

32  
2o. J

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**



**ESCUELA NACIONAL DE  
ESTUDIOS PROFESIONALES  
"ZARAGOZA"**



**T E S I S**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**VARIACION EN LAS CONDICIONES DE ANAEROBIOSIS Y  
TEMPERATURA PARA EL AISLAMIENTO DE CAMPYLOBACTER  
ASI COMO SU PATRON DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS**

**QUE PRESENTA**

**GERARDO MEJIA ALBARRAN**

**PARA OBTENER EL TITULO DE**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**MEXICO 1992**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## I N D I C E.

	<i>pag.</i>
<i>Introducción</i> .....	1
<i>Marco Teórico</i> .....	3
<i>Clasificación</i> .....	5
<i>Antecedentes Históricos</i> .....	7
<i>Medios de Cultivo</i> .....	9
<i>Sensibilidad a los Antimicrobianos</i> .....	11
<i>Antimicrobianos</i> .....	13
<i>Epidemiología</i> .....	17
<i>Patogénesis</i> .....	18
<i>Diagnóstico Microbiológico</i> .....	22
<i>Características Diferenciales</i> .....	23
<i>Planteamiento del Problema</i> .....	24
<i>Objetivos</i> .....	25
<i>Hipótesis</i> .....	26
<i>Material y Método</i> .....	27
<i>Valoración de Medios Líquidos</i> .....	37
<i>Patrón de Sensibilidad</i> .....	39
<i>Concentración Mínima Inhibitoria</i> .....	43
<i>Resultados</i> .....	45
<i>Discusión de Resultados</i> .....	59
<i>Conclusiones</i> .....	64
<i>Bibliografía</i> .....	67
<i>Apéndice</i> .....	75

## I N T R O D U C C I O N .

*La enfermedad diarreica aguda es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo; el total anual de muertes causadas por diarrea en niños menores de 5 años de edad, fue estimada en 4.6 millones en 1980 (1,3); el 80% de esas muertes fueron niños menores de 2 años de edad (1,3); principalmente en países subdesarrollados donde la situación socioeconómica y de higiene representan predisposición para enfermedades entéricas (18,40).*

*La tasa de diarrea en infantes menores de 1 año de edad en 1982 fue de 875.2 por 100,000 nacimientos vivos en México (\*,35). Un muestreo nacional en familias dado a conocer en mayo de 1986 (\*) mostró que el 26.2% de los niños menores de 5 años de edad en el estado de Chiapas habían tenido diarrea durante las dos últimas semanas previas al muestreo; esto - representa la segunda prevalencia más alta entre las 32 provincias de México (\*).*

*La diarrea es una evacuación intestinal frecuente, -- líquida y abundante (1,3). La etiología de tipo bacteriano en las diarreas anteriormente se determinaba en un 20% de los casos, ya que se utilizaban cultivos básicos de rutina en los que solo se aislaban agentes etiológicos como Salmonella, --*

*3.- (Schoolnik G K Division of Geographic Medicine, Stanford University, Stanford, CA. Comunicación personal, Datos no -- publicados).*

*Shigella* o *E.coli*; hoy en día las investigaciones realizadas han mejorado el diagnóstico en un 60-70% aproximadamente -- (1,3,23) y así, microorganismos que requieren de metodologías especiales para aislamiento y/o identificación, pueden ser ahora detectados como por ejemplo *Campylobacter sp.*, *E.coli* (ETEC), *Yersinia enterocolitica*, etc. (39,41).

En infecciones diarreicas el grupo de edad más afectado está comprendido entre los 0-4 años de edad. La causa de que las enteritis y enfermedades diarreicas tengan una tasa de mortalidad tan alta son en general, complicaciones derivadas de la sintomatología observable como deshidratación severa y septicemia (39,41).

En el presente estudio para el aislamiento de cepas de *Campylobacter*, se coleccionaron 100 muestras diarreicas de niños de 1 día de nacido a 2 años de edad con un máximo de 3 días de evolución sin padecimientos crónicos; por medio de hisopo rectal, en un tubo con medio de transporte de Stuart.

Las muestras se inocularon en agar *Brucella* a 22-25°C. en frasco con 3 velas durante 48 horas; agar *Soya-Trypticase* a 37°C en frasco con efervescencia de 2 *Alka-Seltzer* durante 48 horas y en agar *Columbia* a 42°C en frasco con 3 velas y efervescencia de 2 *Alka-Seltzer* durante 48 horas.

A 30 cepas de *Campylobacter* tipificadas (Dra. Carmen --- Soler y QFB, Ana Lilia Villanueva) se determinó su patrón de sensibilidad a 15 antibióticos por el método de Concentración Mínima Inhibitoria por dilución en placa.

## M A R C O T E O R I C O .

### 1.- Características del género *Campylobacter*:

Los *Campylobacter* son bacilos Gram negativos, curvos, -  
espirales en forma de "S" o en cadena con forma de alas de  
golondrina, presentan uno o más flagelos, miden de 1.5 a -  
3.5  $\mu$  de longitud y 0.2 a 0.4  $\mu$  de grosor (37-47). En cultivos  
se presentan en dos formas: bacilar (forma viable) y cocoide  
(la cual se interpreta como forma degenerativa, principalmente  
en cultivos viejos) (37-47). Los medios de cultivo más --  
comunemente empleados para su aislamiento son el de Skirrow,  
Butzler ; y Campy-Bap, dando colonias no hemolíticas, grises  
o incolonas, pueden ser planas y húmedas con bordes --  
irregulares o redondas y convexas con bordes enteros; sobre  
áreas grandes de la placa ocasionalmente son extendidas o bien  
de tamaño puntiforme (colonias menores o iguales a un --  
milimetro de diámetro), un pequeño porcentaje de las cepas  
aparecen con una coloración cobriza o rosada (37). Son -  
microaerófilicos con un metabolismo respiratorio, sin embargo  
no fermentan ni oxidan los carbohidratos (36). Las especies  
microaerófilicas de *Campylobacter* son inhibidas por el oxígeno  
atmosférico, el nivel óptimo de oxígeno necesario para su  
crecimiento se ha establecido como el 6% (37). Este nivel --  
junto con la necesidad de CO<sub>2</sub> se ha convertido en un --  
procedimiento que complica el aislamiento de estos organismos,

de fuentes humanas y animales (37). Se tiene más eficientemente al sustituir la safranina por carbol-fucsina al 0.06% -- (colorante de Kinyou) en la tinción de Gram (37, 41, 51).

El rango de temperatura para el crecimiento de especies de *Campylobacter* es de 25°C a 42°C (36, 37).

Taxonómicamente se clasifica como un género independiente (CUADRO 1).

CUADRO 1. CLASIFICACION TAXONOMICA DEL GENERO  
CAMPYLOBACTER (37,38).

I. - *Campylobacter* verdadera.

IA. Especies enteropatogénicas termofílicas.

- *Campylobacter jejuni* subespecie *jejuni*.
- *Campylobacter jejuni* subespecie *doylei*.
- *Campylobacter coli*.
- *Campylobacter lanidis* variante ureasa negativa.
- *Campylobacter lanidis* variante ureasa positiva.
- *Campylobacter upsaliensis*.

IB. Otras *Campylobacterias* verdaderas.

- *Campylobacter fetus* subespecie *fetus*.
- *Campylobacter fetus* subespecie *venerealis*.
- *Campylobacter hypointestinalis*.
- *Campylobacter sputorum* biovar *sputorum*.
- *Campylobacter sputorum* biovar *butylus*.
- *Campylobacter sputorum* biovar *fecalis*.
- *Campylobacter mucosalis*.
- *Campylobacter concisus*.



II.- *Especies psicofílicas.*

- *Campylobacter nitrofigilis.*
- *Campylobacter cryaerophyla.*

Género *Helicobacter* y *Campylobacter* relacionada.

- *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*).
- *Helicobacter mustelae* (*Campylobacter mustelae*).
- *Campylobacter cinaedi.*
- *Campylobacter fenelliae.*

## 2.- ANTECEDENTES HISTORICOS.

Curtis reportó en 1913 el primer caso probable de infección causada por *Campylobacter*, al observar en las descargas vaginales de dos pacientes un gran número de bacilos curvos Gram negativos (54, 56).

En 1919 Smith y Taylor designaron a este organismo como *Vibrio fetus*, por su parecido morfológico a los vibrios y su capacidad de producir abortos (30).

