diarrea. Por el contrario sólo lograron un 1.3% de aislamientos en mil niños sin diarrea.

Fue hasta 1977 en que Skirrow (49) describió un método que elimina la necesidad de usar filtros y que consiste en sembrar la muestra directamente en un medio selectivo con antibióticos. De esta manera, encontró *C. jejuni* como la bacteria enteropatógena más común aislada de individuos con procesos diarreicos y que por el contrario, los aislamientos en pacientes sin diarrea eran muy escasos.

La alta frecuencia de enteritis causada con *C. jejuni* mostrada en el trabajo de Skirrow, ha sido confirmada por un gran número de artículos publicados en diversas partes del mundo (2,7,13,18,26,27,29).

Desde 1977 hasta nuestros días *Campylobacter jejuni* ha sido el tema de numerosas investigaciones.

### Técnicas para el aislamiento de *Campylobacter jejuni*.

Como ya se ha mencionado anteriormente, los métodos necesarios para el cultivo óptimo de *C. jejuni* requieren de varias condiciones especiales: medios selectivos con 3 o más agentes antimicrobianos, una atmósfera de microaerobiosis y una incubación a 42<sup>o</sup> C.

Entre los principales medios selectivos descritos actualmente se encuentran:

- **Butzler (Bu) (8):** Agar-Thioglicolato, bacitracina, novobiocina, ciclohexamida, colistina, cefalotina, 5-10% de sangre desfibrinada.
- **Blaser (Bl) o Campy Bap (1):** Agar base para *Campylobacter*, vancomicina, trimetoprim, polimixina B, cefalotina y anfotericina B.
- **Skirrow agar sangre (Sk) (49):** Agar base para *Campylobacter*, vancomicina, trimetoprim, polimixina B.

- **Preston (Pc) (4):** Agar base para *Campylobacter*, trimetropin, polimixina B, rifampicina y ciclohexamida.
- **Preston *Campylobacter* blood free (PBF) (21):** Agar sangre y cefalotina.
- **Butzler Virión (BV) (17):** Agar base para *Campylobacter*, cefopiracina, rifampicina, colistina y anfotericina B.
- **Preston modificado (Pm) (37):** Caldo nutritivo, 7% de sangre equina defibrinada, cefopiracina y anfotericina B.

Existen también varios métodos para proveer las condiciones atmosféricas adecuadas para el cultivo de *C. jejuni* (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, y 75% de N). Entre los más comunes están:

- **Mezcla de gases en tanque (25,4B):**

Este es uno de los métodos más antiguos para el cultivo de organismos microaerófilos y quizás el más común. Consiste en evacuar el aire de una jarra de anaerobiosis y remplazarlo por una mezcla de gases con las proporciones requeridas contenidas en un tanque especial. Este es un sistema eficaz, sin embargo requiere de un costo inicial de equipo (tanques, manómetros y jarras de anaerobiosis) y disponibilidad de espacio, lo cual lo hace poco adaptable a las necesidades de laboratorios pequeños. Además, resulta costoso cuando no se manejan volúmenes grandes de muestras.

- **Sobres comerciales (Campy Pak) (6,56):**

Este es el método más utilizado en países desarrollados. Los sobres contie-

nen la mezcla de gases en las condiciones requeridas, basta agregarles agua para su liberación. Cada sobre contiene bióxido de carbono y una pequeña cantidad de hidrógeno. El catalizador contenido en el sobre, permite la combinación del hidrógeno con el oxígeno; como la cantidad de hidrógeno es limitada, el nivel de oxígeno solamente se reduce en las proporciones requeridas. Este método ha resultado ser eficaz en el aislamiento de *C. jejuni*, lamentablemente es poco disponible en nuestro país además de ser altamente costoso ya que los sobres son de importación. El costo es muy elevado cuando es necesario manejar volúmenes grandes de muestras.

— **Jarra con vela o velobiosis (1,34,56,57):**

Este ha sido un método tradicional, sencillo y económico. Solamente requiere de un recipiente con cierre hermético y una vela, la cual se introduce encendida al recipiente y éste se cierra herméticamente, lo anterior por la combustión, reduce la concentración de oxígeno. Sin embargo, la reducción en la tensión de oxígeno no siempre es óptima para el crecimiento de algunas bacterias microaerófilas. Las proporciones atmosféricas obtenidas en este sistema son: 17% de O<sub>2</sub>, 3% de CO<sub>2</sub>. De cualquier manera, este método ha resultado ser satisfactorio en el aislamiento de bacterias microaerófilas como *C. jejuni* (38). Su uso resulta práctico para laboratorios de rutina o con escasa disponibilidad de equipo.

— **Principio de Fortner (27):**

En este método, la reducción en la tensión de oxígeno es obtenida mediante el cultivo simultáneo de la bacteria microaerófila deseada y alguna bacteria anaerobia facultativa en un sistema cerrado. Con este fin se puede utilizar

*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *K. aerogenes* entre otros. El rápido crecimiento de estos organismos reduce la tensión de oxígeno, dando así la oportunidad para el desarrollo de organismos microaerófilos como *C. jejuni*. En este sistema, para lograr aislamientos primarios de *C. jejuni* se puede emplear un medio selectivo y dividir la caja del medio en 2. En uno de sus lados se siembra la muestra sospechosa y del otro lado alguna bacteria anaerobia facultativa que sea resistente a las concentraciones de los antibióticos empleados en el medio. Si se quiere conservar un cultivo puro de *C. jejuni*, se puede remplazar el medio selectivo por agar sangre, eliminando así la necesidad de seleccionar una bacteria resistente a los antibióticos del medio selectivo. Otra manera de aislar *C. jejuni* utilizando el mismo principio, consiste en sembrar la muestra sospechosa en el medio selectivo deseado y en un medio de rutina sembrar una bacteria anaerobia facultativa. Karmali y Flening (27) describieron este sistema utilizando bolsas de plástico (18 x 20 cm) con sello hermético reversible, una vez introducidas ambas cajas sembradas, evacuaron el aire manualmente lo más posible y sellaron la bolsa. Estos autores, utilizando un cultivo puro de *C. jejuni*, lograron un 100% de aislamientos en este sistema, lo cual demuestra su eficacia. Este método simple y económico, elimina el uso de jarras de anaerobiosis y tanques de gas; además su uso es práctico para laboratorios pequeños. Sin embargo, no es recomendable cuando es necesario cultivar durante períodos prolongados.

