

24
2 ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

ESTABLECIMIENTO DE LA TECNICA PARA EL AISLAMIENTO DE Campylobacter jejuni COMO AGENTE ETIOLOGICO DE ENTERITIS Y SU FRECUENCIA EN RELACION CON LOS ENTEROPATOGENOS BACTERIANOS TRADICIONALES EN LA POBLACION DEL HOSPITAL GENERAL C.M. "LA RAZA".

FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLGO
P R E S E N T A
JOSE FILIBERTO JASSO SAAVEDRA



V N A M

Directoras de Tesis:
QBP. Guadalupe de los Angeles García Elorriaga
QFI. Andrea A. Becerril Osnaya

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

1989



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.

C O N T E N I D O

| | |
|---|----|
| I.- RESUMEN | 1 |
| II.- INTRODUCCION | 3 |
| II.1 DESARROLLO HISTORICO | 3 |
| II.2 GENERO <i>Campylobacter</i> | 11 |
| II.3 EPIDEMIOLOGIA | 14 |
| II.4 ENTERITIS OCASIONADA POR <i>C. jejuni</i> | 20 |
| II.5 VIABILIDAD | 21 |
| II.6 ESTRUCTURA ANTIGENICA | 25 |
| III.- MANIFESTACIONES CLINICAS | 34 |
| IV.- DIAGNOSTICO DE LABORATORIO | 38 |
| IV.1 MEDIOS SELECTIVOS | 40 |
| IV.2 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA | 44 |
| IV.3 CONDICIONES DE INCUBACION | 46 |
| IV.4 IDENTIFICACION | 47 |
| V.- OBJETIVOS | 52 |
| VI.- MATERIAL Y METODOS | 53 |
| VII.- RESULTADOS | 59 |
| VIII.- DISCUSION | 63 |
| IX.- CONCLUSIONES | 67 |
| X.- BIBLIOGRAFIA | 68 |

I.- RESUMEN

Las enfermedades diarreicas de origen bacteriano siguen siendo en la actualidad una de las principales causas de padecimiento, principalmente entre la población infantil, entre estos microorganismos *Campylobacter jejuni* en años recientes ha sido considerado como uno de los principales agentes etiológicos de enteritis en el mundo. Es por ello que es necesario tener en el laboratorio de Microbiología una técnica adecuada para el aislamiento e identificación de *Campylobacter jejuni*, ya que a diferencia de los demás enteropatógenos bacterianos tradicionales, *Campylobacter jejuni*, requiere de una atmósfera microaerofílica y un medio selectivo para su aislamiento entre otras.

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología Especial del Hospital General Centro Médico "La Raza" en un período de siete meses, se trabajaron 219 muestras de materia fecal, obtenidas de pacientes con diagnóstico de diarrea, gastroenteritis, gastroenteritis de larga evolución, gastroenteritis aguda y diarrea de larga evolución. Se utilizó un grupo control de 85 muestras de heces de pacientes que no tuvieran padecimientos del tracto gastrointestinal.

Las muestras de heces se sembraron en un medio selectivo para el aislamiento de *Campylobacter jejuni* y en los medios comunmente usados para el crecimiento de las enterobacterias clásicas de infección intestinal en nuestro país.

Del total de muestras trabajadas *Campylobacter jejuni* se aisló en 3.19 % de la población estudiada y no se obtuvo ningún aislamiento del grupo considerado como control. Este porcentaje presentado por *Campylobacter jejuni* fue superior al de *Salmonella*, *Shigella* y *Aeromonas hydrophila* y sólo fue superado por *Escherichia coli* enteropatógena.

En relación con los enteropatógenos bacterianos tradicionales, se observó que *Campylobacter jejuni* siempre se presentó como único agente etiológico, lo cual apoya que realmente se encuentra como agente causal de diarrea.

Del presente estudio se concluyó que *Campylobacter jejuni* es un importante agente etiológico de enteritis en la población estudiada, por lo que consideramos necesario el aislamiento e identificación de rutina de este microorganismo.

II.- INTRODUCCION

Las bacterias enteropatógenas que habitualmente causan infección intestinal se distribuyen entre las enterobacterias, los vibrios, los clostridia y más recientemente el Campylobacter. Las enterobacterias comprenden Salmonella, Shigella, Escherichia coli enteropatógena, enteroinvasiva, enterotoxigénica, enterohemorrágica, enteroadherente y la Yersinia enterocolitica. Entre los vibrios están el Vibrio cholerae, algunos vibrios no coléricos y el Vibrio parahemolyticus. Del género Clostridium, la especie Clostridium perfringens causa intoxicación alimentaria y el Clostridium difficile de acuerdo con estudios recientes, es la bacteria responsable de la enterocolitis pseudomembranosa consecutiva al uso de antibióticos. Respecto al género Campylobacter sólo Campylobacter jejuni (C. jejuni) y Campylobacter coli (C. coli) causan infección intestinal. (17, 68)

II.1- DESARROLLO HISTORICO.

El término Campylobacter (del griego campylo, curvo; bacter, bacilo) fue propuesto por Sebald y Veron en 1963 como nombre genérico para los vibrios microaerófilos, en base a que estos microorganismos difieren de los vibrios coléricos en varios aspectos fundamentales. (52, 61)

Jones y col. en 1931 aislaron un vibrion asociado con enfermedades diarreicas agudas en vacas y llamaron a este agente: Vibrio jejuni. (61)

Las primeras infecciones detectadas en humanos producidas por especies del género Campylobacter, datan de 1947 en donde Vinzent y col. refirieron

un caso de septicemia consecutivo a un aborto por vibrión. King, en 1957 informa de varios casos de diarrea en humanos en Estados Unidos de Norteamérica (U.S.A.), ocasionados por unos organismos microaerófilos que desarrollaron bien a 42°C, pero no a 25°C a los que denominó "vibrios relacionadas" y fue King, quien por primera vez realizó estudios profundos de las cepas humanas de estos microorganismos. (52, 61, 62)

En 1963 Sebald y Veron estudiaron varios vibrios y otros bastones gram-negativos, encontrando que el *Vibrio fetus* en su cadena de ácido desoxirribonucleico (DNA) tienen un contenido de guanina más citosina de 33-35 moles por ciento. La guanina más citosina de *Vibrio butulus* fue de 29.5-30.5 moles por ciento, mientras que el contenido de los vibrios es de 47.2 moles por ciento. Ellos concluyeron que con esta diferencia en el DNA y dado que *Vibrio fetus* no es fermentativo, *Vibrio fetus* y *Vibrio butulus* deberían ser removidos del género *Vibrio*; proponiendo la creación de un nuevo género, *Campylobacter* (bastón curvo) en donde *Campylobacter fetus* sería la especie tipo del género, lo cual no fue completamente aceptado por todos los investigadores. Hasta esta fecha aun existía controversia y confusión sobre la nomenclatura y clasificación de las diferentes especies del género *Campylobacter*, hasta que en el año de 1973 en un estudio publicado por Veron y Chatelain reclassificaron a las especies del género *Campylobacter*. En donde *C. fetus* subsp. *fetus* y *C. fetus* subsp. *venerealis* son los mismos que *Vibrio fetus* subsp. *intestinalis* y *Vibrio fetus* subsp. *venerealis* de Florent respectivamente. *C. fetus* subsp. *venerealis* biotipo intermedio es similar al subtipo 3 de Bryner y col. (Tabla 1); *C. coli* es similar a *Vibrio coli* descrito por Doyle; *C. jejuni* es el mismo *Vibrio jejuni* de Jones y Little; *Cam*

Tabla 1

COMPARACION DE VARIAS CLASIFICACIONES DE *Campylobacter fetus*

| BRYNER | MOHANTY | FLORENT | SMIBERT | VERON Y CHATELAIN | BERG |
|---------------|---------|---------------------|-----------------------|----------------------|-----------|
| Biotipo 1 | I | <i>venerealis</i> | * <i>fetus</i> | * <i>venerealis</i> | A - 1 |
| Biotipo sub 1 | III | <i>venerealis</i> | * <i>fetus</i> | * <i>venerealis</i> | A - sub 1 |
| Biotipo 2 | II | <i>intestinalis</i> | * <i>intestinalis</i> | * <i>fetus</i> | A - 2 |
| Biotipo 2 | II | <i>intestinalis</i> | * <i>intestinalis</i> | * <i>fetus</i> | B |
| | | | * <i>jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> | C |
| | | | * <i>jejuni</i> | <i>C. coli</i> | C |

Tomada de: Smibert, R. M. The Genus *Campylobacter*. Ann. Rev. Microbiol. 1978. 32:680

* Subspecies.

pylobacter sputorum subsp. *sputorum* y *Campylobacter sputorum* subsp. *bubulus* son los *Vibrio sputorum* subsp. *sputorum* y *Vibrio sputorum* subsp. *bubulus* de Loesche y col. (61)

De acuerdo con la clasificación anterior y en base a que las especies del género *Campylobacter* difieren de los vibrios coléricos en varios aspectos fundamentales, Veron y Chatelain en 1973 propusieron la transferencia de los vibrios microaerofílicos del género *Campylobacter* a la familia de las Spirillaceae; ya que anteriormente estaban incluidas dentro de la familia Vibrionaceae. Entre las razones más importantes para la transferencia están las siguientes: los verdaderos vibrios son anaerobios facultativos, producen ácidos a partir de los hidratos de carbono, tienen un metabolismo fermentativo y contenido de guanina más citocina de 40 a 53 moles por ciento; en cambio, las cepas de *Campylobacter* son microaerofílicas o anaeróbicas, no producen ácido a partir de los carbohidratos, tienen un metabolismo respiratorio y un contenido de guanina más citocina de 20-36 moles por ciento. (52, 61)

En la 8a. edición del Manual de Bergey, Smibert clasifica al *Vibrio fetus* (*venerealis* e *intestinalis*) de Florent de la misma forma que Veron y Chatelain. *C. fetus* subsp. *jejuni* representa a *C. coli* y *C. jejuni* de Veron y Chatelain y los vibrios relacionados de King (Tabla 1). Las características de estos microorganismos son las mismas y no representan otra especie diferente; no hay una adecuada descripción de las cepas originalmente aisladas de *Vibrio jejuni*, por lo tanto estos aislamientos son considerados como los mismos que *C. jejuni*, los cuales originalmente habían sido aislados del in-

testino de terneras. (61)

El desarrollo a 25 y 42° C ha sido usado como una prueba para diferenciar las especies: *C. jejuni* crece a 42° C, pero no a 25° C, mientras que las otras dos subsp. (*intestinalis* y *fetus*) crecen a 25° C pero no a 42° C. Los vibrios relacionados de King crecen a 42° C pero no a 25° C. Unas cuantas cepas de *C. jejuni* han sido reportadas que crecen a ambas temperaturas; pero estas cepas son consideradas subsp. *intestinalis*, ya que esto correlaciona con la prueba del ácido nalidixico; *C. jejuni* es sensible a altas concentraciones de este antibiótico, mientras que las otras dos subespecies son resistentes. (61)

Actualmente la clasificación de especies del género *Campylobacter* que tiene mayor aceptación es la del Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey (62) que en su 9a. edición (1984), enumera cinco especies, basada en la clasificación propuesta por Veron y Chatelain.

- 1.- *Campylobacter fetus*.
 - 1a. *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*.
 - 1b. *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*.

- 2.- *Campylobacter jejuni*.
- 3.- *Campylobacter coli*.
- 4.- *Campylobacter sputorum*.
 - 4a. *Campylobacter sputorum* subsp. *sputorum*.
 - 4b. *Campylobacter sputorum* subsp. *bubulus*.
 - 4c. *Campylobacter sputorum* subsp. *mucosalis*.
- 5.- *Campylobacter concisus*.

1a. *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* Veron y Chatelain, 1973. (*Vibrio fetus-ovis* Buxton, 1929; *Vibrio fetus* var. *intestinalis* Florent, 1959; *Campylobacter fetus* subsp. *intestinalis* Saiberth, 1974).

Es una de las tres especies que afecta a humanos, causa generalmente enfermedad en personas debilitadas o inmunosuprimidas, con rasgos específicos del sistema afectado. Las principales manifestaciones de la campylobacteriosis sistémica son la bacteremia sin infección localizada, causa meningitis, infecciones endovasculares y abscesos; los cuales a menudo son fatales. (5, 22, 57). La mayoría de enfermedades sistémicas causadas por *Campylobacter* son producidas por *C. fetus* subsp. *fetus*, la vigilancia nacional de infecciones por *Campylobacter* realizada en 42 Estados de U.S.A. mostraron que de 8 320 aislamientos de *Campylobacter* sólo 0.44% correspondieron a este microorganismo. (57)

C. fetus subsp. *fetus* es un patógeno poco común de humanos, y no obstante que es transmitido oralmente, la diarrea producida por este organismo es mucho menos frecuente que la causada por *C. jejuni*. Butzler de 1970-1978 aisló sólo tres cepas de *C. fetus* subsp. *fetus* de 22 000 muestras de heces trabajadas. (29)

1b. *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* Veron y Chatelain, 1973. (*Vibrio fetus* var. *venerealis* Florent, 1959; *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* Saibert, 1974).

C. fetus subsp. *veneralis* son espirilos largos de 2.43 μ m de longitud y 0.73 μ m de diámetro. Tiene gran importancia clínica en medicina veterinaria, ya que ocasiona grandes pérdidas económicas por ser el agente etiológico de las enzootias de abortos e infertilidad en el ganado vacuno; es transmitido por vía venérea. (22, 52, 62)

2.- *Campylobacter jejuni* Veron y Chatelain, 1973. (*Vibrio jejuni* Jones, Orcutt y Litle, 1931; *Vibrio hepaticus* Mathey y Rissberg, 1964; *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* Smibert, 1974).