La primera asociación de vibrios microaerofílicos con enfermedad diarreica en humanos fue reportada en 1946 por Levy (54), quien estudió un brote epidémico en 357 reclusos de una institución penal en Illinois; en el 20% de los pacientes, observó microscópicamente organismos parecidos a los vibrios en frotis de materia fecal, pero sin poderlos obtener en cultivos; sin embargo, logró recuperación de vibrios microaerofílicos de cultivos de sangre en 13 de 19 pacientes, relacionando de manera importante a estos microorganismos como la causa de la diarrea (54).

Sehad y Veron en 1963 (37) realizaron un estudio comparativo entre los vibrios microaerofílicos y los otros vibrios, en el cual encontraron una diferencia significativa en el contenido de las bases de guanina y citosina del ADN de ambos, concluyendo que los vibrios microaerofílicos deberían ser separados del género *Vibrio* creándose el género

*Campylobacter*, dentro de la familia *Espinillaceae*, en el cual se incluyen especies reconocidas como patógenas en animales y humanos (37). Las comunmente consideradas como patógenos entéricos en humanos son: *C. fetus*, *C. coli*, *C. lanidis* y *C. jejuni* (38).

*C. fetus* subespecie *fetus* causa enfermedades sistémicas mientras que *C. jejuni* y *C. coli* causan enfermedades --dianreicas, *C. jejuni* es el más prevalente, se ha convertido en un agente etiológico importante, primordialmente en niños menores de 5 años de edad en países en desarrollo (37, 47).

A. - MEDIOS DE CULTIVO.

Las especies de *Campylobacter* pueden crecer en medios selectivos como:

I).- Butzler - Agar tioglicolato con 10% de sangre de carnero y 25 UI./ml. de kucitrina, 5 mcg/ml. de novobiocina, 50 mcg/ml. de cicloeximida, 10 U/ml. de colistina y 15 mcg/ml. de cefazolina (59).

II).- Skirrow - Base agar sangre con 5-7% de sangre de caballo lisada y 10 mcg/ml. de vancomicina, 2.5 UI/ml. de sulfato de polimixina B y 5 mcg/ml. de trimetoprim (39, 59).

III).- Butzler's Virion - Base agar columbia con 10% de sangre de carnero desfibrinada, 15 mg. de cefoperazona, 10 mg. de rifampicina, 10,000 UI de colistina, 2 mg. de anfotericina B (59).

IV).- Karmali - Agar columbia, 7% de sangre de caballo lisada, 10 mcg. de vancomicina, 50 UI/ml. de polimixina B y 5 mcg. de trimetoprim (13).

V).- Taylor - Agar Müeller-Hinton con 10% de sangre de carnero, 8 mcg/ml. de tetraciclina, 64 mcg/ml. de cefalotina o bien, 8 mcg/ml. de kanamicina (27).

VI).- Base agar sangre y 7% de sangre de caballo lisada suplementado con 15 mcg/ml. de vancomicina, 2.5 UI/ml. de polimixina B y 5 mcg/ml. de trimetoprim (18).

VII).- Campy-BAP.- Base agar Brucella con 10% de sangre

*desfibrinada de carnero, suplementada con 10 mcg/l. de vancomicina, 5 mcg/l. de polimixina, 5 mcg/l. de trimetoprim, 2 mcg/l. de anfotericina B y 15 mcg/l. de cefalotina (37, 26).*

*Para incrementar la aerotolerancia de las especies de Campylobacter los medios selectivos se pueden suplementar con una mezcla de sulfato ferroso, bisulfito de sodio y piruvato de sodio (56).*

#### D.- SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS.

Los patrones de resistencia u antimicrobianos, perfiles de plásmidos de ADN, biotipificación, serotipificación y -  
lagotipificación pueden usarse para diferenciar las especies de *Campylobacter* (54, 56).

Uno de los métodos más utilizados para la sensibilidad a antimicrobianos es el de dilución en placa (37). El -- principio de este método es la inhibición del crecimiento sobre la superficie del agar por el antimicrobiano incorporado en el medio (37). Como el nombre lo indica, las placas son preparadas en una serie incrementada de concentraciones del agente, el fondo de cada placa puede ser marcado en segmentos con un crayon fijo para ser identificadas las áreas de - inoculación (37).

Las bacterias a ser probadas son desarrolladas en caldos durante 18 Hrs. y diluidos en caldo para obtener  $10^5$  a  $10^6$  bacterias por mililitro. Algunos autores recomiendan una - concentración de  $10^8$  por mililitro para una mayor seguridad (37).

Con un replicador mecánico se inocula 0.001 ml. de las bacterias sobre la superficie de la placa. Este método es un procedimiento cuantitativo que mide la concentración mínima inhibitoria específica de un agente contra muchas bacterias, así como una homogeneidad del cultivo (37).

Para este método se han reportado algunos medios --

liquidos como: Caldo glucosa-peptona-levadura, caldo ---  
Tioglicolato, caldo Wilkins-Chalgren, caldo Mueller-Hinton,  
caldo Soya-Tripticasa, etc. ajustando a una turbidez de el -  
numero 1 al 2 en la escala del nefelometro de Mac Farlan (17).

Los estudios han mostrado que especies de *Campylobacter*  
son sensibles a Clindamicina, Furazolidona, Aminoglucósidos,  
Tetraciclina, Cloranfenicol y Acido Nalidixico (49). En la  
actualidad la Eritromicina es considerada la droga de --  
elección, sin embargo se han reportado cepas resistentes (49).

A N T I M I C R O B I A N O S .

(64)

ANTIMICROBIANO.	MECANISMO DE ACCION	INDICACIONES PRINCIPALES.	TOXICIDAD.
AC. NALIDIXICO.	Inhibición de la -- replicación del DNA.	Infecciones de vias -- urinarias por <u>E. coli</u> , -- Proteus, Klebsiella y -- Enterobacter. Es -- conveniente confirmar la -- susceptibilidad -- bacteriana in vitro.	
AMIKACINA.	Bactericida, -- inhibición de la -- síntesis de -- proteínas por union -- ala subunidad ---- ribosomal 30 S.	Infecciones por -- <u>Staphylococcus aureus</u> , -- por bacterias Gram -- negativas, incluyendo -- Pseudomonas resistentes a -- otros aminoglucósidos. Es -- conveniente confirmar la -- susceptibilidad -- bacteriana in vitro.	Otica. Daño -- renal.
AMPICILINA.	Interferencia con -- la biosíntesis de - la peptidoglicana - de la pared celular.	Infecciones por -- bacterias Gram positivas -- y negativas como <u>E. coli</u> , -- <u>Salmonella sp</u> y -- <u>Haemophilus influenzae</u> .	Granulocitopenia -- Sensibilización -- anafiléctica. -- Reacción cruzada -- con el resto de -- las penicilinas.
CEFALOTINA (1ª- generación).	Interferencia con - la biosíntesis de - la peptidoglicana - de la pared celular.	Las de primera generación -- tienen buena actividad -- sobre Gram positivos, -- excepto enterococos.	Relativamente - baja, ---- sensibilización -- anafiléctica, - puede -- presentarse -- reacción cruzada -- con acps. anti -- penicilina.



ANTIMICROBIANO.	MECANISMO DE ACCION	INDICACIONES PRINCIPALES.	TOXICIDAD.
AZTREONAM.	Interferencia con - la biosíntesis de - la peptidoglicana - de la pared celular.	Poca o ninguna actividad contra Gram positivos - como Estreptococos y - Estafilococos y anaerobios en general. Buena - actividad contra Gram - negativos, incluyendo - Pseudomonas. En infecciones de vías urinarias, - broncopulmonares, gineco- obstétricas, septicemias, gonorrea, etc.	Generalmente bien tolerado aproximadamente 1% incluyen diarrea, náuseas, vómito y erupción cutánea.
CEFOTAXIMA. (3ª generación).	Igual que cefalotina.	Las de 2ª y 3ª generación son poco activas sobre - Gram positivos. Útiles en infecciones por <u>E. coli</u> , Proteus, Klebsiellas, - Haemophilus y algunas - Pseudomonas.	Igual que Cefalotina.
ERITROMICINA.	Bacteriostático - inhibición de la - biosíntesis de - proteínas por unión a la subunidad - ribosomal 50 S.	Infecciones cutáneas por Estafilococos, Pertusis, - Legionelosis. Infecciones por Estreptococos Beta - hemolíticos, neumococos - gonococos y treponemas.	Relativamente baja, irritación intestinal, hepatitis colestática.
GENTAMICINA.	Igual a Amikacina.	Igual que Amikacina. - Asociada a penicilinas o - vancomicina en - endocarditis enterocócica. Asociada a Cefalosporinas en neumonía por - Klebsiella y a - Clindamicina en sepsis - abdominal.	Igual a Amikacina.