#### — Combinación de acero, cobre y bicarbonato de sodio (24):

En este sistema, el oxígeno es consumido cuando el acero es oxidado en presencia del cobre. Pennie y colaboradores (43) describieron este sistema.

método utilizando bolsas de plástico (21x28 cm) a las cuales les introdujeron dos vasos medicinales; uno conteniendo 1.5 gr de alambre acerado (grado 0) previamente sumergido en solución acuosa con 2.5% de  $\text{CuSO}_4$ , y en otro vaso, una tableta de Alka Seltzer \* disuelta en 10 ml de agua. A cada bolsa le introdujeron 4 cajas y después extrajeron el aire manualmente y sellaron. Este es un sistema sencillo, económico y portátil. Resulta útil cuando es necesario trabajar en situaciones de campo. Sin embargo, el material utilizado probablemente no sea más accesible comparativamente con el método de velobiosis; además pudiera ser más laborioso cuando se requirieran ensayos repetitivos o rutinarios.

El objetivo de este trabajo fué evaluar 3 sistemas de microaerobiosis (principio de Fortner, velobiosis y mezcla de gases en tanque) en el aislamiento de *C. jejuni* a partir de ciegos de pollo.

### **Características de *Campylobacter jejuni***

*Campylobacter jejuni* es un agente etiológico común causante de enteritis aguda en el hombre y animales domésticos. Es considerado una zoonosis importante (1,8,26). Ha sido aislado frecuentemente del tracto gastrointestinal de animales domésticos sanos y enfermos, así como de animales de zoológico y mascotas (2,3,14,32,45,51). En las aves tanto domésticas como silvestres, *C. jejuni* ha sido ampliamente reconocido como habitante normal de la flora intestinal (2,14,16,20).

**Morfología:** Es una bacteria delgada en forma de "coma" no muy marcada, que mide 0.2 a 0.5 micras de ancho por 1.5 a 4.0 micras de largo, posee uno o dos flagelos. Los que adoptan forma de "coma" tienen un flagelo polar único, mientras que los que tienen forma de "S" tienen flagelos bipolares, cuando se agrupan varias bacterias muestran formaciones espirales (19,23,25).

Su movimiento es característico, similar al de un dardo con trayectoria de tirabuzón, lo cual facilita su diagnóstico cuando se observa en el microscopio de campo oscuro o en el de contraste de fases (42).

Es gramnegativo y se reproduce por fisión binaria (46).

**Características de las colonias:** Por lo general, las colonias aparecen a las 48 horas de incubación. Estas son pequeñas (2mm x), convexas, redondas y

mucoideas. Al principio son translúcidas, como pequeñas gotas de agua, pero con el tiempo se tornan de un color gris opaco. Son de consistencia untuosa. No producen hemólisis (7,15,25).

**Reacción a pruebas bioquímicas:** Como todas las especies de su género, no fermentan ni oxidan a los carbohidratos y tampoco hidrolizan a la gelatina o urea. *C. jejuni* produce H<sub>2</sub>S y catalasa (55).

### **Enteritis por *Campylobacter jejuni***

La enteritis por *C. jejuni* es una enfermedad infecciosa caracterizada por diarrea profusa, de curso agudo generalmente, que afecta al hombre y animales domésticos (8).

Doyle (1981) (14), enumeró las enfermedades causadas por *C. jejuni* entre las cuales están: aborto en ovejas, disentería en bovinos, hepatitis en pollos, infección urinaria y enteritis aguda en el hombre, monos, perros y gatos. Un caso de meningitis fué descrito por Norrbi (40). Según la evidencia de los datos obtenidos en un reciente y detallado artículo sobre el género *Campylobacter*, García y colaboradores (14), deducen que *Campylobacter* no es un patógeno entérico primario en grandes especies. A pesar de esto, puede ser un importante patógeno oportunista en cerdos, bovinos y ovinos tratados con antibióticos, así como privados del suministro del calostro o como invasor secundario en infecciones diarreicas virales o bacterianas.

**Frecuencia:** Esta enfermedad esta distribuida mundialmente. Ha sido descrita en EUA, Australia, Bélgica, Canadá, Inglaterra, India, Suiza, Holanda,



Zaire, Sudafrica, Ruanda y México entre otros (3,6,12,14,28,35,36). Hay insuficiencia de datos hasta ahora para mostrar la incidencia estacional de esta enfermedad aunque algunos autores sugieren que es mayor en verano (28,39,46). Las condiciones insalubres parecen favorecer la enfermedad (39). Los países altamente desarrollados han registrado una gran incidencia de la enfermedad debido a sus eficientes técnicas de diagnóstico y a que los enteropatógenos más comunes (*Salmonella*, *Shigella* y *E. coli*) han disminuído debido al control sanitario. En los países subdesarrollados, a pesar de que no han sido citados tantos casos de campylobacteriosis, son susceptibles a padecer la enfermedad en mayor grado debido a las condiciones higiénicas, que en la mayoría de los casos afecta a hombres y mujeres, habiendo mayor incidencia en niños y jóvenes (49,58). *C. jejuni* también ha sido encontrado en animales domésticos como causa de enfermedad. Los animales jóvenes son los más afectados (13,32).