C. jejuni es considerado como uno de los principales agentes etiológicos de enteritis en el mundo, (1, 15, 48, 57, 60) debido a la introducción de medios selectivos que han favorecido su aislamiento de muestras de heces. (11, 42, 62)

Además de enteritis, *C. jejuni* causa una amplia variedad de enfermedades en humanos, entre las que se incluyen: bacteremia, peritonitis, meningitis, infección de las vías urinarias, artritis y meningitis. (2, 14, 39, 44, 51, 57)

3.- *Campylobacter coli* Veron y Chatelain, 1973. (*Vibrio coli* Doyle, 1948).

Es difícil distinguir entre *C. jejuni* y *C. coli*. Las pruebas que se usan para diferenciar estas especies son el crecimiento en 8% de glucosa, la resistencia al trifeniltetrazolium y al verde brillante. Siendo la

prueba más relevante la hidrólisis del hipurato (62)

C. coli no hidroliza el hipurato y debido a esta prueba se ha podido observar que se encuentra produciendo diarrea en un porcentaje elevado de humanos, cercano al de *C. jejuni*, y que es junto con este microorganismo, una de las principales causas de gastroenteritis en el mundo. (5, 17) Como lo demuestra un estudio de Georges-Courbot, (17) en donde encontró que *C. coli* se encuentra en un 43.9% de las diarreas producidas y en 29% de portadores sanos.

C. jejuni y *C. coli* en la 8a. edición del Manual Bergey son considerados por Sneath como la misma especie, *C. jejuni*. En general estas dos especies de *Campylobacter* son muy parecidas genética, morfológica y bioquímicamente, y es probable que estos dos microorganismos tengan un modelo epidemiológico y patológico similar. (62)

4.- *Campylobacter sputorum* Veron y Chatain, 1973.

Las subespecies de *Campylobacter sputorum* no se consideran patógenas para el humano, si no más bien formando parte de la flora normal, como sucede con *Campylobacter sputorum* subsp. *sputorum* que representa el 5% de la flora normal de la cavidad bucal. *Campylobacter sputorum* subsp. *bubulus* se ha aislado de la mucosa uterina de vacunos, ovinos y de la vaina de los toros y se considera no patógeno. *Campylobacter sputorum* subsp. *mucosalis* es patógeno para cerdos. (22, 52, 62).

5.- *Campylobacter concisus*.

Campylobacter concisus no se considera patógeno para el humano y se

encuentra formando parte de la flora normal. (62)

II.2.- GENERO *Campylobacter*.

El género *Campylobacter* pertenece a la familia Spirillaceae, son pequeños bastones curvos Gram negativos que miden de 0.2-0.5 μm de diámetro y 0.5-5.0 μm de longitud y a veces se ven bacilos largos espiralados. Las células pueden tener forma de S o de alas de gaviota, y de forma cocoide en cultivos viejos expuestos al aire. Los organismos son móviles por un flagelo único que poseen, unipolar o bipolar, cuya longitud puede llegar a ser 2 ó 3 veces la de la célula. Este flagelo le da un movimiento muy característico, sus movimientos son giros rápidos en espiral como de sacacorchos o látigo, esta movilidad puede ser vista bajo el microscopio de campo oscuro o de contraste de fases. (22, 46, 62, 67)

Los organismos del género *Campylobacter* son microaerófilos que requieren para su desarrollo una concentración de oxígeno (O_2) de 3-15 % y capnófilos (capnos, CO_2 ; filios, afinidad) en una proporción de dióxido de carbono (CO_2) de 3-5 %. Ocasionalmente algunas cepas pueden crecer ligeramente bajo condiciones aeróbicas (20 % O_2), sobre todo después del primer aislamiento, después del cual toleran mayor cantidad de O_2 , mientras que otras más sólo crecen bajo condiciones anaerobias. (61, 62)

La temperatura de crecimiento de las células del género *Campylobacter* varía de 25-43° C, siendo más común el uso de una incubación a 37° C, excepto para *C. jejuni* y *C. coli* las cuales se incuban generalmente de 42 a 43° C.

(22, 35, 47, 61, 69)

Se ha comprobado que algunas bacterias del género *Campylobacter* sirven como hospederos a uno o más fagos. Los bacteriófagos han sido demostrados en *C. jejuni*, *C. coli* y *C. fetus*, estos fagos son específicos y no infectan a otras especies del mismo género. Así el fago C es lítico para 30 cepas de *C. jejuni* y, los fagos I, II, III y IV son considerados específicos para *C. fetus*. (62)

La presencia de plásmidos ha sido establecida en 19 % de las cepas de *C. jejuni*, se ha observado que su resistencia a la tetraciclina se debe a la mediación de un plásmido con un peso molecular de 38×10^6 Daltons. El plásmido puede ser transferido a *C. fetus* subsp. *fetus* pero no a *Escherichia coli*. (62)

El aislamiento de las especies de *Campylobacter* puede ser llevado a cabo por dos métodos. El primero incluye la filtración de las células a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0.45, 0.65 ó 0.8 μm . El filtrado es sembrado en un medio líquido o en un medio sólido. El segundo método consiste en el uso de un medio más selectivo, que entre los más comunes se encuentran el medio de Skirrow, (60) el medio de Butzler (11) y el Campy-BAP. (42) Estos medios contienen una serie de antibióticos que no limitan totalmente el crecimiento de la flora normal; pero sí disminuye el desarrollo de estos microorganismos para favorecer el aislamiento de *Campylobacter*. Los medios selectivos usados para el aislamiento

to de *C. fetus* subsp. *fetus* y subsp. *venerealis* sólo deben contener bacitracina y novobiocina y nunca deberán incluir cafazolina y cefalotina, ya que se ha comprobado que estos antibióticos inhiben el crecimiento de estos campilobacteres. (62)

Las colonias de las especies del género *Campylobacter* miden de 1 a 2 mm de diámetro, no son hemolíticas en agar sangre, excepto *Campylobacter sputorum* que son débilmente hemolíticas, y se observa una diversidad de formas en el primer aislamiento, que por lo general son redondas, planas, lisas o rugosas, opacas, blanquecinas o cremosas y tienen la característica de crecer siempre en la dirección de la estría. (62)

Las especies del género *Campylobacter* no son muy activas bioquímicamente, son inertes a la mayoría de pruebas bioquímicas usadas de rutina en un laboratorio de Bacteriología: no fermentan ni oxidan a los carbohidratos; su energía la obtienen de los aminoácidos o de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, reducen los nitratos a nitritos, no hidrolizan la gelatina ni la urea. Son oxidasa positivos, catalasa positivos, no producen pigmentos y las reacciones de rojo de metilo y de Voges-Proskauer son negativas. (52, 62)

Las cepas tipo de las especies de *Campylobacter* pueden ser almacenadas durante años por procesos de liofilización, congelación a -80°C en N_2 líquido. (62)

Los miembros del género *Campylobacter* incluyen microorganismos pató-

genos tanto para animales como para el hombre, unas especies están asociadas con abortos y enfermedades reproductivas en animales y con una amplia variedad de infecciones en humanos. Las especies de *Campylobacter* también se encuentran como saprófitos formando parte de la flora oral de animales y de humanos, como es el caso de *Campylobacter sputorum* subsp. *sputorum* que representa aproximadamente el 5 % de la flora normal de la cavidad bucal humana. (22, 52, 61, 62) Las únicas especies que se ha encontrado que causan patogenicidad en el hombre son *C. jejuni*, *C. coli* y *C. fetus* subsp. *fetus*. Entre las infecciones en que se encuentran asociadas se incluyen: enteritis, bacteremia, peritonitis, meningitis, infecciones de las vías urinarias, artritis y colecistitis. (2, 14, 39, 44, 51, 57) De todos estos cuadros clínicos enumerados el más frecuente es la enteritis aguda producida por *C. jejuni*.

II. 3- EPIDEMIOLOGIA

Debido a su lento crecimiento, medio de cultivo selectivo para su desarrollo y a sus requerimientos de microaerofilia, la enteritis por *C. jejuni* se diagnosticaba únicamente en forma ocasional; a partir de los estudios de Butzler (11) en 1973 y Skirrow (60) en 1977, quienes desarrollaron un procedimiento de aislamiento especial y selectivo, mediante la agregación de una serie de antibióticos al medio de cultivo, que inhiben el desarrollo de los microorganismos de la flora normal del intestino y permiten el crecimiento de *C. jejuni*, los casos de enteritis por esta bacteria han sido comunicados con mayor frecuencia en los últimos años en varios países desarrollados y subdesarrollados de todo el mundo. Los estudios realizados en estos países demuestran una incidencia en el aislamiento del microorganismo que varía de

5.33 hasta 11.0 % del total de muestras de heces de pacientes con diarrea. (15, 48) Otros autores reportan que *C. jejuni* se puede llegar a aislar en pacientes con diarrea, con tanta frecuencia como *Shigella* y *Salmonella*. (15, 57) Mientras que otros más afirman que el aislamiento de *C. jejuni* de muestras de heces de pacientes con diarrea es superior al aislamiento de *Salmonella* y *Shigella*, (1, 60) y que sólo es superado en frecuencia por diarreas causadas por *Giardia lamblia* y *Rotavirus*. (1)

Diversos estudios realizados aquí en México, han demostrado que la población mexicana no escapa al padecimiento de enteritis por *C. jejuni*, siendo alta la frecuencia de aislamiento de heces diarreicas en comparación con *Salmonella* y *Shigella* como lo demostró el estudio de Parra-maldonado (48) en donde aisló *C. jejuni* con una frecuencia de 5.33 % superior al de otras bacterias anteropatógenas. En el Hospital Infantil de México, S. S. A., se aisló la *C. jejuni* en un 12.0 % de pacientes con diarrea.

En el Instituto Nacional de la Nutrición, la frecuencia de aislamiento varía entre 8.0-10.0 % y en la Unidad de Pediatría del Hospital General de México, S. S. A., el porcentaje de casos positivos asciende a 1.5 en lactantes y 2.0 en pre-escolares y escolares. (52)

En la enteritis por *C. jejuni* la susceptibilidad de la población es general, no hay diferencia en cuanto a sexo y edad sin embargo, la mayor incidencia se ha observado en los primeros meses de vida y en niños de uno a cuatro años de edad. (1, 29, 60) Skirrow, (60) en un estudio realizado en pacientes de todas las edades observó una mayor frecuencia en el grupo de menores de un año a 14 años de edad.

La fuente de infección aún no está completamente determinada, y varía según los diferentes informes; se supone que la transmisión de la enfermedad ocurre de persona a persona, ya sea con pacientes sintomáticos o asintomáticos. (3, 29, 60, 66)

La leche no pasteurizada es un importante vehículo en la transmisión de las infecciones por *C. jejuni*. Varias epidemias han sido reportadas en donde la leche de vacas aparentemente sanas, que no han presentado un cuadro clínico de diarrea o signos de mastitis, se ha logrado aislar el mismo serotipo de *C. jejuni* de la leche y de las personas infectadas. (20, 24, 31) Por lo que se considera que el tracto intestinal de los vacunos es un importante reservorio de *C. jejuni* (24) y probablemente representen la fuente de este patógeno. Otra posible fuente de infección es el sistema de abastecimiento de agua. (3, 31)

Los pollos y pavos han sido implicados como una fuente de infección de *C. jejuni* y son considerados por muchos como la principal fuente de infección en humanos, (34, 45) debido a que estos animales de granja pueden ser portadores sanos de esta bacteria, quizá debido a su alta temperatura corporal (42° C) la cual corresponde a la temperatura óptima de crecimiento de *C. jejuni* en el laboratorio. (34)

La campilobacteriosis ha sido adquirida por humanos por el contacto con animales domésticos, incluyendo gatos (16, 49) con o sin diarrea y perros. (60, 49) Los gatos comúnmente usados en investigaciones biomédicas son reconocidos como un reservorio de *Salmonella*. En un estudio realizado en 159 de estos gatos, se aisló *C. jejuni* en una proporción de 10.7 % de

las muestras de heces, mientras que sólo se presentó un 2.0 % de *Salmonella typhimurium*, por lo que se considera que estos animales son un claro reservorio de este microorganismo. (16) También se considera como otra fuente de infección a los cerdos y carneros; pero su papel no ha sido esclarecido. (31, 45)

C. jejuni es más sensible al calor que *Salmonella*, se ha encontrado que la inactivación de *C. jejuni* en carne de res se logra con una temperatura de 50° C durante 5.9 a 6.3 min, y de 12 a 21 seg a 58° C, y en trozos de carne de ternera la inactivación se consigue de 5.9 a 13.3 min a 50° C y de 12.5 a 15.8 seg a 60° C. Mientras que la inactivación de *Salmonella* se alcanza de 3.8 a 4.2 min a una temperatura de 57.2° C. Por lo que una carne calentada a una temperatura suficiente para inactivar *Salmonella spp* está libre de *C. jejuni* viable. (28)

La vía de transmisión más importante, en los casos de enteritis ocasionada por *C. jejuni* es la vía fecal-oral. (52) En el neonato se sugiere que la infección probablemente ocurra durante el paso por el canal de parto o por el consumo de algún alimento o medicamento contaminado por *C. jejuni*. (66)

En las diarreas ocasionadas por *C. jejuni*, los microorganismos son excretados por los pacientes durante la fase aguda de la enfermedad, que suele durar de 1-21 días; pero por lo general se resuelve en el término de una semana. (3, 60) La fase aguda de la enfermedad es seguida por un período de convalecencia que varía de una a tres semanas, lapso en el cual se

siguen excretando los microorganismos. Aunque se han observado casos de períodos de excreción muy prolongados, de cerca de nueve meses y de más de un año; sin hacer una clara distinción, si han sido reinfecciones o son portadores crónicos. (56) La fase aguda de la enfermedad y el período de convalecencia son los de mayor riesgo de transmisión de la infección, y en estos casos se puede considerar a los portadores como un peligro para la salud pública.