ANTIMICROBIANO.	MECANISMO DE ACCION	INDICACIONES PRINCIPALES.	TOXICIDAD.
KANAMICINA.	Igual a Amikacina.	Infecciones extra intestinales por enterobacterias. Es conveniente confirmar susceptibilidad in vitro.	-- Igual a -- Amikacina. -- --
FURAZOLIDONA.	Inhibición de algunas rutas metabólicas bacterianas.	-- Infecciones urinarias --- agudas. --	-- Gastrointestinal Sensibilización anafiláctica.
TETRACICLINA .	Bacteriostático. Inhibición de la biosíntesis de proteínas, por unión a la subunidad ribosomal 30 S.	-- Infecciones de las vías -- urinarias. Infecciones -- pulmonares crónicas, -- Brucelosis, Tularemia, -- Cólera, Peste, Fiebre -- recurrente, Granuloma -- inguinal, Gonorrea y Sifilis.	-- Transtornos -- intestinales, -- erupciones -- cutáneas, fiebre, -- daño hepático y -- renal, -- decoloración dental.
TOBRAMICINA.	Igual a Amikacina.	Similares a Amikacina, infecciones por Pseudomonas resistentes a otros aminoglucósidos.	-- Igual a -- Amikacina. -- --
TRIMETOPRIM.	Inhibición competitiva de la enzima dihidrofolato reductasa.	-- Infecciones urinarias -- crónicas, prostatitis -- bacteriana crónica, -- gonorrea, linfogranuloma -- venéreo y chancro blando, -- Salmonelosis, shigelosis, -- infecciones por <u>E. coli</u> -- enteropatógena, otitis -- media, bronquitis.	-- Sensibilización -- anafiláctica, -- discracias -- hemetológicas. -- Erupciones cutáneas.

ANTIMICROBIANO. MECANISMO DE ACCION INDICACIONES PRINCIPALES. TOXICIDAD.

SULFAMETOXAZOL.	Bacteriostático. --	Infecciones urinarias --	Sensibilización
	competencia con el	(por <u>E. coli</u> o Proteus),	anafiláctica,
	ácido para --	chancro blando, fiebre --	daño renal,
	aminobenzoico por -	reumática, linfogranuloma	hepático, en
	la actividad de la	venéreo.	médula ósea, en
	enzima --		células
	dihidropterato --		sanguíneas,
	sintetasa.		sistema nervioso
			y gastro
			intestinal.

### 3. - E P I D E M I O L O G I A.

*La enteritis por Campylobacter es una zoonosis ampliamente difundida, de ahí que el contacto con animales o sus productos plantee la sospecha de contagio; también se ha informado del contagio de persona a persona, la cual se ha aislado de materia fecal hasta después de 7 semanas de haber padecido la enfermedad (47, 48, 57).*

*Se han realizado estudios para determinar la dosis infectiva de Campylobacter, habiéndose reportado un rango de 500 a  $10^6$  bacterias (56). El período de incubación reportado es de 1 a 11 días (56). Estos resultados muestran que existe una variación considerable ya sea en la susceptibilidad individual a la bacteria, o bien a su virulencia relativa (56).*

*Los síntomas y signos más comunes en la enteritis por Campylobacter son diarrea, dolor abdominal, presencia de sangre en las heces, fiebre y vómitos (39, 64).*

*Los periodos diarreicos generalmente duran de 3 a 5 días pero en las recaídas suelen prolongarse durante 3, 5 y hasta 9 meses (47, 48).*

#### 4.- P A T O G E N E S I S.

La enteritis causada por cepas del género *Campylobacter* ha sido reproducida en mono rhesus, en pollos y en algunos humanos voluntarios quienes manifestaron los síntomas típicos de la enteritis causada por dicho organismo pocos días - después de haberlo ingerido de cultivos puros (54, 57).

Los experimentos realizados han sugerido que -- *Campylobacter jejuni* es capaz de producir un tipo de - infección predominantemente invasiva (16, 48).

En observaciones patológicas y microbiológicas a niños, incluyendo muestras tomadas de necropsias y sigmoidoscopias, sugieren que este microorganismo invade la mucosa tanto del intestino delgado (particularmente al ileon y yeyuno), como del intestino grueso; sin embargo en la actualidad no ha sido totalmente esclarecido (16, 19, 20).

El gel de la mucosa intestinal es la barrera principal para la penetración de patógenos entéricos. La adhesión de la bacteria a la superficie mucosa es necesaria para la - colonización y subsecuente patogénesis. Este proceso es mediado por factores quimiotácticos y adhesinas específicas, los cuales pueden incluir flagelos, glucocalix --- lipopolisacáridos y proteínas de membrana (12, 20).

Cinco y col. (4, 6) al estudiar la adhesión de --- *Campylobacter* a las células epiteliales encontraron que esta

era parcialmente inhibida por L-fructosa y D-manosa, lo cual sugería la existencia de más de un receptor. Susan Logan - encontró una proteína de superficie con un peso molecular - de 45,000 KD. Transmembranal, asociada a peptidoglucano y que parece ser una porina. Esta última proteína aunque parece no estar involucrada en la patogénesis del *Campylobacter* podría ser importante para su metabolismo y crecimiento; mientras que la primera podría estar relacionada con el fenómeno de - adhesión a las células epiteliales, considerándose un probable candidato para el desarrollo de una vacuna (4, 6).

Estudios de inmunofluorescencia indican que las proteínas de superficie pueden tener epitopes seroespecíficos -- independientes del flagelo. Susan Logan encontró una proteína de superficie de 95,000 KD. no flagelar que parece contribuir a la identidad seroespecífica de *Campylobacter* (5,19).

Los análisis electroforéticos y químicos indican que los lipopolisacáridos de *C. jejuni* son primordialmente de bajo peso molecular y antigénicamente diversos, produciendo un gran número de serotipos. El papel de estos --- lipopolisacáridos en la patogénesis de *Campylobacter* no es clara (37).

El flagelo es un antígeno de superficie importante de *C. jejuni* que está involucrado en la colonización de la - mucosa, por su naturaleza protéica induce al huésped a -- producir anticuerpos en su contra. Caldwell y col. han ---

estudiado la expresión del flagelo en C. jejuni, en cepas fla(+) convertidas a fla(-) y de fla(-) a fla(+). Bath y col. proponen la presencia de flagelos de diferentes especificidades antigénicas en C. jejuni, si lo llegan a demostrar el panorama antigénico sera aún más complejo (29, 30, 31).

La caracterización de cromosoma de C. jejuni ha demostrado un contenido de 30.1% de G y 33% de C; con respecto al tamaño éste parece ser de un 80 a 85% del cromosoma de E. coli. Las técnicas de transformación de DNA no han sido desarrolladas para Campylobacter y aún no existe un método de transducción generalizado. Tanto Taylor y col. como Tenover y col. han descrito plásmidos de aproximadamente 57 kilobases que codifican la resistencia a tetraciclina (33). De uno de éstos plásmidos fue aislado el gen que codifica la resistencia a tetraciclina, y se encontró que no es homólogo al previamente descrito para la resistencia a tetraciclina de E. coli, sugiriendo un origen diferente para la evolución de éstos genes. T Lambert y col. han clonado y secuenciado el determinante de la resistencia a Kanamicina de C. coli y han comparado su secuencia nucleotídica con las previamente reportadas, resultando similar a las secuencias presentes en estreptococo y estafilococo. Estos datos sugieren que C. coli puede adquirir la resistencia a la Kanamicina de una bacteria Gram positiva (33).

Lambert y col. aislaron el plásmido de 47.2 kilobases -

que codifica tanto la resistencia de Kanamicina y Tetraciclina (9).

El mecanismo de la resistencia a Kanamicina ha sido caracterizado como una enzima 3'-amino-glucosido -- fosfotransferasa de tipo III, antes nunca identificada en bacterias Gram negativas (46).



## 5. - DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO.

Un diagnóstico rápido y presuntivo de la enteritis por *Campylobacter* puede hacerse durante la fase aguda de la enfermedad mediante microscopía de campo claro, obscuro o de contraste de fases, de las heces, con el objeto de reconocer formas características de la bacteria (50, 51).