*C. jejuni* se ha encontrado como comensal en el tracto intestinal de los ovinos y ocasionalmente ha sido causa de aborto en el ganado (12,14). En bovinos produce también mastitis experimental, la bacteria puede entrar por ubre (26). En hamster produce la enfermedad conocida como "cola mojada" (12).

**Signos clínicos:** El período de incubación varía entre los dos y cinco días, con un rango de dos a once días (49). Por lo general, el primer signo que se presenta es dolor abdominal periumbilical acompañado de cefaleas (28). La fiebre es común aunque algunos pacientes se presentan afebriles (16). Al principio, la diarrea se presenta en forma moderada, más tarde se vuelve profusa, acuosa y finalmente hemorrágica (57). En un trabajo efectuado en niños canadienses, estos presentaron diarrea hemorrágica en un 90% (14). El

vomito y la deshidratación son signos poco comunes<sup>6</sup>(39). El curso de la enfermedad es por lo general de 7 días (50). La muerte ocurre solamente en individuos con deficiencias inmunológicas, enfermedades de cirrosis o mal nutrición (47).

**Diagnóstico:** Debido a que esta enfermedad no presenta signos patognomónicos y que por lo mismo se pudiera confundir con otras enfermedades entéricas con cuadros clínicos similares, es necesario recurrir al laboratorio para obtener un diagnóstico confiable.

Durante la fase aguda de la enfermedad, se puede obtener un diagnóstico presuntivo rápido mediante frotis directo de muestra fecal observada en el microscopio de campo oscuro (42). El diagnóstico puede ser confirmado mediante el cultivo en medios selectivos (54).

Las pruebas serológicas (aglutinación, fijación de complemento, inmunofluorescencia), sólo pueden hacerse en la fase aguda de la enfermedad y no han tenido aplicación práctica (23).

**Tratamiento:** Por lo general, los pacientes sanan espontáneamente(28). El uso de protectores de mucosa (caolín y pectina) es útil (16). *C. jejuni* es altamente sensible a la eritromicina, furazolidona, gentamicina y tetraciclina (13); poco sensible al cloranfenicol y ampicilina (48). La eritromicina ha sido recomendada como el antibiótico más adecuado en el tratamiento de la enteritis por *C. jejuni*(23). La gentamicina administrada parenteralmente ha sido satisfactoria en el tratamiento de septicemia por *C. jejuni*. Butzler y colaboradores (8) han tratado algunos casos satisfactoriamente con neomicina administrada oralmente.

El uso de tetraciclinas y cloranfenicol no ha sido eficaz (28). Además su uso es restringido debido a los efectos colaterales y a la delicada administración en infantes. Resumiendo, la eritromicina en el hombre, es el medicamento más adecuado en el tratamiento de la enteritis por *C. jejuni* (8,14,16,41).

**Patogenia:** El organismo entra por vía oral, se replica en intestino delgado y penetra por mucosa. *C. jejuni* es una bacteria productora de citotoxinas y endotoxinas, sin embargo, la investigación de estas toxinas como factor virulento no ha tenido mucho éxito (23,25,27). Es reconocido por muchos investigadores que la invasividad es el mecanismo más importante en la patogenia de *C. jejuni* (1,8,12,14).

**Aspectos epidemiológicos:** Las aves han sido encontradas como los principales reservorios naturales del germen (2,8,14,18,20,33). Es probable que se deba a que la temperatura de estos animales sea adecuada para el crecimiento de esta bacteria (20,28). Butzler (6) ha reproducido experimentalmente la enfermedad en pollos alimentados con *C. jejuni* a partir de aislamientos humanos. Shmibert (48) sugirió que el contacto de la defecación de las aves con el ganado ovino puede originar brotes de aborto. Es posible pensar que un mecanismo similar suceda en la infección de otros animales como bovinos, perros y gatos.

Parson y colaboradores (49) sugirieron que los pájaros silvestres pueden contaminar fácilmente el agua con sus defecaciones.

La leche también ha sido reconocida como una fuente de infección. Kingdon (26) ha implicó a la leche en brotes severos de campylobacteriosis, uno de los cuales afectó a más de dos mil personas.

La ingestión de alimentos contaminados con *C. jejuni* principalmente pollo o leche, constituyen la mayor fuente de infección en humanos; una pequeña proporción es probable que ocurra por el contacto estrecho con animales domésticos (2,8,18,30,31,44). En muy pocas ocasiones ocurre el contagio directo de persona a persona. Es probable que ocurra por actividad sexual-anal-genital-oral (35).

## MATERIAL Y METODOS

### Toma de muestras.

Todas las muestras utilizadas en este trabajo, fueron obtenidas del contenido cecal de cincuenta ciegos de pollo procedentes de un centro de distribución. Estas aves fueron seleccionadas porque *C. jejuni* pertenece a su flora normal(44). El propósito de usar este tipo de muestras en vez de un cultivo puro de *C. jejuni* fué el de proporcionar una aplicación práctica para los casos clínicos en que es necesario recurrir al diagnóstico de laboratorio. Cada ciego fué transportado en refrigeración al laboratorio en una bolsa de plástico marcada con el número de muestra.

### Medio de cultivo.

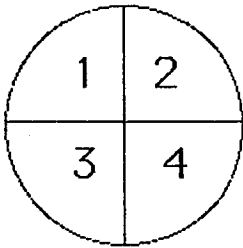
El medio selectivo usado en este trabajo fué Butzler con 7 unidades de colistina (Bu7).