Butzler, (11) fue el primero en confirmar la presencia de *C. jejuni* en portadores sanos, y recientemente en varias investigaciones realizadas en países desarrollados y subdesarrollados, se ha observado la presencia de *C. jejuni* en personas sanas, sin padecimiento de diarrea; principalmente en países en vías de desarrollo como la India, Bangladesh, República de África Central y otros. (4, 17, 55)

La serotipificación de *C. jejuni* basada en la identificación de antígenos termolábiles y antígenos termoestables se ha usado principalmente para la detección de epidemias de gastroenteritis causadas por este microorganismo, en donde, en algunas de ellas no se ha conocido su vehículo; pero si se ha aislado de varios miembros de una familia o de una comunidad, el mismo serotipo de *C. jejuni*. (1, 20, 31, 38, 66)

La mayor frecuencia de las infecciones por *C. jejuni* acontecen durante el verano y en general en los meses de mayor calor del año. Butzler (29) en la Cd. de Bruselas, Bélgica, observó que durante los meses de julio, agosto y septiembre los aislamientos de *C. jejuni* se incrementaban en un 8-9 %.

En forma similar, en un año de trabajo realizado conjuntamente en 33 Estados de U.S.A. el 46 % (3603) de aislamientos de *C. jejuni* acontecieron en los meses de junio a septiembre, (57) y Bartlett (1) en un estudio realizado en niños menores de tres años, el 88 % de aislamientos fueron realizados en los meses de septiembre-noviembre.

La epidemiología de *C. jejuni* no ha sido esclarecida completamente hasta la fecha. Dos mecanismos han sido propuestos para explicar dicha Epi demiólogía; uno aplicable a países desarrollados y el otro a países en vías de desarrollo. Según resultados obtenidos de investigaciones realizadas en países desarrollados, se ha encontrado que en estos países del mundo la in cidencia de las infecciones por *C. jejuni* es baja y causa enfermedades dia rreicas especialmente entre los adultos, siendo los portadores sanos muy poco comunes. En contraste, en países subdesarrollados el aislamiento de *C. jejuni*, de niños con diarrea y en portadores sanos, es extremadamente elevado y la prevalencia de tales excreciones disminuye con la edad. En paí ses desarrollados, la presencia de sangre en heces diarreicas y la fiebre son consecuencias comunes de la infección por *C. jejuni*, pero en países en desarrollo, tales manifestaciones severas de la infección no son comunes y la duración de la eliminación del microorganismo durante la fase de convalescencia es corto. En países desarrollados, las infecciones causadas en niños por *C. jejuni* son tan severas como las sufridas por los adultos. (4, 17).

Para explicar la divergencia entre las características clínicas y epi demiológicas de las infecciones por *C. jejuni* en países desarrollados y sub

desarrollados, se ha sugerido una hipótesis, en la cual se plantea que la baja patogenicidad de las cepas aisladas en países subdesarrollados, se debe a que los niños desde temprana edad están en contactos con el microorganismo, debido a los bajos niveles de higiene con lo cual se desarrolla gradualmente una marcada inmunidad intestinal. Esto quedó demostrado por Blaser (4) en un estudio realizado simultáneamente en niños de U.S.A. y niños de Bangladesh; en donde encontró que los niveles de anticuerpos específicos contra *C. jejuni* en niños sanos es mayor en el país en desarrollo que en el país desarrollado.

II.4- ENTERITIS OCASIONADA POR *C. jejuni*.

C. jejuni, en años recientes ha sido considerada como una de las principales causas de diarrea bacteriana en el mundo. (1, 15, 48, 57, 60) Es un bacilo delgado Gram negativo que mide de 1.5 - 0.63 μm de diámetro y de 1.34 - 3.3 μm de longitud, adopta una forma de C ó coma y de formas bi, tri y tetracurvadas. Presenta forma coccoides en cultivos viejos o en cultivos expuestos al aire, y puede también presentar formas filamentosas de hasta 8.0 μm de longitud. (19, 22)

C. jejuni es móvil, sus movimientos son giros rápidos en espiral debido a un solo flagelo polar, que está en uno o ambos extremos y tiene el doble o triple del largo de las células, este flagelo mide 2.6 - 3.9 μm de longitud y tiene un diámetro promedio de 21 μm . (50)

C. jejuni son organismos microaerofílicos y llegan a tolerar una ma-

mayor cantidad de O_2 después del aislamiento inicial, su temperatura óptima de crecimiento es de $42 - 43^\circ C$ y desarrollan bien en un término de 24 - 48 h de incubación. (48, 53, 55, 69)

II. 5.- VIABILIDAD.

Estudios de microscopía electrónica realizados en cepas aisladas de humanos han mostrado que *C. jejuni* presenta cuatro tipos morfológicos:

- a) Formas esféricas o cocoides: Estructuras redondeadas que presentan un poro central y un solo flagelo. Su diámetro promedio es de $0.60 \mu m$ y su diámetro máximo es de $1.2 \mu m$. (19, 50)
- b) Formas curvas en C: Células relativamente cortas con un flagelo polar en cada extremo. Su diámetro mide de 0.15 a $0.34 \mu m$ con un promedio de $0.27 \mu m$, su longitud es de 1.27 a 1.34 siendo su promedio de $1.31 \mu m$. (19)
- c) Formas bi, tri y tetracurvadas: Son las formas observadas más frecuentemente y presentan un flagelo polar en cada extremo. Su longitud promedio es de $1.82 \mu m$ variando de 1.10 a $3.32 \mu m$, su diámetro mide de 0.2 a $0.6 \mu m$, (19, 50) con un diámetro promedio de $0.28 \mu m$. (19)
- d) Formas filamentosas: En ocasiones se observan algunas bacterias extremadamente largas, de más de cinco curvas poco pronunciadas,

que miden hasta 8.0 μm de largo y 3.5 μm las más pequeñas, con un diámetro promedio de 0.20 μm . (19)

Se ha encontrado que *C. jejuni* además de estas 4 formas tiene una quinta estructura morfológica más, la cual tiene forma silimar a una dona. Esta célula en forma de dona se considera como un paso intermedio entre la forma espiral y la forma cocoide. El mecanismo de cambio en la transformación morfológica no se conoce, NG y colaboradores sugieren, que en este proceso existe un cambio progresivo asociado con degeneración de la pared celular. (43)

Posiblemente la morfología normal de *C. jejuni* sea la forma curva en C y las formas bi, tri y tetracurvadas. De manera que las células curvas en C corresponderían a células jóvenes de reciente división, mientras que las formas, bi, tri y tetracurvadas serían las células maduras. Por otra parte, las formas cocoides corresponderían a bacterias degeneradas lo que concuerda con el hecho de que se encuentran más frecuentemente en cultivos viejos, (19) o en cultivos expuestos al aire. (62) Es posible que su morfogénesis se deba a una concentración del citoplasma en un extremo de la bacteria con degeneración del otro, (19) o a un cambio progresivo de la bacteria asociado con degeneración de la pared celular. (43) Las formas filamentosas pueden deberse a alteraciones metabólicas que bloquean la síntesis de peptidoglicanos induciendo la formación de bacterias alargadas. (19)

Investigaciones realizadas para conocer la viabilidad de *C. jejuni*, han mostrado que en una colonia simple de *C. jejuni* existe un grupo hete

rogéneo de células en edad y estado fisiológico. Esto es propuesto debido a que muestras tomadas de la periferia de la colonia, desarrollan principalmente células de forma espiral. Mientras que las células tomadas del centro de la misma colonia desarrollan predominantemente formas cocoides. En contraste, las células que se encuentran en medio, entre el centro y la periferia de la colonia, desarrollan principalmente microorganismos en forma de dona. (43)

El período de incubación de *C. jejuni* es de 24 - 48 h a una temperatura de 42 - 43° C, (22, 38, 48) mientras que a una temperatura de 37° C es de 48 - 72 h. (31, 43, 47) períodos más prolongados de los requeridos para el crecimiento de *C. jejuni*, han mostrado que aumentan enormemente la presencia de formas cocoides. (43, 50)

La mayoría de células de *C. jejuni* poseen un flagelo bipolar; las formas cocoides presentan un sólo flagelo y las formas aflageladas se ven raramente. La longitud del flagelo es de 2.6 a 3.9 μm y tiene un diámetro promedio de 21 nm. (50) Las estructuras asociadas al flagelo como el disco distal y proximal, evaginados dentro del poro polar, del cual sale cada flagelo, en conjunto con el cilindro y el grano basal están posiblemente relacionados con el movimiento del flagelo. El movimiento de *C. jejuni* probablemente se deba a la inducción de un movimiento de onda helicoidal en el flagelo causado por una acción de evaginación e invaginación de las estructuras flagelares. Sin embargo, en preparaciones en fresco de *C. jejuni* se observan bacterias que quedan ancladas por uno de sus flagelos al portaobjetos y muestran un movimiento fuerte de rotación, lo que indicaría un posi

ble movimiento de rotación flagelar. Tanto el movimiento de onda helicoidal como el de rotación flagelar han sido propuestos para explicar el movimiento bacteriano y es posible que *C. jejuni* presente ambas formas de movimiento. (19)

Los sitios de infección de *C. jejuni* son el yeyuno, el ileon y el colon; (29, 41) su mecanismo de infección no se conoce. (29, 41) La presencia de fimbrias o de otras estructuras responsables para la adherencia de la bacteria a la superficie de los tejidos no han sido reportadas en *C. jejuni*. Los flagelos desempeñan un papel muy importante en la patogenecidad de las infecciones por *C. jejuni* y se piensa que la movilidad, al igual que con las otras bacterias enteropatógenas, es un factor necesario para la colonización intestinal por esta bacteria. (41)

La función del flagelo de *C. jejuni* como factor determinante de virulencia no ha sido todavía elucidado. Se ha encontrado que inoculando cepas flageladas y aflageladas en ratones jóvenes, éstas dos cepas producen en proporciones similares una diarrea con presencia de moco de los 3 a los 6 días después de la infección; también se ha encontrado la presencia de *C. jejuni* móviles en cultivos de heces de ratones inoculados con cepas aflageladas. Para explicar éste cambio en la estructura de *C. jejuni*, se ha propuesto que estas células sufren una transformación de sus flagelos en el intestino de los ratones, y debido a ésta propiedad es la razón por la que cepas aflageladas causen diarreas en ratones. Esta expresión reversible bidireccional se ha observado en estudios in vitro, en donde se ha encontrado que las cepas aflageladas cambian a cepas flageladas en una proporción de 4.0×10^{-7} ,

mientras que las cepas flageladas lo hacen en una relación de 3.1×10^{-3} a 5.9×10^{-3} . Este cambio en la expresión reversible de los flagelos probablemente se deba a cambios en la expresión genética de los flagelos que está inherente a algunos tipos de cepas de *C. jejuni*. (12)

II. 6.- ESTRUCTURA ANTIGENICA.

La diarrea producida por *C. jejuni* se debe a cualquiera o a varias de las propiedades que se le han identificado: invasividad, producción de enterotoxinas, y producción de citotoxinas. (27)

La invasividad es compatible con el hallazgo frecuente de heces manchadas con sangre y la presencia de moco, lo que sugiere daño a la mucosa intestinal, secundaria a una invasión del organismo semejante a la observada en los casos de shigelosis. (27, 52) En la infección intestinal con *C. jejuni* se ha observado que produce lesiones inflamatorias en el intestíno de ciertos animales de experimentación como los Hamsters (27) ratones (64) y pollos (71) pero sólo unos cuantos estudios han demostrado la invasión definitiva de la mucosa con técnicas inmunofluorescentes o de microscopía electrónica. (27)

La bacteremia en humanos causada por *C. jejuni* se puede considerar en algunos casos como consecuencia de la infección intestinal, sobre todo en casos severos de enteritis, pero estas son cuestiones que requieren más investigación ya que la enteritis por *C. jejuni* es más común en niños y los cultivos de sangre no son elaborados de rutina cuando los niños son admitti-

dos al hospital con fiebre y diarrea y aunado ésto a la relativa dificultad para el aislamiento de *C. jejuni* de cultivos de sangre es que no son comunes los casos de septicemia por esta bacteria. (6, 29, 70) Butzler, (29) en siete casos de septicemia que se le presentaron en un período de cinco años en cinco de ellos logró aislar el mismo *Campylobacter* ambos en la misma ocasión de muestras de sangre y de heces. LeBar (30) en 1985 identificó a *C. jejuni* serotipo I de Lior como el agente causal de enteritis y bacteremia, ambas recurrentes, de dos personas inmunosuprimidas que varias veces habían sido hospitalizadas aislándose siempre el mismo agente etiológico, *C. jejuni*. Mas recientemente (1986) Blaser (6) ha logrado aislar el mismo serotipo de *C. jejuni* de muestras de sangre y de heces del mismo paciente con enteritis y bacteremia transitoria.