El diagnóstico se confirma por el aislamiento del bacilo mediante su cultivo en medios selectivos. Existen varias formas de conseguir la atmósfera adecuada, evacuando las dos terceras partes de una jarra de anaerobiosis y reemplazando con  $\text{CO}_2$ , o bien por medio de tanques con mezclas de gases tales como: 10% de  $\text{CO}_2$ , 5% de  $\text{O}_2$  y 85% de  $\text{N}_2$ ; o bien 10% de  $\text{CO}_2$ , 5% de  $\text{O}_2$  y 85% de  $\text{H}_2$ . También puede usarse un sobre generador de  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$ , con catalizador integrado (Campy-PAK II). La jarra con vela da una atmósfera de aproximadamente 17-19% de  $\text{O}_2$  y 2-3% de  $\text{CO}_2$  (36, 56).

La temperatura óptima de crecimiento es de  $42^\circ\text{C}$  y 48 hrs. de incubación (36, 37).

CUADRO 2.

CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE ESPECIES DE CAMPYLOBACTER.

M.O./CARACT.	CRECIMIENTO			CATALASA	SUSCEPTIBILIDAD	
	25°C	37°C	42°C		AC.NALI.	CEFALOT.
<u>C.jejuni</u>	-	+	+	+	S	R
<u>C.coli</u>	-	+	+	+	S	R
<u>C.laridis</u>	-	+	+	+	R	R
<u>C.fetus subsp.</u>						
<u>fetus</u>	+	+	-	+	R	S

## 6.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

*Las especies que comprenden el género Campylobacter son microaerofílicas los cuales para su aislamiento requieren de medios enriquecidos así como de condiciones atmosféricas y de temperatura; por tal motivo en México no todos los laboratorios de diagnóstico tienen los recursos materiales y personal capacitado para su adecuado aislamiento y posterior conocimiento de su patrón de sensibilidad para un mejor tratamiento terapéutico.*

7.- O B J E T I V O S .

1.- Optimizar las condiciones de aislamiento para --  
obtener cepas de *Campylobacter* variando temperatura de 25,  
37 y 42°C; así como la composición de los medios de cultivo  
y las condiciones de aeración.

2.- Determinar si la visión de antibióticos utilizada  
en la preparación de medios de cultivo de primo aislamiento  
modifica la recuperación de las cepas de *Campylobacter*.

3.- Evaluar el patrón de sensibilidad de las cepas de  
*Campylobacter*.

3.1.- Encontrar el medio líquido óptimo para llevar a  
cabo la incubación de 48 hrs. para el método de concentración  
mínima inhibitoria por dilución en placa.

3.2.- Caracterización de la concentración mínima --  
inhibitoria a 15 antibióticos para 30 cepas de *Campylobacter*.

3.3.- Seleccionar el antibiótico más adecuado para uso  
terapéutico.

### 8.- H I P O T E S I S.

Las cepas que integran el género *Campylobacter* requieren de condiciones atmosféricas del 10% de  $O_2$  y del 3-10% de  $CO_2$ , a una temperatura de 25-42°C. Por lo cual, al modificar los métodos para su aislamiento por otros más convencionales y menos estrictos se logran las condiciones microaerofílicas y de temperatura, para aislar cepas de *Campylobacter* en el laboratorio de rutina.

## M A T E R I A L   Y   M E T O D O .

### 1.- MATERIAL BIOLÓGICO.

- 30 cepas de Campylobacter sp.
- E. coli ATCC 25922
- Staphylococcus aureus ATCC 25923

### 2.- MATERIAL DE VIDRIO.

- Tubos de ensayo 13x100 (Pyrex).
- Tubos de ensayo 18x150 (Pyrex).
- Tubos de ensayo 12x75 (Pyrex).
- Tubos de vidrio 13x100 con tapón de rosca (Pyrex).
- Tubos de vidrio 18x150 con tapón de rosca (Pyrex).
- Matraces Erlenmeyer de 250 ml. (Pyrex)
- Matraces Erlenmeyer de 500 ml. (Pyrex).
- Frascos vitroleros grandes de boca ancha con tapa de rosca (Mc.Cormick).
- Pipetas graduadas de 10 ml., 5ml, 1ml, 0.1ml. (Pyrex).
- Cajas petri (Pyrex).
- Portaobjetos (Conning).

### 3.- MATERIAL DIVERSO.

- Tapones de hule horadados para tubo 13x100 (00).
- Asas bacteriológicas de 4mm de diametro.
- Velas de 2 cm de diametro (San Isidro).
- Gradillas.
- Replicador de Steel.
- Janna Torbal sin catalizador Mod. AJ-3

### 4.- REACTIVOS.

#### 4.1.- Reactivo.

- Alka-Seltzer (Miles de México).
- L-Triptofano (BBL).
- L-Cistina (BBL).
- Hemina (Oxoid).
- Agua destilada (Electropura).
- Metanol (Baker).
- Cloruro de Bario (Baker).

#### 4.2.- Soluciones.

- NaOH 0.1M (Baker).
- NaOH al 4% (Baker).
- NaHCO<sub>3</sub> al 3% (Baker).

- Buffer de fosfatos pH 7.2 (BBL).
- N-N-Dimetilformamida [C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO] (Pfizer).

#### 4.3. - MEDIOS DE CULTIVO.

- Caldo y agar Soya-Tripticasa (Difco).
- Agar Müeller-Hinton (Oxoid).
- Caldo y agar Brucella (Difco).
- Agar Columbia (Difco).
- Sangre de carnero desfibrinada (Hemovil).
- Medio de transporte de Stuart (Difco).
- Caldo Eugon (Difco).
- Caldo Wilkins-Chalgren (Oxoid).
- Caldo Tioglicolato (BBL).

#### 4.4. - COLORANTES.

- Azul de metileno de Loeffler al 5% (Zigma) [preparado].
- Carbol fucsina al 0.06%, colorante de Kinyou (Zigma) [preparado].



#### 4.5.- ANTIBIOTICOS.

- *Acido Nalidixico (Pfizer).*
- *Amikacina (Pfizer).*
- *Ampicilina (Pfizer).*
- *Aztreonam (Pfizer).*
- *Cefoperazona (Pfizer).*
- *Cefotaxima (Pfizer).*
- *Ceftazidima (Pfizer).*
- *Enitnomicina (Lily).*
- *Furazolidona (Difco).*
- *Gentamicina (Difco).*
- *Kanamicina (Pfizer).*
- *Polimixina (Difco).*
- *Sulfametoxazol (Difco).*
- *Tobramicina (Pfizer).*
- *Trimetoprim (Difco).*
- *Trimetoprim-Sulfametoxazol (Difco).*

5.- EQUIPO.

- Espectrofotómetro BECKMAN modelo 6.
- Estufa Bacteriológica RIOSSA modelo EC a 37°C.
- Estufa Bacteriológica MAPSA modelo EC-334 a 42°C.
- Balanza Analítica METTLER H-80
- Balanza Granataria PERKIN HELMER.
- Baño María RIOSSA.
- Microscopio óptico binocular CARL ZEISS K-7.
- Potenciómetro.

## M E T O D O L O G I A .

Para el presente trabajo la recolección de muestras se realizó en la sala de urgencias del hospital pediátrico - "Moctezuma", en México, D.F.

Se coleccionaron 100 muestras diarreicas de niños de 1 día de nacidos a 2 años de edad, sin tratamiento --- antimicrobiano previo , con un máximo de tres días de --- evolución, sin padecimientos crónicos. La toma de muestras se realizó por medio de hisopo rectal en medio de transporte de Stuart, para obtener el aislamiento de cepas de ---- *Campylobacter*.

El procesamiento de los cultivos bacteriológicos se realizó en el Laboratorio Clínico Central de la E.N.E.P. "Zaragoza". De acuerdo al siguiente esquema:

## OBTENCION Y PROCESAMIENTO DE CULTIVOS BACTERIOLOGICOS

I) Obtener una muestra de heces por hisopo rectal, introduciendo el hisopo en el recto aproximadamente 1-2 cm. y frotar las paredes del mismo girando el hisopo, retirar el hisopo e introducirlo en el medio de transporte de Stuart.

II) Tener frotis de heces con azul de metileno de Loeffler, durante tres minutos, para la detección de formas espirales características de *Campylobacter*, y se inoculan los --- siguientes medios básicos.

a). Agar Brucella al 5% de sangre de carnero, incubándose a temperatura ambiental (22-25°C) y en frasco con tres velas por 48 horas (37).

b). Agar Soya-Trypticase (con la formulación del caldo soya-trypticase), con 5% de sangre de carnero. Atmósfera de Alka-Seltzer, a una temperatura de 37°C con Cefoperazona - (0.1mg/10 ml) por 48 horas (37).

c). agar Columbia, con 10% de sangre de carnero y -- (0.1mg/10ml) de Cefoperazona, Trimetoprim (10mg/5ml), -- Polimixina (2.5mg/10ml.); incubándose a 42°C con atmósfera de velas y Alka-Seltzer por 48 horas.