Las cantidades necesarias para 100 ml son:

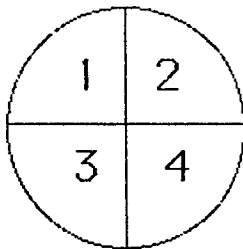
agar-agar	3.00	gr.
tioglicolato	2.98	gr.
bacitracina	2,500	u.i.
colistina	700	u.i.
cefalotina	1.50	mg.
novobiocina	.50	mg.
ciclohexamida	5.00	mg.
agua destilada	100	ml.
sangre	5 - 10	%

\* Debido al alto costo y a la poca disponibilidad de la bacitracina en nuestro país, hubo la necesidad de suprimirla en este trabajo.

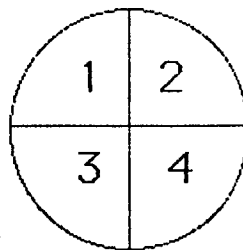
Una vez obtenido el medio, cada caja fue marcada con cuatro divisiones; a cada una de las cuales, se le marcó con el número de muestra correspondiente



**Principio de Fortner**

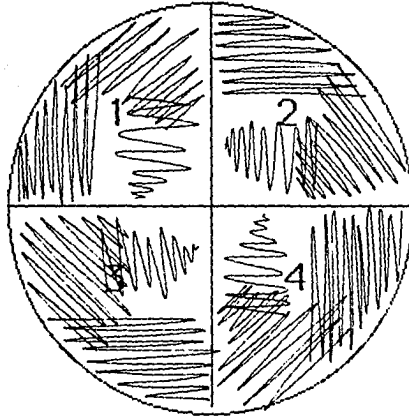


**Velobiosis**



**Mezcla de gases en tanque**

Las muestras cecales fueron obtenidas cortando los ciegos con tijeras estériles e introduciendo hisopos también estériles para extraer el contenido intestinal. Se utilizaron cincuenta hisopos, uno para cada muestra. Una vez sembrada la muestra con el hisopo, se realizó la técnica para aislamiento en cultivo puro mediante el asa microbiológica.



### **Incubación.**

Una vez sembradas las cajas, se sometieron a los siguientes sistemas de microaerobiosis:

1.- El primer grupo de muestras fué sometido a la técnica de microaerobiosis del principio de Fortner ( descrito en el capítulo de introducción ). El total de cajas utilizadas para sembrar las muestras en este grupo fué de trece; igual número de cajas fué utilizado para sembrar *E. coli* en el medio de TSA. Posteriormente, todas las cajas se introdujeron en un recipiente el cual se selló herméticamente con vaselina, de tal forma que por cada caja sembrada con la muestra, se incubó una caja sembrada con *E. coli*.

2.- En el segundo grupo, la técnica utilizada fué velobiosis. Se introdujeron las trece cajas sembradas con las muestras en una jarra para anaerobiosis, utilizando una vela y aprovechando el cierre hermético de la jarra.

3.- Por último en el tercer grupo, se utilizó la mezcla de gases en tanque. La concentración requerida de CO<sub>2</sub>, fué proporcionada mediante la evacuación del 95% del aire contenido en una jarra de torval para anaerobiosis, sustituyendo posteriormente este porcentaje mediante la mezcla de gases contenida en un tanque con 80% de N<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> y 10% de H<sub>2</sub>; logrando así obtener una atmósfera aproximada dentro de la jarra de 76% de N<sub>2</sub>, 9.50 de CO<sub>2</sub>, 9.50 de H<sub>2</sub> y 5% de O<sub>2</sub>.

Todas las cajas sembradas y mantenidas bajo los diferentes sistemas se incubaron a 42°C durante 48 horas.



### Parámetros de evaluación.

Los parámetros utilizados para la evaluación y comparación de las tres técnicas de microaerobiosis fueron los siguientes:

- 1º frotis de identificación
- 2º conteo de colonias de *C. jejuni*
- 3º tamaño de las colonias de *C. jejuni*
- 4º conteo de colonias contaminantes

### Identificación del germen (frotis).

Transcurridas 48 horas de incubación, las colonias de *Campylobacter* fueron visualmente identificadas en las cajas por sus características: pequeñas, translúcidas o grises, convexas y mucoides. Generalmente fué fácil distinguir las de las colonias contaminantes. Esta primera impresión visual, fué confirmada realizando frotis para la observación en el microscopio de campo oscuro, con el fin de determinar la forma y movimiento característicos de *Campylobacter*. A los resultados obtenidos se les dió la siguiente interpretación:

- 0.....no se logró identificar a *C. jejuni*.
- 1.....fué difícil identificar a *C. jejuni*, ya que el frotis se encontró muy contaminado
- 2.....la presencia de ciertos microorganismos contaminantes dificultaron un poco la observación de *C. jejuni*.
- 3.....sin contaminación aparente la identificación de *C. jejuni* se logró fácilmente

### Conteo de colonias de *C. jejuni*.

Una vez identificadas las colonias de *Campylobacter*, se procedió a contarlas tomando en cuenta la estría en donde se encontraron, por ejemplo 3<sup>o</sup>/4 (tercera estría, cuatro colonias).

La interpretación que se utilizó para el conteo de colonias fué la siguiente:

0	sin crecimiento de colonias de <i>C. jejuni</i>
1	crecimiento escaso, >3 colonias en la primera estría
2	crecimiento moderado, > 3 colonias en la segunda estría
3	crecimiento abundante, > 3 colonias en la tercera estría.