La vigilancia nacional de infecciones por *C. jejuni* en U.S.A. (57) mostró que las infecciones extraintestinales acontecieron en 26 (0.4%) de 6402 aislamientos de *C. jejuni*, y se ha observado que la mayoría de éstos pacientes son de edad avanzada, y todos tienen una deficiencia inmunológica tales como: hipogamaglobulinemia, enfermedades biliares, enfermedades renales crónicas, terapia radioactiva y protesis aórtica. Por lo tanto en tales pacientes con infecciones extraintestinales se puede considerar que *C. jejuni* es un organismo oportunista. (6, 57)

Recientes estudios han demostrado que algunas cepas de *C. jejuni* aisladas de personas con heces líquidas y profusas producen una enterotoxina termolábil (CJT). (27, 36, 58, 59) Esta enterotoxina causa una respuesta citotónica en células suprarrenales Y-1 de ratón, en tejido de células ová-

ricas de hamster chino, y aumenta la secreción de líquidos en la prueba de asa ileal de conejo y rata. (21, 25, 58)

Se ha mostrado que la CJT esta estructural e inmunológicamente relacionada a la toxina del cólera (CT) y a la toxina termolábil de *Escherichia coli* (LT). (26, 58) Preparaciones semipuras de CJT muestran líneas de identidad parcial con CT y LT en inmunodifusión en gel. (26) CJT da una respuesta positiva en prueba de análisis inmunoenzimático (ELISA) basada en la unión de ésta toxina a anticuerpos de CT o LT, y la preincubación de CJT con antisueros de CT o LT inhibe su actividad citotónica en las células de los cultivos y su efecto secretor en las asas ligadas de rata. (21, 25, 58)

Se conoce poco acerca de la estructura y composición de la subunidad B de CJT. Recientemente se ha establecido que esta enterotoxina está relacionada estructuralmente a CT y LT, debido a que se ha demostrado que ambas enterotoxinas poseen la subunidad B, se ha observado además que esta subunidad B de CJT está funcional e inmunológicamente relacionada a la subunidad B de CT y en mayor proporción a la subunidad B de LT. (26)

Funcionalmente, CJT tiene una porción que se une a los receptores específicos GM_1 del epitelio intestinal, lo cual es conocido como una función específica de las subunidades B de CT y LT. La preincubación de CJT con GM_1 inhibe su respuesta citotónica en ensayos de cultivo; y similarmente que CT y LT puede ser purificada por métodos basados en su afinidad a las galactosas componentes de GM_1 gangliósido. (26)

Inmunológicamente, la inmunización de ratas con la unidad B de LT pro

porciona una protección significativa contra desafíos de CJT en asas ligadas, (25, 26) por lo que podría pensarse si un toxoide de la subunidad B de LT protegería también, por medio de una reacción cruzada, contra las infecciones de cepas enterotoxigénicas de *C. jejuni*. Klipstein, (26) encontró en la inmunización de animales de experimentación con la subunidad B de LT, que ésta proporciona una protección en contra de desafíos de CJT semi purificados o cepas enterotoxigénicas viables de *C. jejuni*. Resultado que la protección es menor en contra de cepas viables.

Estudios realizados han mostrado que una tercera parte de los *C. jejuni* aislados en el sur de la India y 75% y 52% en cepas aisladas en la ciudad de México, son de niños con heces líquidas producidas por CJT. (36, 58, 59)

Una propiedad patogénica que se le ha identificado a *C. jejuni* es la elaboración de citotoxinas, y el papel de estos factores en la patogenicidad no está esclarecido. (27, 37) Se ha observado que las cepas invasivas de *C. jejuni* siempre elaboran una citotoxina, detectada en bajos títulos de concentración. (27)

Existen dos clases de citotoxinas, la citotoxina 1 que tiene un peso molecular de 70 000 Daltons y un punto isoeléctrico de cerca de 9.0 este factor, Citotoxina 1, es insensible al calor (100° C durante 5 min.) y a la tripsina (1.0 mg/ml, 1 hora a 37° C). La citotoxina 1 causa hemaglutinación pero no hemólisis en los eritrocitos de carnero. (37)

El segundo factor, citotoxina 2, es también citotóxico para tejidos de células ováricas de hamster chino. En contraste a la citotoxina 1, causa hemólisis en los eritrocitos de conejo, es sensible a la tripsina y es termolábil. Se ha observado que la citotoxina 1 se encuentra en todas las cepas que producen citotoxinas, mientras que la citotoxina 2 se encuentra en un 45.0% . (37)

El papel que desempeñan estas citotoxinas en la patogenicidad de *C. jejuni* no es claro. (27, 37) Se ha encontrado que estos factores producen una respuesta citotóxica en varios sistemas de cultivo de células, in cluidos el Vero y Hela, pero la patogenicidad de estas citotoxinas no ha sido evaluada. (27) Es probable que la citotoxina 1 esté envuelta en el ataque de la bacteria a las células de mamíferos, similar al que desempeñan otros factores de la hemaglutinación. La citotoxina 2 puede beneficiar a *C. jejuni*, ayudándolo para la sobrevivencia en sangre proporcionando un mecanismo para la obtención de hierro. (37)

La estructura superficial de *C. jejuni* es antigénicamente muy compleja. Estudios serológicos han demostrado hasta la fecha la existencia de 56 diferentes tipos de antígenos termoestables (17) y 21 antígenos termolábiles (31) en *C. jejuni*. Diversas técnicas han sido desarrolladas recientemente para la identificación de estos antígenos de superficie: técnica de la hemaglutinación pasiva, basada en antígenos termoestables; la técnica de la aglutinación, basada en antígenos termolábiles y la técnica de la inmunofluorescencia indirecta. (6, 31, 38)

La identificación de los antígenos termoestables es la forma más usual para la serotipificación de *C. jejuni*, el reconocimiento de estos antígenos de superficie por el uso de la técnica de hemaglutinación pasiva (6, 38) fue propuesto inicialmente por Penner y Hennessy; y son reconocidos como los serotipos de Penner las cepas clasificadas por medio de esta técnica. Mientras que la serotificación por medio de la técnica de aglutinación son reconocidos como los serotipos de Lior. (6, 31) Los serotipos de *C. jejuni* más frecuentemente aislados de infecciones en humanos son los serotipos Pen (Penner): 1, 2, 4, 5, 8, 9, 13/16 y 53, (17, 38) y los serotipos de Lior: 1, 2, 4, 5, 7, 9, 11. (31)

El antígeno principal de *C. jejuni* es un lipopolisacárido (LPS) que se localiza en la pared celular de la bacteria. (40, 54) Este antígeno "O" somático de *C. jejuni* contiene un líquido A que es un constituyente común de los LPS de diversas especies gramnegativas, y muestra similitud antigénica entre miembros de la familia Enterobacteriaceae y otras familias de bacterias incluyendo pseudomonas y vibrios. (54)

El antígeno "O" de *C. jejuni* es un LPS en base a sus propiedades biológicas; estas propiedades incluyen termoestabilidad, habilidad para ser extraídos de la pared celular por métodos usados para la extracción de antígenos somáticos de otras bacterias Gram negativas, la habilidad para sensibilizar eritrocitos de mamíferos y su ocurrencia en un amplio espectro de especificidades antigénicas. (40)

Se piensa que *C. jejuni* posee una multiplicidad de especificidades de LPS, pero los conocimientos actuales de la composición y estructura de

los LPS no ha podido clarificar el entendimiento de las bases para esta diversidad serológica. Se ha apreciado que las cepas rugosas de *C. jejuni* producen un LPS completo, consistente de lípido A y azúcares esenciales, mientras que las cepas lisas producen moléculas completas de LPS, consistentes de lípido A y azúcares esenciales con 10-25 residuos de hexosas por 3 residuos de heptosa. De esto se ha postulado que existen dos tipos de LPS una posibilidad es que el LPS sea de una estructura similar a los LPS de *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae*; consiste de un lípido A unido a un oligosacárido corto. Y la otra posibilidad es que el LPS sea similar al LPS de las enterobacterias.

(40)

Se ha comprobado que la colonización o la infección por *C. jejuni* da como resultado la formación de anticuerpos del tipo de las inmunoglobulinas IgM, IgA, e IgG con especificidad contra los LPS de la pared celular.

(4, 7, 30, 65)

Los anticuerpos aparecen a menudo alrededor del quinto día después de la infección, y alcanzan su mayor nivel en la fase aguda de la enfermedad y durante la etapa de convalecencia. (60) Los primeros anticuerpos en aparecer en circulación son IgG, y en niños de países subdesarrollados se ha observado que estos niveles de anticuerpos disminuyen rápidamente los primeros meses de vida; pero luego sufren un aumento considerable durante el segundo año de vida, alcanzando cerca de tres veces el nivel de los adultos. Subsecuentemente los niveles de IgG bajan hasta la segunda década de la vida y después permanecen relativamente constantes. Los niveles de IgA ini-

cian bajos y aumentan progresivamente de la infancia a la adolescencia, y continúan aumentando después en la vida adulta. Los niveles de IgM aumentan progresivamente hasta los dos años de vida, permanecen elevados hasta los 19 años de edad, y entonces gradualmente declinan durante la edad adulta. (4, 7)

En contraste, en niños de U.S.A. los niveles de IgA en los primeros años de vida permanecen casi ausentes, y en edad de 5-14 años empiezan a elevarse, alcanzando niveles similares a los encontrados en niños menores de un año en Bangladesh. Los niveles de IgG permanecen considerablemente bajos en los niños de uno a catorce años de edad, y los niveles de IgM aumentan progresivamente hasta la etapa pre-escolar (menores de 5 años) y después de esta edad siguen aumentando pero en cantidades menores. (4)

Se ha encontrado en países desarrollados y principalmente en países en vías de desarrollo, que un número considerable de personas sanas presentan anticuerpos contra *C. jejuni* por lo que se ha deducido que ésta presencia de anticuerpos de *C. jejuni* en el suero normal de personas adultas puede ser debido a una de las siguientes posibilidades:

- 1) *C. jejuni* y organismos relacionados son patógenos comunes, de esta forma es posible que la mayoría de los adultos tuvieran exposiciones tempranas en su vida.
- 2) La infección o colonización con enterobacterias u otros organismos Gram negativos pueden inducir al desarrollo de anticuerpos de reacción cruzada con *C. jejuni* o
- 3) Microorganismos relacionados pueden contener un antígeno esencial

común que es reconocido por los anticuerpos naturales de organismos Gram negativos. (5)

Se ha observado que mientras los aislamientos de *C. fetus* subsp. *fetus* son resistentes a la actividad bactericida del suero normal humano, los aislamientos de *C. jejuni* de heces o de sangre son sueros sensitivos. Esto quizás pueda servir para explicar porque las cepas de *C. fetus* subsp. *fetus* causan enfermedades sistémicas, mientras que la mayoría de las cepas de *C. jejuni* causan diarrea aguda. (5)

El diagnóstico serológico de *C. jejuni* puede ser útil cuando no se ha aislado la bacteria de un coprocultivo, debido al tratamiento del paciente con antibióticos o alguna otra circunstancia. La presencia de anticuerpos de *C. jejuni* en circulación han sido reconocidos a través de varios métodos, como aglutinación, fijación del complemento, inmunofluorescencia indirecta y ELISA. El serodiagnóstico tiene el inconveniente de que no se puede utilizar en casos aislados de diarrea debido a la heterogenicidad de los organismos y porque no existe hasta la fecha un antígeno común que reúna los diferentes serotipos de *C. jejuni*. La técnica de ELISA es la más usada, la sensibilidad de esta técnica es alta y se ha observado una muy buena especificidad. (4, 7, 30, 65)

III.- MANIFESTACIONES CLINICAS

La enfermedad causada por *C. jejuni* se parece a la gastroenteritis por *Salmonella*. El periodo de incubación se estima de 1-4 días, pero en forma general se ha observado que varía de 1-11 días, despues del cual empieza el cuadro clínico típico. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad empiezan súbitamente, sin pródromos, aunque en algunos pacientes el inicio de la diarrea es precedido por un periodo de fiebre, cefalea, constipación y mialgias. (3, 60)

La diarrea empieza gradualmente en algunos pacientes y explosivamente en otros; pero en ambos casos las heces son fluidas, a menudo teñidas de bilis y finalmente acuosas. (60)

El cuadro clínico de la enfermedad durante la fase aguda se caracteriza por diarrea acompañada de moco y sangre, dolor tipo cólico, retortijones, fiebre, anorexia, flatulencia, cefalea, mialgias, artralgias, nauseas y algunas veces vómito. El dolor abdominal suele ser espásmico intermitente y de intensidad variable que a veces puede confundirse con abdomen agudo, ya que a través de la enfermedad muchos pacientes son más afectados por el dolor abdominal que por la diarrea. (3, 52, 60)

La diarrea es el primer dato de la enfermedad, que comúnmente se presenta en el curso de las 24 h siguientes al inicio del dolor abdominal, el paciente presenta evacuaciones líquidas abundantes, fétidas, en número variable que puede llegar a ser hasta de 20 en 24 h, y casi todos los pa-

cientes tienen por lo menos ocho deposiciones acuosas al día. (3, 29, 59)
El período diarreico puede durar hasta 21 días; por lo general, el estado profuso de la enfermedad se resuelve en el término de 1-3 días, después del cual las evacuaciones son menos frecuentes y las heces se vuelven semiformadas; pero pueden presentarse cuadros diarreicos en forma recurrente con períodos de remisión variable. El 60% de los pacientes se encuentra asintomático después de una semana y el 86%, a las dos semanas. (3, 48, 60)

Se observan moco y/o estrías de sangre en más o menos la mitad de las muestras de heces entre el segundo y el tercer día de iniciado el cuadro y rara vez en el primer día. (52)

El dolor abdominal se observa en un 60 a 70% de los casos; es típicamente periumbilical, intermitente, tipo cólico, pueden estar involucrados todos los cuadrantes del abdomen, aunque el dolor se refiere con mayor frecuencia en cuadrantes inferiores. El dolor es más severo durante el pico del cuadro diarreico, en ocasiones simula cuadros de apendicitis, adenitis mesenterica, intususcepción o perforación intestinal. El dolor disminuye, por lo general, dentro de la primera semana de la enfermedad y puede persistir en forma intermitente y leve hasta por seis semanas. (3, 52)

Se presenta vómito en una tercera parte de los pacientes, por lo general leve y no se asocia con deshidratación; ésta y el desequilibrio hídrico son complicaciones poco frecuentes; cuando se llegan a presentar, por lo general son leves, más frecuentes con casos asociados con otros enteropatógenos como *Rotavirus* y *Shigella*. (52)