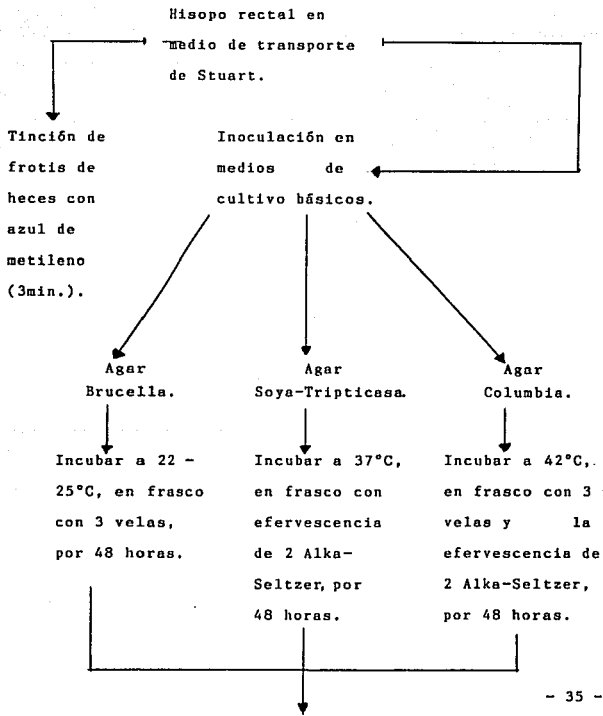
d). Se pican colonias sospechosas para prueba de -- catalasa y tinción de frotis con colorante de Kinyou.

e). Se observan formas típicas de *Campylobacter* en frotis.

f). Para la purificación de las cepas, resembran en Agar Müller-Hinton con 5% de sangre de carnero.

III) Una vez aisladas, las cepas de *Campylobacter* se guardan en viales de plástico con tapón de rosca de aproximadamente 3 ml. de capacidad con caldo Brucella a  $-72^{\circ}\text{C}$  (mínimo a  $-10^{\circ}\text{C}$  en recipiente con hielo seco) hasta su utilización.

DIAGRAMA DE FLUJO QUE PRESENTA EL METODO ANTERIOR.



↓  
Picar colonias probables de  
Campylobacter, para prueba de  
catalasa y teñir frotis con  
colorante de Kinyou.

(Observar formas típicas de  
Campylobacter).

↓  
Purificar las cepas resemebrando  
en agar Müeller-Hinton.

↓  
Almacenar el cultivo puro en  
viales con caldo Brucella a  
-72°C.

Nota: Todos los medios de agar empleados son complementados  
con sangre de carnero; preparación de medios ver la  
apéndice.

VALORACION DE MEDIOS LIQUIDOS PARA EL METODO DE  
CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA  
POR DILUCION EN PLACA.

Para determinar el patron de sensibilidad a ciertos -  
antibioticos se pidieron 30 cepas de *Campylobacter* bio y -  
serotipificadas po el método de Lion, por la Dra. carmen  
Soler y la Q.F.B. Ana Lilia Villanueva en el Hospital -  
Infantil de México (54).

Valoración de 4 medios de cultivo liquidos para la -  
incubación de 18 horas requerida en el método clásico de -  
concentración mínima inhibitoria por dilución en placa.

Se eligieron 4 cepas de las 30 solicitadas al Hospital  
Infantil de México para determinar el medio óptimo, éstas -  
cepas se inocularon en placas de agar Müeller-Hinton, -  
enriquecido con 5% de sangre de carnero, incubándose a 37°C  
durante 24 horas en atmósfera de CO<sub>2</sub> (aprox. 10%), usando -  
Jarra Tonbal sin catalizador. (condiciones atmosféricas a  
las cuales se aislaron).

Posteriormente se inocularon en los siguientes caldos:

- Soya-Tripticasa con hemina, L-Triptofano y L-Cistina.
- Wilkins-Chalgren (Oxoid).
- Tioglicolato (BBL).
- Eugon (Difco).



*Incuñándose en las mismas condiciones anteriormente -  
descritas pero con agitación. Registrándose las lecturas de  
absorbancia a 540 nm. cada dos horas, hasta completar -  
24 horas.*

*Sembrando con asa calibrada de aproximadamente 4mm de  
diámetro (0.01ml.) una placa de agar Müller-Hinton con 5%  
de sangre de carnero (sin antibiotico) después de cada ---  
lectura.*

PATRON DE SENSIBILIDAD A 15 ANTIBIOTICOS POR EL METODO DE  
CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA  
POR DILUCION EN PLACA.

Concentración mínima inhibitoria a: Ampicilina, Amikacina, Eritromicina, Tetraciclina, Gentamicina, Tobramicina, --  
Tunazolidona, Kanamicina, Trimetoprim, Sulfametoxazol, y -  
Trimetoprim-Sulfametoxazol (5:1).

a) Para la incubación de 18 horas las 30 cepas --  
disponibles se inoculan en placas de Mueller-Hinton con 5%  
de sangre de carnero, incubando por 24 horas a 37°C y una  
atmósfera de aproximadamente 10% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se  
tomó una asada para inocular 5ml. de caldo Soya-Tripticasa  
enriquecido, incubando a 37°C u una atmósfera aproximadamente  
de 10% de CO<sub>2</sub>, con agitación durante 18 horas.

Se trabajaron también con dos cepas control E. coli --  
ATCC 25922 y Staphylococcus aureus ATCC 25923.

La suspensión resultante fue diluida en el mismo medio,  
ajustando al estandar nefelométrico de Mac Farlan #1 para -  
obtener aproximadamente  $3 \times 10^8$  bacterias por mililitro.

b) Preparar las diluciones de cada antibiotico a:  
128mcg/ml, 64mcg/ml, 32mcg/ml, 16mcg/ml, 8mcg/ml, 4mcg/ml,

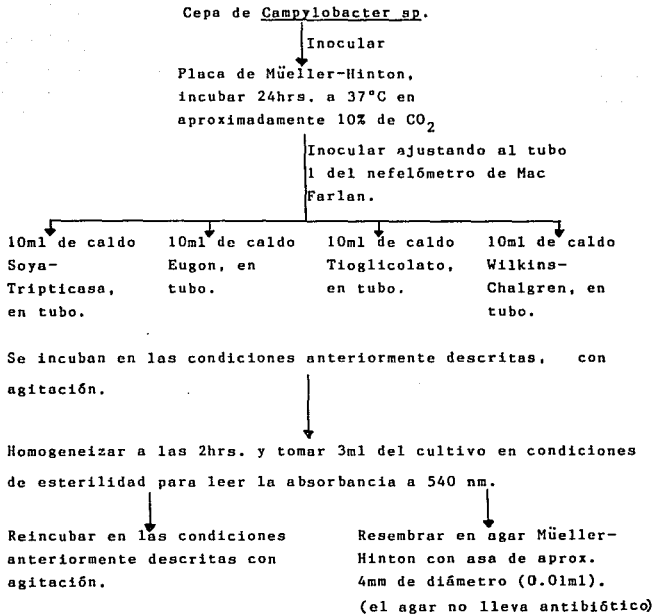
2mcg/ml, 1mcg/ml, 0.5mcg/ml, y 0.25mcg/ml, (ver apéndice).

En el caso de Trimetoprim, Sulfametoxazol y la mezcla de ambos, se utilizarón concentraciones de 256mcg/ml.

c) Para preparar las placas se mezcló con ligera --  
agitación un mililitro de dilución del antibiotico ---  
correspondiente con 9ml de agar Müeller-Hinton con 5% de -  
sangre de carnero (el cual debe estar a una temperatura de -  
45-47°C), cuando el agar solidifica se guardan las placas en  
refrigeración a 4°C hasta su uso.

Las placas de Müeller-Hinton con antibiotico se inocularon  
con 0.0025ml de la dilución de las cepas (#1 de Mac Farlan)  
utilizando el replicador de Steers. Las placas fueron --  
incubadas a 37°C en una atmósfera de aproximadamente 10% de  
CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA EVALUACION DE  
MEDIOS DE CULTIVO LIQUIDOS.





A partir de la homogeneización  
repetir el mismo procedimiento  
cada 2hrs. hasta completar  
24 horas.



Incubar en las condiciones  
anteriormente descritas.

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA.

↓ Inocular.