### Tamaño de las colonias de *C. jejuni*.

El tamaño de las colonias de *C. jejuni* fué también tomado en cuenta como parámetro de comparación en los tres sistemas de microaerobiosis, ya que el diámetro de las colonias de *C. jejuni* varía de .5 mm a 5 mm con un promedio de 2mm (7,25), se dió la siguiente interpretación:

1	colonias muy pequeñas	aprox. .5 - 1 mm x
2	colonias pequeñas	aprox 1 - 2 mm
3	colonias medianas	aprox 3 - 5 mm

### Conteo de colonias contaminantes.

El grado de contaminación fué determinado mediante la cuantificación del número de colonias contaminantes que crecieron en cada muestra, la interpretación a los datos obtenidos fué la siguiente:

0	sin crecimiento de colonias contaminantes
1	> 3 colonias en la primera estría
2	> 3 colonias en la segunda estría
3	> 3 colonias en la tercera estría

Una vez identificados todos los casos positivos, se determinó en cada muestra si fué positiva en las tres técnicas, en dos, o en una en particular. La interpretación utilizada para estos resultados fué la siguiente:

<b>O</b>	la muestra no resultó positiva en ninguna técnica.
<b>F</b>	positiva únicamente en el principio de Fortner
<b>V</b>	positiva únicamente en velobiosis
<b>T</b>	positiva únicamente en mezcla de gases en tanque
<b>FT</b>	positiva en Fortner y tanque
<b>FV</b>	positiva en Fortner y velobiosis
<b>VT</b>	positiva en velobiosis y tanque
<b>FVT</b>	positiva en Fortner velobiosis y tanque

### Análisis de los datos.

Para realizar el análisis de los datos obtenidos se utilizó la prueba  $\chi^2$  (52).

## RESULTADOS

El 86% (43) de los cincuenta ciegos de pollo muestreados, resulto positivo a *C. jejuni* por lo menos en una de las tres técnicas probadas. De esta cantidad, el número de positivos que correspondió para cada una de las técnicas empleadas fué:

No. de positivos	técnicas de microaerobiosis
0	FT
2	F
2	FV
6	T
8	V
12	VT
13	FVT
43	total

La técnica que mostró mayor porcentaje de aislamientos de *C. jejuni* fué la de velobiosis con un 70%; en la mezcla de gases en tanque, se obtuvo un 67% y en el principio de Fortner sólo se logró un 36%. Aunque al parecer, el principio de Fortner fué la técnica con un menor porcentaje de aislamientos, las diferencias entre las tres técnicas no fueron significativas ( $\chi^2=5.89$ ,  $gl=2, p>0.05$ ).

Por lo general, la identificación de *C. jejuni* en el microscopio de campo oscuro se logró fácilmente en las tres técnicas probadas. Sin embargo, en promedio, *C. jejuni* se logró observar más claramente en los cultivos sujetos a la técnica de velobiosis.

Con el fin de determinar el grado de crecimiento de *C. jejuni* se establecieron valores numéricos para su interpretación dependiendo de la estría hasta

donde llegó el crecimiento de las colonias ( ver material y métodos ), clasificándose así en crecimiento escaso, moderado y abundante (tabla 2). El porcentaje que correspondió al crecimiento abundante de *C. jejuni* para cada técnica fué : velobiosis 85%, tanque 64% y Fortner 29%.

La técnica que mostró mayor cantidad de crecimiento abundante de *C. jejuni* fué la de velobiosis, sin embargo, las diferencias no fueron significativas ( $\chi^2=5.49$ ,  $gl=2$ ,  $p > 0.05$ ).

La tabla 2, muestra los resultados obtenidos en el tamaño de las colonias de *C. jejuni*. Las colonias más grandes fueron obtenidas en la mezcla de gases en tanque. En promedio, el tamaño de las colonias de *C. jejuni* en la técnica de velobiosis fué ligeramente mayor que en el principio de Fortner.

El promedio de la cantidad de colonias contaminantes crecidas en cada técnica, se muestra en la tabla 2. La técnica que obtuvo un mayor crecimiento de colonias contaminantes fué velobiosis logrando un crecimiento hasta la segunda estria promedio. La técnica que mostró un menor grado de contaminación fué la de mezcla de gases en tanque.

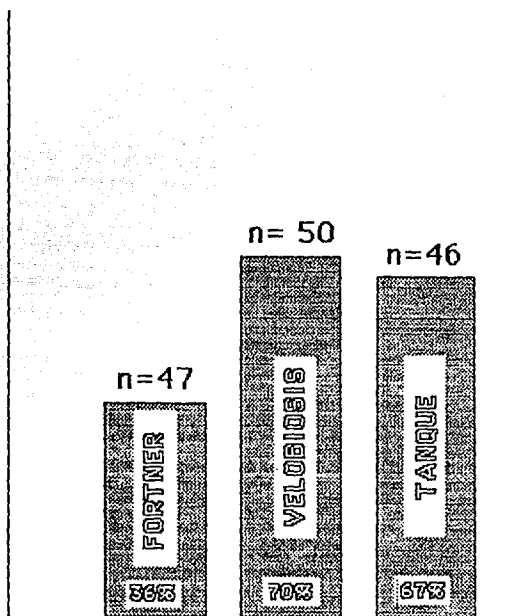
### Resumiendo los resultados.

1. el 86% de las muestras fueron positivas a *C. jejuni* por lo menos en una de las tres técnicas de microaerobiosis ( Fortner, velobiosis y tanque).
2. de este 86%, solamente un 30% de aislamientos de *C. jejuni* coincidió en las tres técnicas

3. el mayor porcentaje de aislamientos de *C. jejuni* ocurrió en la técnica de velobiosis
4. la diferencia que hubo entre el porcentaje de aislamientos de *C. jejuni* obtenido en el principio de Fortner y los otros dos sistemas probados fué marcada, pero no estadísticamente significativa
5. las técnicas de velobiosis y tanque, mostraron en promedio un crecimiento abundante de *C. jejuni*, por el contrario, en el principio de Fortner, el crecimiento de *C. jejuni* fué en promedio escaso.
6. las colonias aisladas de *C. jejuni* más grandes se encontraron en mezcla de gases en tanque; las más pequeñas en el principio de Fortner.
7. el crecimiento de colonias contaminantes fué más numeroso en la técnica de velobiosis.