Se tiene conocimiento de una elevada proporción de reportes de enteritis por *C. jejuni*, aunque también ha sido asociado con una variedad de enfermedades extraintestinales, (2, 14, 39, 44, 51) pocos reportes se tienen de que este organismo sea la causa de muerte en humanos. En U.S.A. las infecciones por *C. jejuni* han sido asociadas a casos fatales en donde la causa exacta de la muerte no se ha establecido; pero en los exámenes postmortem se ha encontrado en cultivos de heces la presencia de *C. jejuni*, por lo que se deduce que en estos casos de muerte *C. jejuni*, debe desempeñar un papel importante. (63) Se ha encontrado que *C. jejuni* es una importante causa de enteritis y septicemia en pacientes inmunosuprimidos. (30, 63) En pacientes hipogammaglobulinémicos causa infección recurrente, que al paso del tiempo produce desequilibrios en los sistemas del organismo que conducen a la muerte. (30)

En los cuadros leves de enteritis causada por *C. jejuni* no hace falta dar antibióticos, la mayoría de los pacientes se recuperan en forma espontánea; únicamente requieren de un manejo conservador y restituir las pérdidas de agua y electrolitos en aquellos casos con datos de deshidratación, al igual que un adecuado aporte calórico. (3, 52) En los casos en que el cuadro no remite en un promedio de 4-5 días con un manejo conservador, y en los cuales se tiene conocimiento de que esta diarrea es producida por *C. jejuni*, se puede utilizar una serie de fármacos a los cuales se ha encontrado que este microorganismo es sensible, entre los cuales cabe mencionar: Eritromicina, gentamicina, tetraciclina, cloramfenicol, furazolidona, neomicina, tobramicina etc.; con cualquiera de estos fármacos se ha encontrado que se tienen buenos resultados en la terapia de enteritis por *C. jejuni*. (3, 22, 30, 52, 60, 62) De todos estos antimicrobianos mencionados

se ha encontrado que el antibiótico de elección es la eritromicina, que a dosis de 40 mg/kg/día durante 7-10 días; por lo general, el cuadro cede en las primeras 24 h. Cuando se requieren antibióticos parenterales, se recomienda la gentamicina, de 3-5 mg/kg por vía intramuscular o intravenosa cada 8 h. (3, 52) También se ha encontrado que con la combinación de es tos dos antibióticos se logra un sinergismo aditivo, que permite un más rápido restablecimiento del paciente en casos graves de enteritis. (30)

IV.- DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico de enteritis por *C. jejuni* puede ser sugerido clínicamente ante la presencia de diarrea líquida, seguida de moco y/o estrías de sangre en heces y acompañada de dolor abdominal severo; sin embargo, no hay que olvidar que este síndrome es compatible con cuadros clínicos ocasionados por *Salmonella*, *Shigella* y algunas parasitosis como la amibiasis, por lo que el diagnóstico de infección por *C. jejuni* deberá ser apoyado con la confirmación microbiológica a través de coprocultivos para la identificación de los enteropatógenos más comunes y estudios coproparasitoscópicos para las amibas.

El examen directo de las muestras de heces se puede utilizar para obtener un diagnóstico presuntivo rápido. Esto se puede lograr con la ayuda del microscopio de contraste de fases (47) o por el uso del microscopio de campo oscuro, (46, 67) en donde se observa la movilidad a saltos o como de sacacorchos y la típica morfología de *C. jejuni*. Debe usarse una proporción de heces diluidas en caldo *Brucella*, y no solución fisiológica, ya que se ha comprobado que esta última inhibe la movilidad. (22) Esta movilidad debe ser probada dentro de las dos primeras horas de tomada la muestra, ya que se ha observado que después de este tiempo *C. jejuni* disminuye su movilidad.

La movilidad vista en microscopio de campo oscuro o de contraste de fases puede dar falsos positivos, confundiéndose con la movilidad de *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*. Esta prueba de la movilidad puede com

plementarse con un frotis teñido por Gram (46) o con una solución acuosa de fuscina básica al 1.0%, (47) en donde se va a observar la morfología microscópica de *C. jejuni*. Park, (47) considera que la tinción con fuscina básica es de mayor utilidad en estos casos que la de Gram, ya que es más específica; pero con la tinción de Gram se tiene la ventaja de que también se puede observar leucocitos polimorfonucleares (PMN), que son muy predictivos de enteritis aguda cuando se ha observado la movilidad de *Campylobacter*. (48) Cuando las heces son diarreicas, de consistencia pastosa o líquida y además, se observa la presencia de sangre oculta y/o trazas de moco, se puede hacer un diagnóstico presuntivo rápido; si en la tinción de Gram se observan PMN con presencia de bacilos curvos Gram negativos y flora normal en apariencia reducida; todo esto es sugerente de enteritis por *C. jejuni*. (46, 48, 52)

Además de coprocultivo en los casos severos de enteritis por *C. jejuni*, es recomendable realizar otros exámenes de laboratorio para tener una valoración diagnóstica más completa del paciente; que nos permita comprender más fácilmente la gravedad de la enfermedad y el estado patológico del paciente, entre estas pruebas se incluye: determinación de electrolitos séricos, urea, creatinina, recuento sanguíneo completo y una sigmoidoscopia.

(3)

El diagnóstico serológico de enteritis por *C. jejuni* no es recomendable en casos aislados de diarrea, ya que hasta la fecha no existe una mezcla completa que reuna todos serotipos de *C. jejuni*. El diagnóstico serológico es útil para detectar epidemias por este microorganismo o para estudios epidemiológicos. (52)

IV.1. MEDIOS SELECTIVOS

El cultivo de *C. jejuni* inicialmente incluía filtración previa de la suspensión de heces a través de un filtro millipore y posteriormente se inoculaban en el medio de cultivo. (56) Esto está basado en la peculiaridad que tiene *C. jejuni* de ser lo bastante pequeño para pasar a través del filtro, quedando retenidos los otros microorganismos, (60) de esta manera Butzler (11) aisló *C. jejuni* de las heces de 5.1% de niños con diarrea y de 1.3% de niños normales. Posteriormente este método de la filtración fue abandonado, por la creación de medios selectivos que incluyen en su fórmula diferentes antimicrobianos. En la actualidad se considera no necesaria la filtración de la suspensión de heces para el aislamiento de estos microorganismos, ya que existen en el mercado una variedad de medios que sirven para este fin; entre los más comunes se encuentran el medio de Skirrow, (49, 60) el medio de Butzler (11, 49) y el Campy-BAP formulado por Blaser y col. (42, 62)

Medio de Butzler

Base de agar sangre

5-7% de sangre desfibrinada de carnero

| | |
|--------------------|-------------|
| Bacitracina..... | 2 500 UI/1 |
| Ciclohexamida..... | 50 mg/1 |
| Colistina..... | 10 000 UI/1 |
| Cefazolina..... | 15 mg/1 |
| Novobiocina..... | 5 mg/1 |

Campy-BAP (fórmula de Blaser)

Base de agar *Brucella*

5 % de eritrocitos de carnero

| | |
|---------------------|------------|
| Vancomicina..... | 10 mg/l |
| Trimetoprim..... | 5 mg/l |
| Polimixina B..... | 2 500 UI/l |
| Cefalotina..... | 15 mg/l |
| Amfotericina B..... | 2 mg/l |

Medio de Skirrow

Base de agar sangre

5-7 % de sangre desfibrinada de caballo

| | |
|-------------------|------------|
| Vancomicina..... | 10 mg/l |
| Polimixina B..... | 2 500 UI/l |
| Trimetoprim..... | 5 mg/l |

La incorporación de suplemento a estos medios selectivos para el desarrollo de *C. jejuni* tiene como objetivo inhibir el crecimiento de los microorganismos de la flora normal entérica, que debido a su rápido desarrollo aunado a las condiciones de microaerofilia y lento crecimiento de *C. jejuni*, eran unos de los graves inconvenientes para el aislamiento de este microorganismo de las muestras de heces.

El suplemento del medio de Skirrow está compuesto por los antibióticos trimetoprim, polimixina B y vancomicina. (49, 60, 62) El trimetoprim es un potente inhibidor de la enzima bacteriana dihidrofolato reductasa, la cual es la encargada de la conversión de dihidrofolato a tetrahidrofolato. Esta interferencia produce una carencia de la existencia de tetrahidrofolato, la cual tiene múltiples efectos en el metabolismo celular bacteriano. La reacción más afectada es la síntesis de timina, la cual finalmente afecta la síntesis de DNA indispensable para el crecimiento bacteriano. El trimetoprim va a actuar principalmente en contra de los bacilos Gram negativos de la flora entérica del organismo. (8, 32)

La polimixina B es un antibiótico de espectro reducido, que en el medio selectivo tiene la finalidad de actuar en contra de *Pseudomonas aeruginosa*, las enterobacterias: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* y los géneros *Salmonella* y *Shigella*. (32)

La polimixina B sola es ineficaz en contra del género *Proteus* y el trimetoprim por sí solo únicamente es bacteriostático; pero se ha encontrado que en el medio de Skirrow, estos dos antibióticos producen un sinergismo de potenciación en contra del género *Proteus*. (8) La polimixina B se combina con los elementos proteínicos y lipídicos de la membrana celular de las bacterias, produciendo su alteración e impidiendo que actúe como una barrera osmótica, con lo cual la bacteria pierde sus elementos nutritivos, lo que altera su metabolismo y la conduce a su destrucción. (32)

La vancomicina es un glucopéptido de un peso molecular aproximado de 1 500 Daltons. Tiene actividad en contra de bacterias Gram positivas como los *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y las especies del género *Streptococcus*: *St. faecalis*, *St. pyogenes*, *St. pneumoniae* y *St. viridans*. La vancomicina inhibe la síntesis de la pared celular en las bacterias sensibles uniéndose con gran afinidad a precursores de esta estructura. La porción D-alanil-D-alanina de las unidades precursoras de la pared celular parecen ser un sitio fundamental de adherencia. La droga es rápidamente bactericida para los microorganismos en división.

(32)

Se ha observado que todos estos medios selectivos presentan pequeños problemas por desarrollo de algunos contaminantes, principalmente, de tipo bacteriano, que dificultan el aislamiento de *C. jejuni*. Los contaminantes más frecuentes pertenecen a miembros de la familia Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* y en menor grado levaduras. (23, 49)

Estos medios ampliamente usados en el cultivo y aislamiento de *C. jejuni*, según estudios comparativos han mostrado que ninguno es completamente satisfactorio y el uso de dos medios diferentes ha sido considerado para alcanzar una óptima proporción de aislamientos. Por ejemplo, en un estudio usando a la vez el medio de Skirrow, el medio de Butzler (BU₁₀) y una modificación de éste último medio (BU₄₀) conteniendo 40 UI/ml de colistina en lugar de 10 UI/ml, según la fórmula original, Patton, (49) encontró que el 98% del total de aislamientos correspondían conjuntamente al medio de Skirrow y al BU₄₀, mientras que independientemente los valores

eran 63 y 91% para los medios de Skirrow y BU₄₀ respectivamente. Además, encontró que la proporción de aislamientos entre el medio de Skirrow y BU₁₀ no son diferentes significativamente. Otra combinación puede ser el uso del medio de Skirrow en conjunto con el medio de Bolton. (23)

IV. 2.- PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.

Las muestras obtenidas para el aislamiento de *C. jejuni* deben de ser procesadas de inmediato por el laboratorio, lo que a veces no es posible, en estos casos se recomienda que la muestra, bien sea de muestras de heces o de raspados rectales con hisopo, se deposite en un medio de transporte como el Campy-Thio, el medio de Cary-Blaer solución alcalina de peptona o en un regulador de glicerol; Todos estos medios han demostrado eficacia para mantener la viabilidad de *C. jejuni* por tres días a temperatura ambiente y durante una semana en refrigeración. (22, 34)

La inoculación indirecta de las muestras es útil cuando se tienen que trabajar varias muestras o en fines de semana por ejemplo. Se inoculan los medios de transporte y se refrigeran, para posteriormente subcultivarse. Sin embargo, la duración de la refrigeración no parece ser crítica siempre que sea mayor de cuatro horas. (22)

Las placas se pueden inocular directamente del hisopo del raspado rectal y de las muestras de heces diarreicas, inoculando de 3 a 5 gotas. Un método que da buen resultado, es el uso de un hisopo para hacer muestreo de todas las áreas más sospechosas de las heces, procediendo a la

siembra para aislar e incubar. (22)

Las placas estriadas para el aislamiento de *C. jejuni* deben de incubarse de 42-43°C en una atmósfera que contenga 5.0% de oxígeno, 10% de bióxido de carbono y 85% de nitrógeno. (9, 13, 29, 38, 56)

Los microorganismos pueden crecer bien a 37°C, sin embargo temperaturas de 42°C permiten mejor desarrollo de las colonias y al mismo tiempo inhiben en parte el desarrollo de los microorganismos de la flora normal del intestino. (22, 52, 62)

Las placas deben de examinarse a las 24 y 48 h de incubación, pues se ha observado que algunas cepas crecen bien a las 24 h, pero en cambio otras requieren de mayor tiempo.

Para obtener un diagnóstico más rápido de las enteritis ocasionadas por *C. jejuni*, las placas deben de examinarse a las 24 h de incubación y si todavía no se ha obtenido un crecimiento que muestre la típica morfología colonial, entonces las placas se reintegran de nuevo a la atmósfera apropiada para asegurar la viabilidad de las cepas más sensibles al oxígeno. En una placa selectiva las colonias crecen bien a 42°C; de las colonias sospechosas de *C. jejuni* se toma una muestra y se efectúa una preparación con caldo *Brucella* para ser observada al microscopio de campo oscuro (46, 57) o de contraste de fases, (47) donde se observa la morfología y la movilidad de estos microorganismos; si no se cuenta con estos aparatos basta con hacer una tinción de Gram (46) o una tinción

con fuscina básica al 1.0% (47) para observar la morfología característica de *C. jejuni*. Una vez que se demostró la presencia de espirilos Gram negativos en las colonias desarrolladas en el medio selectivo, se realizan las pruebas de oxidasa y catalasa, a las cuales *C. jejuni* es positivo.