En placas de Mueller-Hinton sangre  
(sin antibiótico) cepas de --  
Campylobacter.

↓  
Incubar 24hrs. a 37°C en aprox.-  
10% de CO<sub>2</sub>.

↓  
De encontrarse puras las cepas, -  
resembrar en las mismas --  
condiciones antes mencionadas.

↓  
Tomar una asada en 5ml de caldo -  
Soya-Tripticasa, homogeneizando -  
la suspensión.

↓  
Incubar 3hrs. a 37°C en aprox. -  
10% de CO<sub>2</sub>, con agitación.

↓  
Ajustar el cultivo al tubo #1 del  
nefelómetro de Mac Farlan.

↓  
Inocular 0.5ml del cultivo en 4.5  
ml de caldo Soya-Tripticasa --  
(todas las cepas de Campylobacter  
se procesan a la vez y de la --  
misma forma).

↓  
Tomar 0.6ml de la dilución --  
resultante de cada cepa y --  
colocarla en el correspondiente -  
pozo del replicador.

↓ Inocular  
Las placas con antibiótico y el --  
control se dejan que sequen al --  
mechero.

↓  
Incubar 24hrs. a 37°C en aprox. -  
10% de CO<sub>2</sub>.

↓  
Leer con base en el control y -  
comparar en donde no hay --  
crecimiento es donde se toma la -  
inhibición.

## R E S U L T A D O S.

En el presente estudio se procesaron 100 muestras de niños de 1 día de nacidos a 2 años de edad, con diarrea de no más de 3 días de evolución (\*).

Los resultados de las muestras transportadas en medio de Stuart se muestran en el cuadro No. 3 (\*\*); en la gráfica No. 1 de pastel se presenta el porcentaje de muestras --- positivas al frotis directo con azul de metileno y muestras positivas tanto al frotis directo con azul de metileno como al cultivo positivo de Campylobacter sp; la gráfica No. 2 de pastel presenta el porcentaje de cultivos positivos con respecto al 15% de muestras positivas al frotis directo con azul de metileno.

El comportamiento de las cepas aisladas de Campylobacter sp. Correspondientes a medios de cultivo suplementados, --- efecto de aereación, temperatura y suplementación; se observan en la gráfica No. 3 de barras y los cuadros No. 4, 5 y 6 - respectivamente.

\* Las muestras fueron obtenidas del servicio de Urgencias del Hospital Pediátrico "Noctezuma".

\*\* Estas muestras se procesaron en la sección de Bacteriología de la Clínica Multidisciplinaria ENEP-ZARAGOZA.



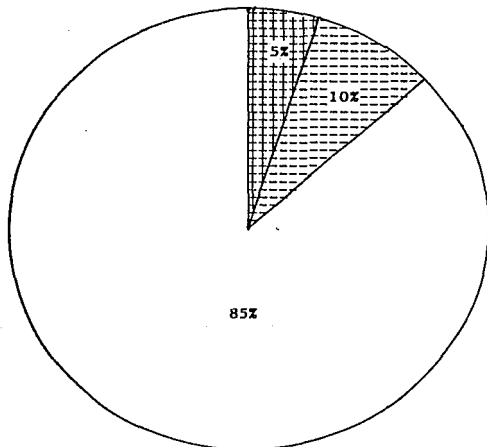
La evaluación de los medios líquidos para llevar a efecto la incubación de 18 horas requerida en el método de dilución en placa se muestra en las gráficas de crecimiento No. 4, 5, 6 y 7.

La susceptibilidad de las 30 cepas de Campylobacter sp. a los 15 antibióticos se presenta en la tabla No. 7 como porcentaje acumulativo.

CUADRO 3. FROTIS Y CULTIVO EN MUESTRAS DE HECEs DE 100 NIÑOS CON DIARREA, TRANSPORTADAS EN MEDIO DE STUART EN UN TIEMPO DE 2-4 HORAS SIN REFRIGERACION.

SEXO	FEMENINO	MASCULINO
FROTIS DIRECTO (+) CULTIVO (-)	5	5
FROTIS DIRECTO (+) CULTIVO (+)	3	2
FROTIS DIRECTO (-) CULTIVO (-)	30	55
FROTIS DIRECTO (-) CULTIVO (+)	0	0
TOTAL	38	62

GRAFICA No. 1. PORCENTAJE DE AISLAMIENTOS DE CAMPYLOBACTER EN  
100 MUESTRAS DE NIÑOS CON DIARREA.



FROTIS DIRECTO Y CULTIVOS POSITIVOS.



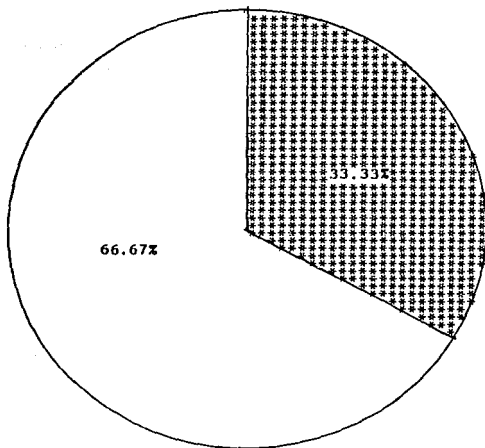
FROTIS DIRECTO POSITIVO.

FROTIS Y CULTIVO NEGATIVOS.

\* (FROTIS DIRECTO NEGATIVO  
Y CULTIVO POSITIVO NO  
SE REPORTA EN LA --  
GRAFICA POR SER EL 0%).

Nota \*

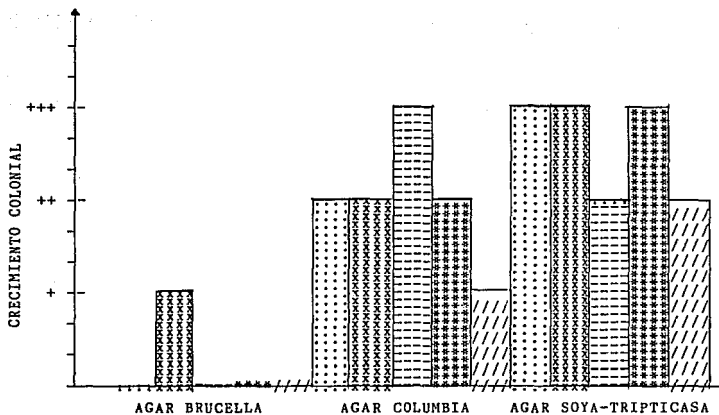
GRAFICA No. 2. PORCENTAJE DE CULTIVOS POSITIVOS CON RESPECTO  
DEL 15% DE MUESTRAS POSITIVAS AL FROTIS DIRECTO  
CON AZUL DE METILENO.



CULTIVOS POSITIVOS.

CULTIVOS NEGATIVOS.

GRAFICA No. 3. AISLAMIENTOS DE CAMPYLOBACTER SP EN MEDIOS DE CULTIVO SUPLEMENTADOS.



+ 1-4 COLONIAS.

++ 5-9 COLONIAS.

+++ MAS DE 9 COLONIAS.

::::: CEPA AISLADA I

XXXXX CEPA AISLADA II

----- CEPA AISLADA III

\*\*\*\*\* CEPA AISLADA IV

////// CEPA AISLADA V

CUADRO No. 4. CEPAS DE CAMPYLOBACTER SP. AISLADAS DE MUESTRAS DIARREICAS EN BASE AL SISTEMA DE AEREACION.

FRASCO CON	CEPA/CRECIMIENTO COLONIAL				
	I	II	III	IV	V
VELAS (3)	-	+	-	-	-
EFERVESCENCIA DE ALKA-SELTZER (2) *	+++	+++	++	+++	++
EFERVESCENCIA DE ALKA-SELTZER (2) * Y VELAS (3)	++	++	+++	++	+

+ 1-4 COLONIAS.

++ 5-9 COLONIAS.

+++ MAS DE 9 COLONIAS.

\* No se cuantificó la concentración de CO<sub>2</sub> generada. La literatura reporta un 3% de CO<sub>2</sub> utilizando vela (36 ).

CUADRO No. 5. CEPAS DE CAMPYLOBACTER SP. AISLADAS DE  
MUESTRAS DIARREICAS EN BASE A LA TEMPERATURA.