Tabla 1.

Porcentaje de aislamiento de *Campylobacter jejuni* logrado en las tres técnicas de microaerobiosis: principio de Fortner, velobiosis y tanque.



n = número de muestras logradas

Tabla 2: Resultados obtenidos en las tres técnicas de microaerobiosis (Fortner, velobiosis y tanque) en los parámetros de: grado de crecimiento de *C. jejuni*, tamaño de sus colonias y grado de contaminación.

TECNICAS DE MICROAEROBIOSIS	CASOS POSITIVOS %	CRECIMIENTO INTERPRETADO EN GRADOS NUMERICOS		
		A*	B	C
		FORTNER	36	1.96
VELOBIOSIS	70	2.80	2.08	2.1
TANQUE	67	2.54	2.32	1.6

\* A Promedio del crecimiento alcanzado por *C. jejuni*:

- 1 >3 colonias en I estría.
- 2 >3 colonias en II estría.
- 3 >3 colonias en III estría.

B Promedio del tamaño de las colonias de *C. jejuni*:

- 1 <2 mm.
- 2 =2 mm.
- 3 >3 mm.

C Promedio del crecimiento alcanzado por las colonias contaminantes:

- 1 >3 colonias en I estría.
- 2 >3 colonias en II estría.
- 3 >3 colonias en III estría.



## DISCUSION

Muchos investigadores, utilizando cultivos puros de *Campylobacter jejuni*, han demostrado que su crecimiento óptimo ocurre en una concentración atmosférica de 5% O<sub>2</sub> y 10% CO<sub>2</sub> (8,14,22). Sin embargo, pocos artículos comparan la atmosfera necesaria para lograr aislamientos primarios de *C. jejuni* a partir de contenido intestinal (55).

El hecho de que *Campylobacter jejuni* no se haya podido aislar en la misma proporción en las tres técnicas de microaerobiosis utilizadas, presupone que estas suministran diferentes concentraciones atmosféricas.

Varios autores, sostienen que el mejor método para aislar *C. jejuni* es utilizar la mezcla de gases en tanque (23,25). A pesar de que en este estudio, la técnica de velobiosis obtuvo el porcentaje mas alto en el aislamiento de *C. jejuni*, la técnica de mezcla de gases en tanque mostró una menor contaminación y un crecimiento de colonias de mayor tamaño que en los otros dos metodos probados. Tal vez el bajo porcentaje de aislamientos en este caso se deba a que no se controlo con precisión la cantidad de oxígeno, ya que la mezcla no contenía este elemento. Por otro lado, en la técnica de velobiosis es probable que no se haya logrado un 100% de aislamientos por el crecimiento de colonias contaminantes.

Los resultados alcanzados en el principio de Fortner fueron muy pobres en relación a las técnicas de velobiosis y mezcla de gases en tanque. Dentro del grupo de muestras que se utilizó en este método, se perdieron tres por congelamiento, pero este hecho no explica el bajo porcentaje de aislamiento de *C. jejuni* logrado en este sistema. No obstante que la bacteria (*E.coli*), utilizada en este método para lograr la reducción de oxígeno logro crecer

abundantemente, el desarrollo de *C. jejuni* se mostro en promedio escaso. Es probable que se deba a que el crecimiento de *C. jejuni* ocurrió mas lentamente en este sistema que en las otras dos técnicas. Tal vez se pudieran obtener mejores resultados combinando el principio de Fortner con la técnica de velobiosis, pero esta es solo una hipótesis que probablemente requiera una futura investigación. Sin embargo, el hecho de haber podido lograr aislaminetos primarios de *C. jejuni* demuestra que si bien el principio de Fortner no es el óptimo, si logra proporcionar las condiciones atmosféricas suficientes para su crecimiento.

En resumen, la técnica de velobiosis empleada para crear las condiciones atmosféricas necesarias en el aislamiento primario de *Campylobacter jejuni* a partir de ciegos de pollo, resultó ser la mas adecuada en este trabajo. La técnica de mezcla de gases en tanque también rsultó ser eficaz, sin embargo, hay que considerar que esta técnica implica un costo inicial y disponibilidad de espacio, características que no se adecúan fácilmente en laboratorios pequeños o con escasa disponibilidad de equipo.

Este trabajo concluye en que en México, aún cuando los recursos son cada vez menores, no es necesario recurrir a técnicas sofisticadas de microaerobiosis.

## LITERATURA CITADA

- 1 Blaser, M.J., and Barth, L.R. : *Campylobacter* enteritis. N. Engl. J. Med., 305: 1444 - 1452 (1981).
- 2 Blaser, M.J., Laforce, F.M., Wilson, N.A.: Reservoirs for human *Campylobacteriosis*. J. Infect. Dis., 141: 665 -669 (1980).
- 3 Blaser, M.J., Taylor, D.N. and Feldman, R.A.: Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections. Epidemiol. Rev., 5: 157-176 (1981)
- 4 Bolton, F.J., and Robertson, L.: A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. J. Clin. Pathol., 35: 462-467 (1982).
- 5 Bopp, Cheryl A., Wells Joy G., and Barret, T.: Trimethoprim activity in media selective for *Campylobacter jejuni*. J. Clin. Microbiol., 16: 808 - 812 (1982).
- 6 Buck, G.E., Fojtasek, C., Calvert, K., and Kelly, M.T.: Evaluation of the Campy pak II gas generator system for isolation of *Campylobacter fetus subsp. jejuni*. J. Clin. Microbiol., 15: 41-42 (1982)
- 7 Buck, G.E., and Kelly, M.T.: Effect of moisture content of the medium on colony morphology of *Campylobacter fetus s. jejuni*. J. Clin. Microbiol., 14: 585 - 586 (1981)
- 8 Butzler, J.P., and Skirrow, M.B.: *Campylobacter* enteritis. Clin. Gastroenterol., 8: 737 - 765 (1979)
- 9 Chan, R., Hannan, B., and Munro, R.: Use of a selective enrichment broth for isolation of *Campylobacter fetus subsp. jejuni* from human feces. Pathology, 17: Clin. Microbiol., 17: 640 -641 (1985)
- 10 Chan, T.H., and Mackenzie, A.M.: Enrichment medium and control system for isolation and *Campylobacter fetus subsp. jejuni* from stools. J. Clin. Microbiol., 15: 12 - 15 (1982)