Para la prueba de la sensibilidad a los antibióticos se siembra en una placa de agar sangre o de Muller-Hinton las bacterias identificadas presuntivamente como *C. jejuni*, y se colocan discos de ácido nalidixico y cefalotina a los que *C. jejuni* es sensible y resistente respectivamente. (22, 48, 62) Para mayor comodidad y ahorro de espacio, estas placas se pueden incubar dentro de las jarras en las cuales se van a colocar las muestras que en ese día se van a trabajar. Hasta estos pasos se dice que se tiene una identificación presuntiva y para obtener una identificación confirmativa se deben de realizar las pruebas de caracterización.

IV. 3.- CONDICIONES DE INCUBACION

Una de las dificultades asociadas con el aislamiento primario de *C. Jejuni* fue el establecimiento de los medios para crear la atmósfera microaerofílica necesaria para su desarrollo. Hoy en día la atmósfera microaerofílica puede crearse a través de varias formas, desde la más económica y sencilla hasta las más complejas y costosas como sería el uso de un equipo para el intercambio de gases consistente en jarras de anaerobiosis con tapa modificada para intercambio de gases, bomba de vacío, manómetro de mercurio y tanques con mezcla de 5% de O_2 , 10% de

CO₂ y 85% de N₂, (48) o bien el mismo tanque de gas y el uso de bolsas de polietileno (Polybag, Levin Bros. Paper Corp., Chicago, III.), en donde las placas a incubar se colocan en una bolsa de polietileno, ésta se infla usando el tanque con un regulador, la bolsa se oprime una o dos veces para equilibrar la atmósfera ambiente, vuelve a inflarse, se ata con una banda de goma y se coloca en el incubador. Aunque cada bolsa puede contener 12 placas, no se deben colocar en su interior más de 6 u 8. La flora fecal que crece en las placas selectivas puede disminuir más aun el contenido ya reducido de oxígeno, haciendo que la atmósfera sea menos conveniente para el desarrollo de *C. jejuni*. Cuando la bolsa está bien inflada, las 6 u 8 placas que contiene deben ocupar la mitad de todo el volumen, esto mantiene una concentración suficiente de oxígeno. (22) El uso de una jarra de torbal (torsión Balance Co., Clifton, N. J.) y un sistema de evacuación al vacío, junto con el tanque de gas ya mencionado, son también eficaces para mantener la atmósfera apropiada. (9) Uno de los métodos más populares es el uso del sistema Gas-Pak (BBL Microbiology Systems) sin el catalizador, (9, 69) con el cual se alcanza una concentración final de gases estimada en 7% de oxígeno, 10% de dióxido de carbono, 25% de nitrógeno y 58% de hidrógeno, (23) y el método más económico y al alcance de cualquier laboratorio: un frasco con una vela. (33, 69)

IV.4.- IDENTIFICACION

No obstante que *C. jejuni* ha sido a menudo asociado clínicamente con enfermedades diarreicas en humanos, el intento de aislamiento de los

organismos de las heces fracasaba debido a sus requerimientos de microaerofilia, a su lento desarrollo y en consecuencia al sobredesarrollo de coliformes. La introducción de un medio selectivo y las condiciones óptimas de desarrollo permitieron el aislamiento de C. jejuni de las muestras de heces, y ha sido a través de las pruebas de rutina, al alcance de los laboratorios clínicos de Microbiología, que se ha conseguido la identificación de C. jejuni.

Para una identificación presuntiva rápida de C. jejuni, las muestras seleccionadas para el aislamiento de este microorganismo inicialmente se les debe de realizar una preparación para ser observada al microscopio de campo oscuro (46, 67) o en microscopio de contraste de fases, (47) en donde se observa la movilidad a saltos y la típica morfología de C. jejuni. Si no se cuenta con estos aparatos basta con realizar un frotis con la tinción de Gram modificada (46) o con solución de fuscina básica al 1.0%, (47) con las cuales se trata de identificar la morfología microscópica de C. jejuni, la cual es muy característica por ser un bastón Gram negativo, que además puede presentar formas como de coma, formas de S o bacilos tri y tetracurvados que son sus formas más comunes. (19, 43, 50)

Una vez efectuada la siembra de las muestras en el medio selectivo para el aislamiento de C. jejuni, éstas son incubadas a 43°C durante 24-48 h. en una atmósfera microaeróbica. (9, 13), 29, 38, 58)

Las placas se examinan a las 24 y 48 h de incubación, se ha encon

trado que por lo general las colonias de *C. jejuni* desarrollan bien a las 24 h de incubación a una temperatura de 42°C y si no lo han logrado completamente, se observa un ligero crecimiento que al día siguiente es completo. La morfología de las colonias puede variar de acuerdo al tiempo de incubación, atmósfera de incubación, temperatura de incubación, número de subcultivos y humedad del medio. (9, 10, 33, 43, 69) Las colonias no son hemolíticas en agar sangre, miden de 1-2 mm de diámetro, crecen ligeramente después del primer aislamiento en agar Mac Conkey, (62) en caldo de Muller-Hinton y tioglicolato. (12, 43) se distinguen dos tipos de colonias en el primer aislamiento, una es pequeña, plana, gris, finamente granular, translúcida con bordes irregulares y se extiende a lo largo de la dirección de la estriá. La otra es redonda, lisa y brillante con bordes irregulares translúcidos y oscuros. (10, 62) De las colonias sospechosas de *C. jejuni* se toma la muestra y se efectúa una preparación para ser teñida nuevamente con la tinción de Gram modificada o con fuscina básica para mostrar los organismos típicos Gram negativos, además, hay que efectuar las pruebas de la catalasa y la oxidasa. Con la positividad de las pruebas hasta aquí realizadas, podemos decir presuntivamente que hemos aislado *C. jejuni*. Para obtener una identificación confirmativa se deben de realizar las pruebas de caracterización de las cuales se encuentran: la sensibilidad a 30 µg de ácido nalidíxico, resistencia a 30 µg de cefalotina, crecimiento en caldo de *Brucella* con 1.0% de glicina, producción de H₂S captada en papel con acetato de plomo, reducción de nitratos a nitritos, hidrólisis del hipurato, tolerancia a 400 µg de trifeniltetrazolio, ausencia de crecimiento a 25°C y en solución de cloruro de sodio al 3.5% (18, 22, 35, 42, 45, 48, 62)

Tabla 2

DIFERENCIACION DE LAS ESPECIES *Campylobacter*

| | Oxidasa | Catalasa | Ac. nalidixico | Cefalotina | Medio TTC | Glicina 1% | NaCl 3.5% | Bilis 1% | 25° C | 35° C | 43° C | Red. nitratos | H. hipurato | O-F | Indol | TSI o SIM | Tira AcPb | Produc. H ₂ S en: |
|--|---------|----------|----------------|------------|-----------|------------|-----------|----------|-------|-------|-------|---------------|-------------|-----|-------|-----------|-----------|---------------------------------|
| <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | + | + | R | S | - | + | - | + | + | + | - | + | - | - | - | - | - | d |
| <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> | + | + | R | S | - | - | - | + | + | + | - | + | - | - | - | - | - | d |
| <i>C. jejuni</i> | + | + | S | R | + | + | - | + | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + |
| <i>C. coli</i> | + | + | S | R | - | - | - | + | - | + | + | + | - | - | - | - | + | + |
| <i>C. sputorum</i> subsp. <i>sputorum</i> | + | - | R | S | - | + | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + |
| <i>C. sputorum</i> subsp. <i>bubulus</i> | + | - | d | S | - | + | + | - | + | + | - | + | - | - | - | + | + | + |
| <i>C. sputorum</i> subsp. <i>mucosalis</i> | + | - | d | S | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | + | + | + |
| <i>C. concisus</i> | + | - | R | - | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - | + | + | + |

Modificado de las referencias (22, 52, 61, 62)

Tabla 3 IDENTIFICACION DE C. jejuni

| | |
|-------------------------|---|
| Catalasa | + |
| Oxidasa | + |
| Red. nitratos | + |
| Crec. 25° C | - |
| Ac. nalidixico | S |
| Cefalotina | R |
| Medio TTC | + |
| Desarrollo en: | |
| Glicina 1 % | + |
| Cloruro de sodio 3. 5 % | - |

Modificado de las referencias

(22, 52, 61, 62)

V.- OBJETIVOS

Objetivo General: Establecer una técnica para el aislamiento e identificación de *Campylobacter jejuni*.

Objetivo particular: Determinar la frecuencia de *Campylobacter jejuni* como agente etiológico de enteritis y su relación con los enteropatógenos bacterianos tradicionales.

VI.- MATERIAL Y METODOS

Desde octubre de 1985 hasta abril de 1986 se estudiaron 219 muestras de materia fecal obtenidas en su mayoría por hisopado rectal, que llegaron al Laboratorio de Microbiología Especial del Hospital General Centro Médico "La Raza" obtenidas de pacientes con diagnóstico de diarrea, gastroenteritis de larga evolución, gastroenteritis aguda y diarrea de larga evolución, se utilizó un grupo control de 85 muestras de heces de pacientes del mismo hospital que tuvieran cualquier otro diagnóstico que no estuviera relacionado con padecimientos del tracto gastrointestinal.

Las muestras fueron procesadas para el aislamiento de *C. jejuni*, sembrándose en un medio selectivo; al mismo tiempo se trabajaron para el aislamiento de las enterobacterias clásicas de gastroenteritis en nuestro país, sembrándose en los medios señalados en el diagrama de trabajo (Fig. 1).

En nuestra investigación nosotros utilizamos un medio selectivo que contiene el suplemento del medio de Skirrow y la misma base y sangre del medio de Butzler. Este suplemento se produce nacionalmente (MERCK) y se encuentra disponible en el mercado, la fórmula del medio selectivo es la siguiente:

Medio selectivo para *Campylobacter jejuni*

Base de agar *Brucella*

5 % de sangre desfibrinada de carnero

Vancomicina 10 mg/l

Polimixina B 250 ug/l

Trimetoprim 5 mg/l

Preparación:

1. Suspender 42 g de base agar *Brucella* en 1000 ml de agua desmineralisada y calentar a ebullición hasta disolver completamente. Distribuir el medio líquido en frascos de 200 ml.
2. Esterilizar el medio a 121° C / 15 min.
3. Enfriar el medio de 45-50° C.
4. Para preparar 200 ml de agar selectivo para *Campylobacter*, al contenido de un frasquito de suplemento (forma liofilizada) agregar 2.0 ml de agua estéril y adicionarlo a 10 ml de sangre desfibrinada de carnero.
5. Agregar la mezcla de suplemento y sangre de carnero al medio líquido y mezclar.
6. Vaciar el medio en placas y enfriar a temperatura ambiente.

El pH del medio es de 7.2 ± 0.1 y tiene la ventaja de que puede permanecer en buen estado hasta por tres meses en refrigeración, aunque hay que tener cuidado de no almacenarlo mucho tiempo, pues las últimas cajas se contaminan generalmente con hongos.

Nuestro suplemento usado está compuesto de los antibióticos trimetoprim, polimixina B y vancomicina, que junto con el uso de sangre de carnero en lugar de sangre de caballo, permite una mejor acción del trimetoprim; ya que la sangre de carnero a diferencia de la de caballo contiene bajos niveles de concentración de la enzima timidina fosforilasa, enzima responsable de la conversión de timidina a timina. (8)

Existen varios medios disponibles en el mercado usados como medios de transporte para C. jejuni, que mantienen la viabilidad de este microorganismo hasta por una semana en refrigeración. (22, 34) Nosotros usamos como medio de transporte el medio de Stuart con muy buenos resultados, ya que siempre que identificamos presuntivamente a C. jejuni éstos crecieron por cultivo. Además por lo general sembrábamos las muestras el mismo día o a más tardar al día siguiente.

Obtuvimos las muestras en su mayoría por hisopado rectal, además se hicieron dos frotis por cada muestra para teñirlas con la tinción de Gram y una solución de fuscina básica al 1.0% respectivamente. Posteriormente abandonamos esta última tinción y únicamente utilizamos la tinción de Gram modificada, ya que encontramos que con ésta se observan

mucho mejor las células de *C. jejuni*, que con la práctica se pueden diferenciar sin problemas de las otras bacterias, bien sean patógenas o flora normal, que se encuentran en las heces. Además, con esta tinción se tiene la ventaja de que también se pueden observar los PMN que son muy importantes en las infecciones por *C. jejuni*. (46, 47, 67)

Las muestras después de sembradas en el medio selectivo se colocaron en una jarra para anserobios con el sistema Gas-Pak (BBL Microbiology Systems) sin catalizador, para crear la atmósfera microaerofílica adecuada para el desarrollo de *C. jejuni* y se incubaron de 24-48 h en una estufa bacteriológica a 42°C. (23, 48)

Nosotros trabajamos principalmente el sistema Gas-Pak, pero al final debido a problemas de abastecimiento de material tuvimos que recurrir al uso de la jarra con una vela, la cual inicialmente, alcanza una concentración de cerca de 17% de oxígeno y 3% de dióxido de carbono, (33, 69) y quizá debido al consumo de oxígeno por el desarrollo de la flora entérica se produce la concentración apropiada de oxígeno que permite el crecimiento de *C. jejuni* de las muestras de heces, tal como es propuesto por el principio de Fortner. (9)

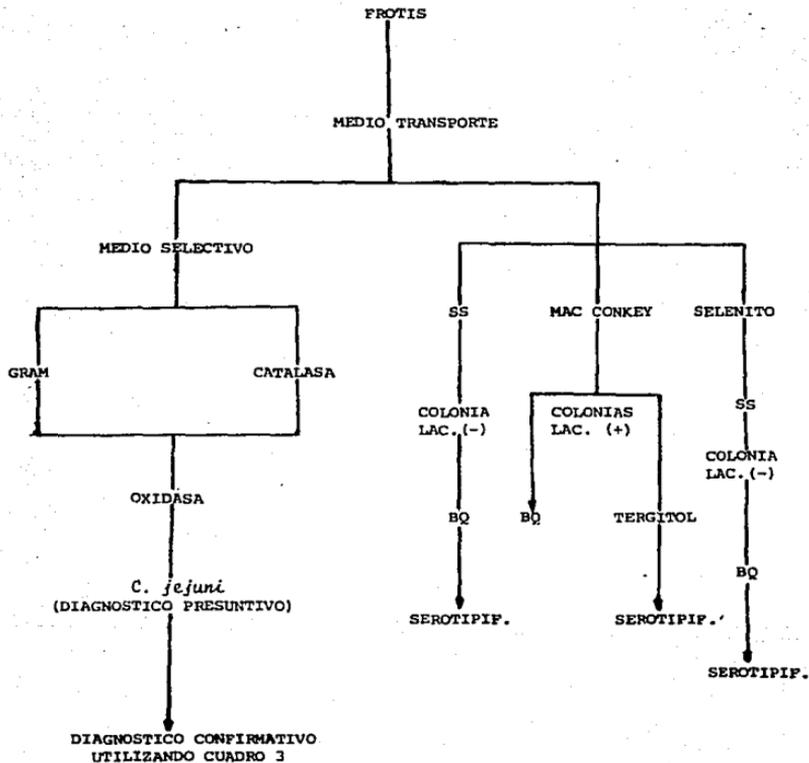
Trabajamos conjuntamente tratando de aislar *C. jejuni*, en el medio anteriormente citado, y las bacterias clásicas de infección intestinal en nuestro país: *Escherichia coli* enteropatógena principalmente en niños, y los géneros *Salmonella*, *Shigella* y *Aeromonas*. Debido a su caracte

rística morfología colonial *C. jejuni* se confunde muy poco en placa, con otras bacterias, por lo que a todas las colonias sospechosas se les realizó las pruebas necesarias para su identificación señaladas en el diagrama de trabajo (Fig. 1).