TEMPERATURA DE INCUBACION	CEPA/CRECIMIENTO COLONIAL				
	I	II	III	IV	V
25°C.	-	+	-	-	-
37°C.	+++	+++	++	+++	++
42°C.	++	++	+++	++	+

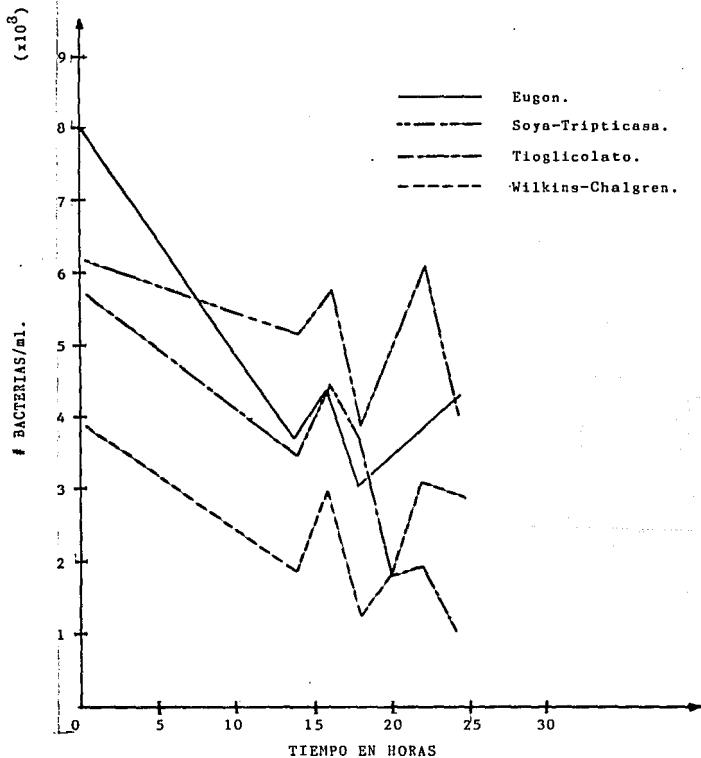
+ 1-4 COLONIAS.  
++ 5-9 COLONIAS.  
+++ MAS DE 9 COLONIAS.

CUADRO No. 6. CEPAS DE CAMPYLOBACTER SP AISLADAS DE MUESTRAS DIARREICAS EN BASE A LA SUPLEMENTACION DE MEDIOS DE CULTIVO.

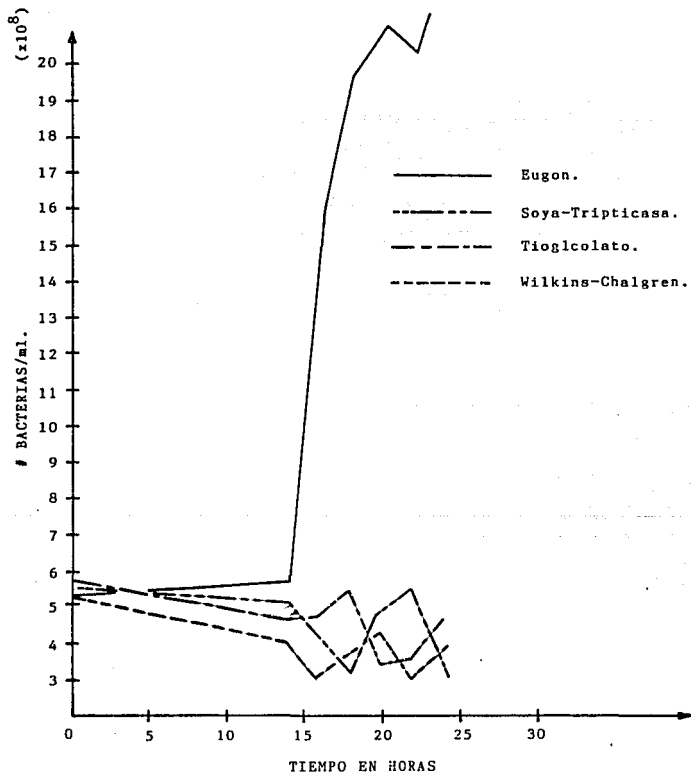
SUPLEMENTO	CEPA/CRECIMIENTO COLONIAL				
	I	II	III	IV	V
SANGRE DE CARNERO (5%)	-	+	-	-	-
SANGRE DE CARNERO (5%) CEFOPERAZONA HEMINA L-TRIPTOFANO L-CISTINA	+++	+++	++	+++	++
SANGRE DE CARNERO (10%) CEFOPERAZONA POLIMIXINA TRIMETOPRIM	++	+++	+++	++	+
<p>+      1-4 COLONIAS.</p> <p>++     5-9 COLONIAS.</p> <p>+++    MAS DE 9 COLONIAS.</p>					



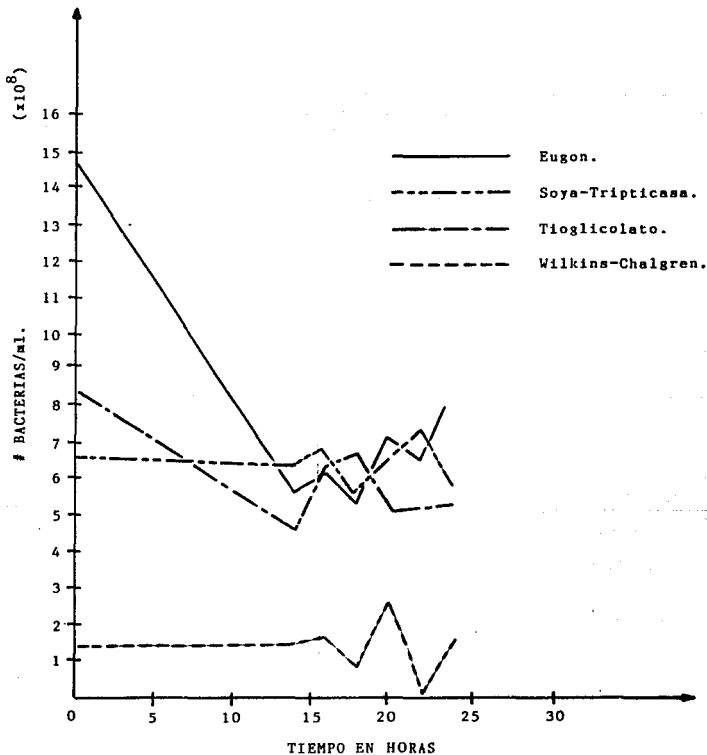
GRAFICA No. 4. CRECIMIENTO DE UNA DE LAS 4 CEPAS DE CAMPYLOBACTER SP. EN CUATRO MEDIOS DE CULTIVO LIQUIDOS.



GRAFICA No. 5. CRECIMIENTO DE UNA DE LAS 4 CEPAS DE CAMPYLOBACTER SP. EN CUATRO MEDIOS DE CULTIVO LIQUIDOS.



GRAFICA No. 6. CRECIMIENTO DE UNA DE LAS 4 CEPAS DE CAMPYLOBACTER SP. EN CUATRO MEDIOS DE CULTIVO LIQUIDOS.



GRAFICA No. 7. CRECIMIENTO DE UNA DE LAS 4 CEPAS DE CAMPYLOBACTER SP. EN CUATRO MEDIOS DE CULTIVO LIQUIDOS.

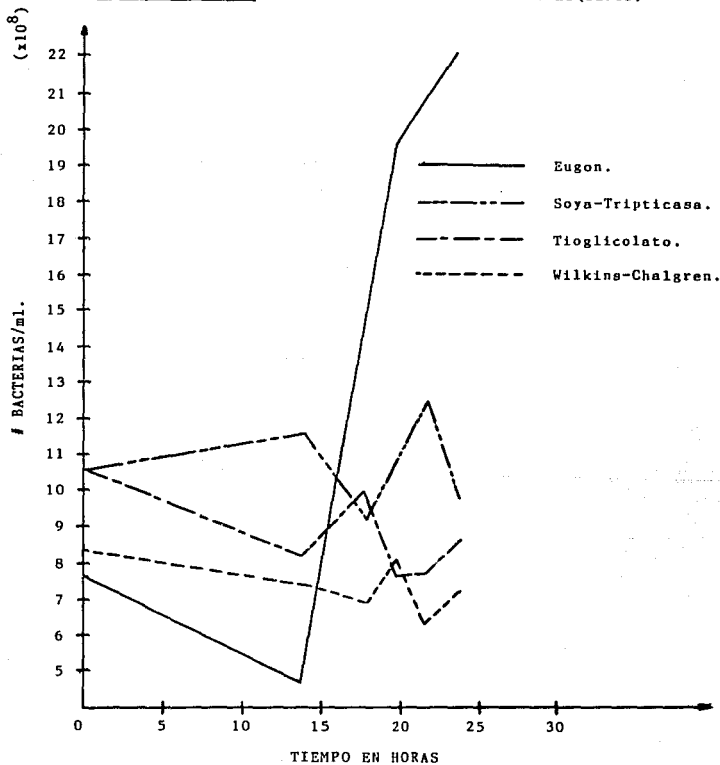


TABLA 1. SUSCEPTIBILIDAD DE 30 CEPAS DE CAMPYLOBACTER SP A 15 ANTIBIOTICOS.