- 11 Dekeyser, P., Gossoin - Detrain, M., Butzler, J.P., Sternon, J.: Acute enteritis due to related vibrio: first positive stool cultures. Journal of Infectious Disease, 125: 390 - 392 (1972)
- 12 Fox, J.G.: Campylobacteriosis a 'new' disease in laboratory animals. Labb. Anim. Sc. 32: 625 - 636 (1982)
- 13 Fox, J.G., Dzink, J.L., and Ackerman, J.I.: Antibiotic sensitivity patterns of *Campylobacter jejuni/coli* isolated from laboratory animals and pets. Laboratory Animal Science, 34: 264 - 26 (1984).
- 14 García, M.M., Eaglesome, M.D., and Rigby, C.: *Campylobacters* important in veterinary medicine. Veterinary Bulletin, Comm.Bur. of An Health, 53 (9): 793 - 818 (1983).
- 15 Gilchrist, M.J.R., Grewell, C.M., and Washington II, J.A.: Evaluation of media for isolation of *Campylobacter fetus subsp. jejuni* from fecal specimens. J. Clin. Microbiol., 14: 393 - 395 (1981)
- 16 Gillespie, J.H., and Timotey, J.F.: Hogan y Bruner. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. 4ª ed. La Prensa Médica Mexicana, Cornell University Press (1981)
- 17 Goossens, H., De Boeck, M., and Butzler, J.P.: A new selective medium for the isolation of *Campylobacter jejuni* from human feces. Eur. J. Clin. Microbiol., 2: 398 - 394 (1983)
- 18 Grant, I.H., Richardson, N.J., and Bokkenheuser.: Broiler chickens as a potencial source of *Campylobacter* infections in humans. J. Clin. Microbiol., 2: 508 - 510 (1980)
- 19 Hébert, A.G., Hollis, D.G., Weaver, R.E., Lambert, M.J., and Moss, W.: 30 Years of *Campylobacters* biochemical characteristics and a biotyping proposal for *Campylobacter jejuni*. J. Clin. Microbiol., 15: 1065 - 1073 (1982)
- 20 Hofstan, S.M., Calnek, W.B., Helmboldt, F.C., Reid, M.W., Yoder, W.H.: Diseases of pultry., seventh edition., American Association of Avian Pathologist, USA., p. 271 (1984)

- 21 Hutchinson, D.N., and Bolton, F.J.: Improved blood free selective medium for the isolation of *Campylobacter jejuni* from fecal specimens. J. Clin. Pathol., 37: 956 - 957 (1984)
- 22 Janssen, D., and Helstad, A.G.: Isolation of *Campylobacter fetus subsp. jejuni* from human fecal specimens by incubation at 35-42°C. J. Clin. Microbiol., 16: 398 - 399 (1982)
- 23 Jawest, Ernest., Melnick, Joseph L. y Adelberg, Edward A.: Microbiología médica. El Manual Moderno, 12a. ed. p. 255 (1985)
- 24 Jurgensen, C.A., and Jurgensen, L.D.: Cooper oxidation: an alternative method for obtaining anaerobiosis. Rev. Bras. Patol. Clin., 18: 58 - 63 (1982)
- 25 Kaplan, R.L.: *Campylobacter*, Manual of clinical microbiology. Edited by Lennette E., Baerows A., Hoosler, W.Jr. and Truant, J., American Society for microbiology, Washington. 235-241 (1980)
- 26 Kaplan, R.L., Goodman, L.J., Barret, J.E., Gordon, M.T. and Landraw, W.: Comparison of rectal swabs and stool cultures in detecting *Campylobacter fetus subsp. jejuni*. J. Clin. Microbiol., 15: 959-60 (1982)
- 27 Karmali, M.A., and Fleming, P.C.: Application of the Fortner principle to isolation of the *Campylobacter* from stools. J. Clin. Microbiol., 10: 245-247 (1979)
- 28 Karmali, M.A., and Fleming, P.C.: *Campylobacter* enteritis. Review article. CMA. J., 120: 1525 - 1532 (1979).
- 29 Klipstein, F.A., and Engert, R.F.: Properties of crude *Campylobacter jejuni* heat-labile enterotoxin. Infection and Immunity, 45: 314-319 (1984)
- 30 López, Brea M., Pickering.: Presencia de *Campylobacter* en la flora intestinal de pollo como posible origen de enteritis humana. Rev. San. Hig. Pub., 55: 1119 - 1120 (1981)