Para una identificación confirmativa y completa de *C. jejuni* se deben de realizar la mayoría de pruebas que estén al alcance del laboratorio, nosotros realizamos las pruebas en disco de sensibilidad a 30 μ g de ácido nalidixico y resistencia a 30 μ g de cefalotina, el crecimiento en caldo de *Brucella* con 1.0 % de glicina, reducción de nitratos a nitritos, tolerancia a 400 μ g de trifeniltetrazolio y ausencia de crecimiento a 25°C y en una solución de cloruro de sodio al 3.5%. Estas pruebas son representativas de *C. jejuni* y nos permiten diferenciarlos de las demás especies del género *Campylobacter* (Tabla 2). (22, 52, 61, 62)

Fig. 1

DIAGRAMA DE TRABAJO



VII.- RESULTADOS

De los resultados presentados en la Tabla 4, se puede observar que durante el período de siete meses, tiempo que duró la investigación a partir de las 219 muestras de materia fecal estudiadas, con solicitud de coprocultivo, se obtuvieron un total de siete muestras positivas para *C. jejuni*, lo que corresponde al 3.19%; y no se obtuvo ningún aislamiento del grupo considerado como control.

En los siete casos de infección por *Campylobacter* que se presentaron en la investigación, cinco cepas de *C. jejuni* fueron aisladas de lactantes, dos en niños de edad escolar y ninguna en adultos (Tabla 5).

Todos los pacientes con aislamiento de *C. jejuni* presentaron heces diarreicas; en dos casos se observó la presencia de sangre y moco en las heces y en un sólo caso se apreció la presencia de moco. Únicamente en tres de los siete casos positivos para *C. jejuni* se observaron leucocitos polimorfonucleares.

C. jejuni se demostró como único agente enteropatógeno en todos los casos; en cambio, algunos de los otros enteropatógenos se presentaron en asociación con *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) para producir la enfermedad diarreica (Tabla 5).

Los aislamientos de las cepas de *C. jejuni* se realizaron en casi todos los meses que duró la investigación, pero principalmente en el mes

de octubre, fue cuando se obtuvo el mayor número de casos positivos, tres de un total de siete, lo que representa una frecuencia de 42.85% (Fig. 4)

Tabla 4 RELACION DE AGENTES ETIOLOGICOS ENCONTRADOS
EN LAS MUESTRAS DE MATERIA FECAL

| | # Casos Positivos | % |
|------------------------|-------------------|--------|
| <i>C. jejuni</i> | 7 | 3.19 |
| <i>Salmonellas</i> spp | 5 | 2.28 |
| <i>Shigella</i> spp | 2 | 0.91 |
| <i>A. hydrophila</i> | 2 | 0.91 |
| *EPEC | 82 | 37.44 |
| Flora Normal | 121 | 55.25 |
| T O T A L: | 219 | 100.00 |

* EPEC = *Escherichia coli* enteropat6gena.

Tabla 5 DISTRIBUCION DE LOS PACIENTES CON AISLAMIENTO DE
C. jejuni

| SERVICIO | EDAD | % CASOS POSITIVOS |
|-----------------|-----------|-------------------|
| Gastropediatria | Lactantes | 71.42 |
| Heaatopediatria | Escolares | 28.57 |

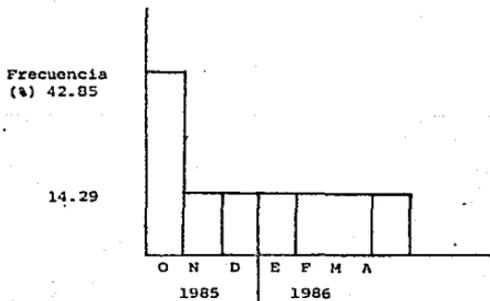
Tabla 6

RELACION DE AGENTES ETIOLOGICOS AISLADOS

| # CASOS POSITIVOS. | <i>C. jejuni</i> | <i>S. enteritidis</i> | <i>S. typhi</i> | <i>Sh. flexneri</i> | <i>A. hydrophila</i> | EPEC |
|--------------------|------------------|-----------------------|-----------------|---------------------|----------------------|------|
| 7 | + | - | - | - | - | - |
| 2 | - | + | - | - | - | - |
| 2 | - | + | - | - | - | + |
| 2 | - | - | - | + | - | + |
| 2 | - | - | - | - | + | - |
| 1 | - | - | + | - | - | + |
| 82 | - | - | - | - | - | + |

Fig. 2

FRECUENCIA DE ENTERITIS POR *C. jejuni*
DURANTE LOS MESES DE INVESTIGACION



VII.- DISCUSION

C. jejuni se aisló e identificó en el laboratorio con una frecuencia de 3.19 % del total de muestras trabajadas, proporción semejante con los publicados por otros autores como Bartlett y col. en U.S.A., 2.0% (1) y Pérez y col. en el Hospital General de México, SSA, 3.5% (52)

De los agentes etiológicos encontrados en el grupo de muestras estudiadas, *Campylobacter* fue el que presentó un mayor porcentaje en comparación con *Salmonella*, *Shigella* y *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*), de los cuales los dos primeros son los enteropatógenos clásicos, lo que demuestra que en la población estudiada es un enteropatógeno muy importante, lo cual se confirma con los estudios realizados en U.S.A., Inglaterra, Africa Central y otros países, en donde se menciona que *C. jejuni* es el principal o uno de los principales agentes causantes de diarrea en el mundo. (1, 15, 48, 57, 60)

Del total de muestras estudiadas, EPEC fue el microorganismo que en relación con los demás enteropatógenos aislados alcanzó el mayor porcentaje de frecuencia, 37.44 %, lo que indica que este enteropatógeno sí que siendo la principal causa de diarrea infantil en nuestra población, dado que se presenta en todas las épocas del año, y que sólo o en combinación con *Salmonella* o *Shigella* se puede encontrar produciendo la infección intestinal.

En nuestra investigación aislamos cinco cepas de *C. jejuni* de lactantes, dos cepas en niños de edad escolar y ninguna de adultos, ya que la mayoría de muestras que trabajamos procedían de infantes, debido a que la población del Hospital General C. M. "La Raza" está conformada principalmente por niños, que son quienes, al parecer padecen con mayor frecuencia esta enfermedad. Aunque serían necesarios mayores estudios en adultos para conocer su frecuencia real.

El 71.42% de aislamientos realizados fueron obtenidos de pacientes del servicio de gastropediatría, por lo que consideramos que en estos pacientes se debe mostrar mayor interés en la búsqueda de *C. jejuni* como agente causal de gastroenteritis, ya que la infección por este microorganismo es una de las causas de diarrea en la población estudiada.

C. jejuni es considerado como un organismo oportunista en pacientes con alguna deficiencia inmunológica, (6, 57) por lo que es probable que en los dos pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda, se hubiera aislado *C. jejuni*.

Según los resultados obtenidos, parece ser que *C. jejuni* es un organismo más común de lactantes, pero debido a las edades de los pacientes estudiados, se puede observar que también es un importante agente etiológico de gastroenteritis en escolares, de quienes se aisló con una frecuencia de 28.57% del total de casos positivos encontrados en la investigación.

En el grupo control no se encontró ningún caso positivo de aislamiento de *Campylobacter*, lo cual está de acuerdo con la afirmación de algunos autores, que mencionan que *C. jejuni* no se encuentra en las heces normales. (48, 70)

Por las características clínicas que presentaron los pacientes, el cuadro se puede confundir con otras gastroenteritis bacterianas, pero si se utilizan las pruebas de diagnóstico rápido, se pueden incrementar los elementos de juicio para un diagnóstico diferencial.

La enteritis por *C. jejuni* se puede presentar en cualquier temporada del año, pero principalmente en los meses de mayor calor es cuando se ha observado la mayor frecuencia de aislamientos de heces diarreicas. (1, 29, 57) Nosotros realizamos tres del total de siete aislamientos en el mes de octubre, que es el mes más cercano al verano, pero hacen falta más estudios realizados en otras épocas del año, de preferencia que abarquen un año de investigación, para saber con más claridad cual es la temporada de mayor frecuencia de enteritis por *C. jejuni* en nuestro país.

En México son pocos los estudios publicados acerca de investigaciones de campo, que nos permitan valorar la importancia de *C. jejuni* como agente etiológico de enteritis en nuestra población. Es por ello que consideramos de una manera imperante, la estandarización de una técnica que reúna las pruebas mínimas necesarias para la identificación correcta de *C. jejuni*, y que además sea adaptable a los laboratorios de

diagnóstico microbiológico, para así, poder administrar el tratamiento adecuado, el cual es diferente de la terapia de las deñs gastroenteritis clásicas, conocer cuales son los meses en los que se presenta la mayor frecuencia en nuestro país, así como ver su distribución en cuanto a edad y en general tener más datos epidemiológicos de esta enteritis en nuestra población.

VIII.- CONCLUSIONES

Por los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir lo siguiente:

1. *C. jejuni* fue el agente que presentó la mayor frecuencia de aislamientos, en comparación con los enteropatógenos clásicos de gastroenteritis en nuestra población, *Salmonella* y *Shigella*.
2. El mayor número de aislamientos se obtuvo en lactantes, por lo que consideramos que pudiera ser la población más afectada por *C. jejuni*.
3. *C. jejuni*, en relación con los demás enteropatógenos, siempre se presentó como único agente etiológico de enteritis en la población estudiada, lo cual apoya que realmente se encuentra como agente causal de diarrea.
4. Hacen falta mayores estudios, para conocer si existe la relación estacional con la frecuencia de diarrea ocasionada por *C. jejuni* en México.
5. *C. jejuni* es un importante agente etiológico de enteritis en la población estudiada, por lo que consideramos necesario el aislamiento e identificación de rutina de este microorganismo.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Bartlett, A. V., Moore, M., Gary, G. W., Starke, K. M., Erben, J. J., Meredith, B. A. Diarrheal illness among infants and toddlers in day care centers. I. Epidemiology and Pathogens. J. Pediatrics. 1985. 107:495-502.
- 2.- Berden, H.J.M., Mutjens, H. L., van de Putte, L.B.A. Reactive arthritis associated with *Campylobacter jejuni* enteritis. Br. Med. J. 1979. 1: 381-382.
- 3.- Bongiovanni, Gail L. Manual Clínico de Gastroenterología. Cap. Infecciones bacterianas del aparato digestivo. Trad. de Silva, Gustavo A. la. ed., Ed. McGraw-Hill, Méx. 1980. pp: 430-432.
- 4.- Blaser, M.J., Black, R. E., Duncan, D. J., Amer, J. *Campylobacter jejuni* -Specific Serum Antibodies Are Elevated In Healthy Bangladeshi Children. J. Clin. Microbiol. 1985. 21 (2): 164-167.
- 5.- Blaser, M. J., Smith, P. F., Kohler, P. F. Susceptibility of *Campylobacter* Isolates to the Bactericidal Activity of Human Serum. J. Infect. Dis. 1985. 151 (2): 227-235.
- 6.- Blaser, M. J., Pérez, G. P., Smith, P. F., Patton, Ch., Tenover, F. C., Lastovica, A. J., Wang, W. L. J. Infect. Dist. 1986. 153 (3): 552-559.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 7.- Blaser, M. J., Taylor, D. N., Echeverria, P. Immune Response to *Campylobacter jejuni* in a Rural Community in Thailand. *J. Infect. Dis.* 1986. 153 (2): 249-254.
- 8.- Bopp, Ch. A., Wells, J. G., Barrett, T. J. Trimethoprim Activity in Media Selective for *Campylobacter jejuni*.- *J. Clin. Microbiol.* 1982. 16 (5): 808-812.
- 9.- Buck, G. E., Fojtasek, C., Calvert, K., Kelly, M. Evaluation of the CampyPak II Gas Generator System for Isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 1982. 15 (1): 41-42.
- 10.- Buck, G. E. y Kelly, M. T. Effect of Moisture Content of the Medium on Colony Morphology of *Campylobacter fetus*. subsp. *jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 1981. 14 (5): 585-586.
- 11.- Butzler, J. P., Dekeyser, P., Detrain, M. y Dehaen, F. Related Vibrios in stools. *J. Pediatr.* 1973. 82: 493-495.
- 12.- Caldwell, M. B., Guerry, F., Lee, E. C., Burnans, J. P. y Walker, R. I. Reversible Expression of Flagella in *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 1985. 50 (3): 941-943.
- 13.- Chan, F.T.H. y Mackenzie, A.M.R. Enrichment Medium and Control System for Isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from Stools.

J. Clin. Microbiol. 1982. 15 (2): 12-15

- 14.- Davies, J. S. y Penfold, J. B. *Campylobacter* urinary infection. Lancet. 1979. 1: 1091-1092.
- 15.- DeMol, P. y Bosmans, E. *Campylobacter* Enteritis in Central Africa. Lancet. 1978. i: 604.
- 16.- Fox, J. G., Ackerman, J. A. y Newcomer, C. E. The Prevalence of *Campylobacter jejuni* in Random-Source Cats Used in Biomedical Research. J. Infect. Dis. 1985. 151 (4): 793.
- 17.- Georges Courbot, M. C., Baya, C., Beraud, A. M., Meunier, D.M.Y. y Georges, A. J. Distribution and Serotypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Enteric *Campylobacter* Strains Isolated from Children in the Central African Republic. J. Clin. Microbiol. 1986. 23 (3): 592-594.
- 18.- Hebert, G. A., Hollis, D. G., Weaver, R. E., Lambert, M. A., Blaser, M. J. y Moss, C. W. 30 Years of *Campylobacters*: Biochemical Characteristics and a Biotyping Proposal for *Campylobacter jejuni*. J. Clin. Microbiol. 1982. 15 (6): 1065-1073.

- 19.- Hernández, F., Cipagauta, L., Rivera, P., Herrera, M. L. y Rodríguez, R. M. Estudio ultraestructural de *Campylobacter fetus* ssp *jejuni*. Rev. Lat-amer. Microbiol. 1985. 27: 11-20.
- 20.- Hudson, P. J., Vogt, R. L., Brondum, J. y Patton, Ch. M. Isolation of *Campylobacter jejuni* from Milk During an Outbreak of *Campylobacteriosis*. J. Infect. Dis. 1984. 150 (5): 789.
- 21.- Johnson, W. M. y Lior, H. Toxins produced by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Lancet. 1984. i:229-230.
- 22.- Kaplan, R. L. 1980. *Campylobacter*, p. 235-241. In Lennette, E. H., Balows, A., Hausler, W. J. y Truant, J. P. (ed.), Manual of clinical Microbiology, 3rd ed. American Society for Microbiology. Washington, D. C.
- 23.- Karmali, M. A., Simor, A. E., Roscoe, M., Fleming, P. C., Smith, S. S. y Lane, J. Evaluation of a Blood-Free, Charcoal-Based, Selective Medium for the Isolation of *Campylobacter* Organisms from feces. J. Clin. Microbiol. 1986. 23 (3): 456-459.
- 24.- Klein, B. S., Vergeront, J. M., Blaser, M. J., Edmonds, P., Brenner, D. J., Janssen, D. y Davis, J. P. *Campylobacter* Infection Associated With Raw Milk. JAMA. 1986. 255 (3): 361-364.
- 25.- Klipstein, F. A. y Engert, R. F. Propierties of crude *Campylobacter*

- jejuni* heat-labile enterotoxins. Infect. Immun. 1984. 45: 314-319.
- 26.- Klipstein, F. A., y Engert, R. F. Immunological Relation ship of the B Subunits of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxins. Infect. Immun. 1985. 48 (3): 629-633.
- 27.- Klipstein, F. A., Engert, R. F., Short, H. y Schenk, E. A. Pathogenic Properties of *Campylobacter jejuni*: Assay and Correlation with Clinical Manifestations. Infect. Immun. 1985. 50 (1): 43-49.
- 28.- Koidis, P., Doyle, M. P. Survival of *Campylobacter jejuni* in Fresh and Heated Red Meat. J. Food Prot. 1983. 46 (9): 771-774.
- 29.- Lauwers, S., De Boeck, M. y Butzler, J. P. *Campylobacter* enteritis in Brussels. Lancet. 1978. 1: 604-605.
- 30.- LeBar, W. D., Menard, R. R. y Check, F. E. Hipogammaglobulinemia and Recurrent *Campylobacter jejuni* Infection. J. Infect. Dis. 1985. 152 (5): 1099-1100.
- 31.- Lior, H., Woodward, D. L., Edgar, J. A., Laroche, L. J. y Gill, P. Serotyping of *Campylobacter jejuni* by Slide Agglutination Based on Heat-Labile Antigenic Factors. J. Clin. Microbiol. 1982. 15 (2): 761-768.

- 32.- Litter, Manuel. Compendio de Farmacología. Cap. Farmacología de los procesos infecciosos. 2a. ed., 3a. reimp., Ed. "El Ateneo", España 1980. pp 508-570.
- 33.- Luechtefeld, N. W., Reller, L. B., Blaser, M. J. y Wang, W. L. Comparison of Atmospheres os Incubation for Primary Isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from animal Specimens: 5% Oxygen Versus Candle Jar. J. Clin. Microbiol. 1982. 15 (1): 53-57.
- 34.- Luechtefeld, N. W. y Wang, W. L. *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in a Turkey Processing Plant. J. Clin. Microbiol. 1981. 13 (2): 226-268.
- 35.- Luechtefeld, N. W. y Wang, W. L. Hippurate Hydrolysis by and Tripheniltetrazolium Tolerance of *Campylobacter fetus*. J. Clin. Microbiol. 15 (1): 137-140.
- 36.- Mathan, V. I., Rajan, D. P., Klipstein, F. A. y Engert, R. F. Lancet. 1984. ii: 981.
- 37.- McCardell, B. A., Madden, J. M. y Stanfield, J. T. Production of Cytotoxins by *Campylobacter*, Lancet. 1986. i:1031.
- 38.- McMyne, P.M.S., Penner, J. L., Mathias, R. G., Black, W. A. y Hennessy, J. N. Serotyping of *Campylobacter jejuni* Isolated from Sporadic Cases and Outbreaks in British Columbia. J. Clin. Microbiol.

1982. 16 (2): 281-285.

- 39.- Mertens, A., DeSmet, M. *Campylobacter* cholecystis. Lancet. 1979.
1: 1092-1093.
- 40.- Mills, S. D., Bradbury, W. C. y Penner, J. L. Basis for Serologi-
cal Heterogeneity of Thermostable Antigens of *Campylobacter jejuni*.
Infect. Immun. 1985. 50 (2): 284-291.
- 41.- Morooka, T., Umeda, A. y Amaki, K. Motility as an Intestinal Colo-
nization Factor for *Campylobacter jejuni*. J. Gen. Microbiol. 1985.
131: 1973-1980.
- 42.- Moskowitz, L. B. y Chester, B. Growth of Non-*Campylobacter*, Oxi-
dase-Positive Bacteria on Selective *Campylobacter* Agar. J. Clin.
Microbiol. 1982. 15 (6): 1144-1147.
- 43.- NG, L., Sherburne, R., Taylor, D. E. y Stiles, M. E. Morphologi-
cal Forms and Viability of *Campylobacter* Species Studied by Elec-
tron Microscopy. J. Bacteriol. 1985. 164 (1): 338-343.
- 44.- Norrby, R., McCloskey, R. V., Zackrisson, G. Meningitis caused by
Campylobacter fetus ssp. *jejuni*. Br. Med. J. 1980. 280: 1164.
- 45.- Oosterom, J., Bänffer, J. R. J., Lawers, S. y Busschbach, A. E.
Serotyping of and hippurate hydrolysis by *Campylobacter jejuni*

- isolates from human patients, poultry and pigs in the Netherlands.
Antonie van Leeuwenhoek. 1985. 51: 65-70.
- 46.- Paisley, W. J., Mirret, S., Lauer, B. A., Roe, M. y Reller, L. B.
Dark-Field Microscopy of Human Feces for Presumptive Diagnosis of
Campylobacter fetus subsp. *jejuni* Enteritis. J. Clin. Microbiol.
1982. 15 (1): 61-63.
- 47.- Park, Ch. H., Hixon, D. L., Polhumus, A. S. y col. A. Rapid Diagno-
sis of *Campylobacter* Enteritis by Direct Smear Examination. Am. J.
Clin. Pathol. 1983. 80: 338-390.
- 48.- Farra, M.N.R., Morales, de la V. A., Resano, P. F. y Landa, L. Ais-
lamiento de *Campylobacter fetus* ss *jejuni* en pacientes adultos
con síndrome diarreico. Arch. Invest. Méd. (Méx.). 1984. 15: 245-
253.
- 49.- Patton, Ch. M., Mitchell, Sh. W., Potter, M. E. y Kaufmann A. F.
Comparison of Selective Media for Primary Isolation of *Campylobacter*
fetus subsp. *jejuni*. J. Clin. Microbiol. 1981. 13 (2): 326-330.
- 50.- Pead, P. J. Electron Microscopy of *Campylobacter jejuni*. J. Med.
Microbiol. 1979. 12: 383-385.
- 51.- Peipersack, F., D'Haene, M. Toussaint, Ch. y Schoutens, E. *Campylo-*
bacter jejuni Peritonitis Complicating Continuous Ambulatory Peri-

- toneal Dialysis. J. Clin. Microbiol. 1982. 16 (4): 739-741.
- 52.- Pérez, A., Bada, P., Calderón, E., Conde, C. Infecciones por *Campylobacter*. Infectología. 1981. 1(1): 31-42.
- 53.- Pérez, B. C. Cultivo de *Campylobacter*. Rev. Méx. Patol. Clin. 1985. 32 (4): 147-148.
- 54.- Pérez-Pérez, G. I., Hopkins, J. A. y Blaser, M. J. Lipopolysaccharide Structures in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Vibrio cholerae* Are Immunologically Related to *Campylobacter* spp. Infect. Immun. 1986. 51 (1): 204-208.
- 55.- Rajan, D. P. y Mathan, V. I. Prevalence of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in Healthy Populations in Southern India. J. Clin. Microbiol. 1982. 15 (5): 749-751.
- 56.- Richardson, N. J., Koornhof, H. J. y Bokkenheuser, V. D. Long-Term Infections with *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. J. Clin. Microbiol. 1981. 13 (5): 846-849.
- 57.- Riley, L. W. y Finch, M. J. Results of the First Year of National Surveillance of *Campylobacter* infections in the United States. J. Infect. Dis. 1985. 151 (5): 956-959.
- 58.- Ruiz-Palacios, G. M., Torres, J., Torres, N. I. Escamilla, E., Ruiz-Palacios, B. R. y Tamayo, J. Cholera-like enterotoxin produ-

- ced by *Campylobacter jejuni*. Lancet. 1983. ii: 250-252.
- 59.- Ruiz-Palacios, G. M., López-Vidal, Y., Torres, J. y Torres, N.
Strum Antibodies to Heat-Labile Enterotoxin of *Campylobacter jejuni*.
J. Infect. Dis. 1985. 152 (2): 413-416.
- 60.- Skirrow, M. B. *Campylobacter* enteritis: a "new" disease. Br. Med.
J. 1977. 2: 9-11.
- 61.- Smibert, R. M. The Genus *Campylobacter*. Ann. Rev. Microbiol. 1978.
32: 673-709.
- 62.- Smibert, R. M. "*Campylobacter*", In Buchanan, R. E., Gibbons, N. E.,
Editors: Bergey's manual of determinative bacteriology, ed. 9, Ba
timore 1985, The Williams y Wilkins Company, pp. 111-118.
- 63.- Smith, G. S. y Blaser, M. J. Fatalities Associated With *Campylo-*
bacter jejuni Infections. JAMA. 1985. 253 (19): 2873-2875.
- 64.- Stewart-Tull, D.E.S., NG, F.K.P. y Wardlaw, A. C. Factors Affecting
the Lethality of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in Mice. J. Med.
Microbiol. 1984. 18: 27-37.
- 65.- Svedhem, A., Gunnarsson, H. y Kaijser, B. Diffusion-in-Gel Enzyme-
Linked Immunosobent Assay for Routine Detection of IgG and IgM An
tibodies to *Campylobacter jejuni*. J. Infect. Dis. 1983. 148 (1):
82-91.

- 66.- Terrier, A., Altweeg, M., Bader, P. y von Graevenitz, A. Hospital Epidemic of Neonatal *Campylobacter jejuni* infection. Lancet. 1985. i: 1182.
- 67.- Thorson, S. M., Lohr, J. A., Dudley, Sh. y Guerrant, R. L. Value of methylene blue examination, dark-field microscopy, and carbol-fuchsin Gram stain in the detection of *Campylobacter* enteritis. J. Pediatrics. 1985. 106 (6): 941-943.
68. Trabulsi, L. R., da Silva, N. P. Avances recientes de la Bacteriología de infecciones intestinales. Infectología. 1 (3): 231-245.
- 69.- Wang, W. L., Luechtefeld, N. W., Blaser, M. J., Reller, L. B. Comparison of CampyPak II with Standard 5% Oxygen and Candle Jars for Growth of *Campylobacter jejuni* from Human Feces. J. Clin. Microbiol. 1982. 16 (2): 291-294.
- 70.- Wang, W. L., Blaser, M. J. Detection of Pathogenic *Campylobacter* Species in Blood Culture Systems. J. Clin. Microbiol. 1986. 23 (4): 709-714.
- 71.- Welkos, S. L. Experimental Gastroenteritis In Newly-Hatched Chicks infected with *Campylobacter jejuni*. J. Med. Microbiol. 1984. 18: 233-248.