- 31 Lovett, J., Hunt, J., and Francis, D.W.: Effect of temperature, duration of incubation and P.H. of the enrichment culture on the recovery of *Campylobacter jejuni* from eviscerated market chickens. Can. J. Microbiol., 29: 803-806 (1983)
- 32 Luechtefeld, N.W. Cambre, R.C., Wang, W.C.: Isolation of *Campylobacter fetus subsp. jejuni* from zoo animals. J. Am. Vet. Med. Assoc. 179: 1119-22 (1981)
- 33 Luechtefeld, N.W., Lou, Wang W., Blaser, M.J., and Reller, L.B.: Evaluation of transport and storage techniques for isolation of *Campylobacter fetus subsp. jejuni* from turkey cecal specimens. J. Clin. Microbiol., 13: 438- 443 (1981)
- 34 Luechtefeld, N.W. eller, L.B., Blaser, M.J., and Wang, Wen - Lan.: Comparison of atmospheres of *Campylobacter fetus subsp. jejuni* from animal specimens: 5% oxygen versus candle jar. J. Clin. Microbiol., 15: 53 -57 (1982)
- 35 Mc. Millan, A., Mc Neillage, G.J.C., and Watson, K.C.: The prevalence of antibodies reactive with *Campylobacter jejuni* in the serum of homosexual men. Journal of Infection., 9: 63 -68 (1984)
- 36 McMyne, P.M.S., Penner, J.L., Mathias R.G., Black, W.A. and Hennessy J.N.: Serotyping of *Campylobacter jejuni* isolated from sporadic cases and outbreaks in British Columbia. Jour. of Clin. Microbiol. 16: 281-285 (1982).
- 37 Merino, F.J., Agulla, A., Villasante, P.A., Díaz, A., Saz, J.V., and Velazco, A.C.: Comparative efficacy of seven selective media for isolation *Campylobacter fetus subsp. jejuni*. J. Clin. Microbiol. 24: 451-452 (1986)
- 38 Millé León, L.E.: Frecuencia del aislamiento de *Campylobacter jejuni* a partir de perros de la ciudad de México. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Autónoma de México, D.F. (1987)

- 39 Morales, C.M., García, P.M., Pedroza, J.L. y col.: Frecuencia de *Campylobacter fetus* y *Yersinia enterocolitica* en niños con diarrea aguda. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex., 41: 86-89 (1984)
- 40 Norrby, R., McCloskey, R.V., Zackrisson, G., and Falsen, E.: Meningitis caused by *Campylobacter fetus* ssp. *jejuni*. Br. Med. J., 28: 1164 (1980)
- 41 Pai Ch., Gillis, G., Toumanen, E., et al: Erythromycin in treatment of *Campylobacter* enteritis in children. Am. J. Dis. Child., 137: 286-88 (1983)
- 42 Paisley, J.W., Mirret, S., Lauver, B.A., Roe, M. and Reller, L.B.: Dark-field microscopy of human faeces for presuntive diagnosis of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* enteritis. J. Clin. Microbiol. 15: 61-63 (1982)
- 43 Pennie, R.A., Zunino, J.N., Rose, J.C. and Guerrant, R.L.: Economical simple method for production of the gaseous environment required for cultivation of *Campylobacter jejuni*. J. Clin. Microbiol. 20: 320-322 (1984)
- 44 Pérez, P.G.I., Hinojosa, A., Bessudo, D.M.: Isolation of *Campylobacter jejuni* from intestinal contents of chickens in Mexico city. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 26(1): 37-38 (1986)
- 45 Prescott, J.F. and Gellner, D.S.: Intestinal carriage of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* by chicken flocks at slaughter. Can. J. Comp. Med., 48: 329-331 (1984)
- 46 Prescott, J.F. and Munroe, D.L.: *Campylobacter jejuni* enteritis in man and domestic animals. J. Am. Vet. Med. Assoc., 181: 152-153 (1982)
- 47 Ruiz Zambrano, D.: Historia natural de la enfermedad causada por *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*, como zoonosis. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 1986
- 48 Simbert, R.M.: The genus *Campylobacter*. Ann. Rev. Microbiol., 32: 673-709 (1978)

- 49 Skirrow, M.B.: *Campylobacter* enteritis: A "new" disease. Br. Med. J., 2:9-11 (1977)
- 50 Skirrow, M.B., Fidoe, R.G. and Jones, D.M.: An outbreak of presuntive food-borne *Campylobacter* enteritis. Jour. of Infect., 3: 234 - 236 (1981)
- 51 Skirrow, M.B., and col.: "1001" *Campylobacters* characteristics of intestinal *Campylobacters* from man and animals. J. Hyg. 85: 427-442 (1980)
- 52 Sokal, R.R. and Rohlf S.J.: Biometry., 2ª edición., Freeman and Company, San Fco, California (1981)
- 53 Svedhem, A. and Kaijser, B.: Isolation of *Campylobacter jejuni* from domestic animals and pets: probable origin of human infection. J. Infect., 3: 37-48 (1981)
- 54 Velasco, A.C., Mateos, M.L., Mas, G., Pedraza, A., Díez, M. and Gutierrez, A.: Three- year prospective study of intestinal pathogens in Madrid Spain., J. Clin. Microbiol., 20: 290-292 (1984)
- 55 Vera, H.D. and Power, D.A.: Culture media, manual of clinical microbiology. Edited by Lennette E., Baolws, A., Hausler, W. and Truant, J., American Society for Microbiology, Washington 1980.
- 56 Wang, W.L., Luechtefeld, N.W., Blaser, M.J. and Reller, L.B.: Comparison of Campy Pak II with standard 5% oxigen and candle jars for grow of *Campylobacter jejuni* from human feces. J. Clin. Microbiol., 16: 291-294 (1982)
- 57 Wang, W. L., Reller, L.B., Blaser, M. J. and Luechtefeld, N. W.: The effect of incubation atmosphere and temperature of isolation of *Campylobacter jejuni* from human stools. In. D. G. Newell (ed), *Campylobacter* epidemiology. Pathogenesis and biochemistry. MTP. Press, Hingham. Mass p. 69-70 (1981)
- 58 Zamora, Ch. A., Galindo, H.E., Mejía, A.M.E., Ramirez, A.M.: Infección por *Campylobacter jejuni* en niños. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex., 44: 155-160 (1987)