ANTIBIOTICO	% ACUMULATIVO DE CEPAS INHIBIDAS A VARIAS CONCENTRACIONES (mcg/ml.)										
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
AC. NALIDIXICO					3.3	86.6	100				
AMIKACINA	3.3	33.3	86.6	100							
AMPICILINA			6.6	9.9	16.5	49.8	69.8	92.1	100		
AZTREONAM								3.3	23.3	100	
CEFALOTINA										100	
CEFOTAXIMA				3.3	19.9	26.5	76.5	96.5	100		
CEFTAZIDIME						6.6	19.9	66.5	93.1	100	
ERITROMICINA	6.6	23.2	36.5	79.8	100						
FURAZOLIDONA	23.3	69.9	96.5	100							
GENTAMICINA	76.6	96.6	100								
KANAMICINA				30.0	50.0	93.3	100				
TETRACICLINA	10.0	23.3	56.6	73.2	96.5					100	
TOBRAMICINA		16.6	73.2	96.5	100						
SULFAMETOXAZOL										3.3	100
TRIMETOPRIM										23.3	100
TMP/SMX.											100

## DISCUSION DE RESULTADOS.

Las cepas de Campylobacter sp. se detectaron por morfología microscópica típica, que corresponde a bacilos en forma espiral o en "alas de golodrina" tanto de la muestra directa como del cultivo y morfología colonial.

Como es presentado en el cuadro No. 3, respecto al aislamiento de cepas de Campylobacter sp. observamos que de 8 frotis directos positivos tenidos con azul de metileno, solamente 3 fueron positivos al cultivo en el caso del sexo femenino y 2 de 5 en el sexo masculino; esto sugiere que el medio de transporte de Stuart a algunas cepas de Campylobacter no les proporciona las condiciones necesarias para su viabilidad, durante su transportación en un lapso de tiempo de 2 a 4 horas aproximadamente, sin refrigeración (también se notó que las heces con formas bacterianas típicas de Campylobacter presentan características como: moco, estrias de sangre, olor fétido y color verdoso).

En la gráfica No. 1, de pastel, se presenta el 100% de las muestras de las que corresponden 85% negativas tanto al frotis directo como al cultivo; 10% positivas solo al frotis directo y 5% positivas tanto al frotis directo como al cultivo. La gráfica No. 2, de pastel contiene el porcentaje de cultivos

positivos del 15% de muestras positivas al frotis directo - con azul de metileno del cual corresponden el 33% a -- cultivos positivos y 66.67% a cultivos negativos --- respectivamente; lográndose aislar y purificar las cepas de Campylobacter sp. obteniendo el valor cercano al 40% reportado en la literatura (51).

Bajo la fase experimental se observó que de aquellas muestras en la cual se aislaron cepas de Campylobacter sp., la cantidad de bacilos espirales en el frotis directo es prominente, así como la cantidad de leucocitos --- polimorfonucleares, lo cual indica un proceso inflamatorio en el que podría estar implicado el Campylobacter como agente causal de la diarrea (39,51).

Por el contrario en aquellas muestras en las que se observaron escasos bacilos espirales no se logró aislar al Campylobacter a pesar de darse como positivo el frotis directo; considerándose que posiblemente esta bacteria sea inhibida en las mismas condiciones del intestino por los demás microorganismos que pueden ser los causantes de la diarrea, o bien, que las condiciones de transportación no fueron las óptimas para mantener los Campylobacter viables.

En la gráfica No. 3, de barras se comparan los medios de cultivos empleados (preparación, ver apéndice), para la obtención de colonias de Campylobacter, en el primo --- aislamiento así como en los cuadros 4, 5 y 6 que corresponde

a las condiciones de aereación, temperatura y suplementación respectivamente, tomando en cuenta el número aproximado de colonias presentes después de la incubación, que para el presente estudio, el medio más adecuado en el aislamiento de cepas de *Campylobacter* fue el de Soya-Trypticasa con una atmósfera generada por la efervescencia de dos Alka-Seltzer, a una temperatura de 37°C y una suplementación con 5% de - sangre de carnero, Cefoperazona, L-triptofano, L-cistina y hemina. Otro medio con menor aislamiento de cepas de --- *Campylobacter* es el agar Columbia en una atmósfera generada por la efervescencia de dos Alka-seltzer y tres velas, a - una temperatura de 42°C y una suplementación con 10% de - sangre de carnero, Cefoperazona, Polimixina y Trimetoprim. En el agar *Brucella* se trabajó con una atmósfera generada por tres velas y dado que no se tenía una suplementación del medio, así como la adecuada temperatura de incubación, no se logró recuperar las colonias de *Campylobacter* en el primo aislamiento.

En el caso de usar en el medio de primo aislamiento dos o más antibióticos es posible que exista un efecto de --- sumación o sinergismo entre ellos, que inhiba además de la flora intestinal a cepas de *Campylobacter*, a pesar de ser resistentes.

Dado que no se contaba con un congelador, las cepas -- aisladas de *Campylobacter* se guardaron en caldo *Brucella* en



viales de plástico y refrigeración, motivo por el cual no se lograron recuperar para estudios posteriores; solicitandose 30 cepas de *Campylobacter* previamente purificadas.

Respecto a la elección del medio líquido más adecuado para la incubación de 18 horas requerida en el método de -- dilución en placa para la concentración mínima inhibitoria -- el comportamiento de los medios probados se muestra en las gráficas No. 4, 5, 6 y 7; observandose que no existe una fase exponencial de las cepas en todos los medios, excepto en dos casos con el medio Eugon.

Esta diferencia de comportamiento no muestra un margen de confianza para llevar a cabo la incubación previa a las pruebas de sensibilidad. Es decir, al utilizar estos medios en una prueba de sensibilizar no se podría discernir entre la inhibición por el mismo medio o el antibiótico.

El porcentaje acumulativo de cepas inhibidas se observa en la tabla No. 1.

Con el Ac. Nalidixico y Amikacina las cepas fueron -- inhibidas a concentraciones menores que las reportadas en literaturas; posiblemente debido a cepas sensibles a estos antibióticos, ya que el Ac. Nalidixico es usado para la diferenciación de especies de *Campylobacter*; o aún cuando se emplearon cultivos jóvenes de 18 horas, cabe la -- probabilidad de encontrar bacterias no viables (7, 11, 14, 17, 53, 55).

Por el contrario, en Ceflazidime, Furazolidona y ---  
Gentamicina las inhibiciones se dieron a concentraciones --  
mayores que las reportadas en la literatura, probablemente  
las cepas presenten plásmidos que les confieren resistencia  
o bien, a una disminución en la potencia de éstos ---  
antibióticos (53, 55).

En el caso de Aztreonam y Cefotaxima, hasta el momento  
no han sido incluidos en los estudios de sensibilidad a  
antimicrobianos por los cual se desconoce la concentración  
mínima inhibitoria.

Para la Ampicilina, Kanamicina, Tetraciclina y ---  
Eritromicina se han encontrado tanto en la literatura como  
en el presente estudio cepas resistentes, a consecuencia de  
la presencia de plásmidos ya identificados para Kanamicina y  
Tetraciclina (9, 49).

## CONCLUSIONES.

Los factores importantes en el aislamiento de especies de *Campylobacter* son:

- 1) Medio adecuado de transporte.
- 2) Uso de un medio selectivo.
- 3) Incubación de placas en reducción de  $O_2$ , así como a  $37^\circ C$  y  $42^\circ C$ .

Es necesario suplementar un medio adecuado a las exigencias atmosféricas y nutricionales para el transporte de heces en las cuales se sospeche de la presencia de especies de *Campylobacter*, debido a que en el presente estudio el medio de transporte de Stuart no funciono adecuadamente para mantener la viabilidad en algunos casos de bacterias de *Campylobacter*.

Es necesario inocular e incubar los medios de cultivo en un tiempo no mayor de 2 horas a partir de la toma de la muestra; preferentemente transportadas en refrigeración.

Es importante realizar frotis directo de las heces para observar formas típicas de *Campylobacter*, así como la presencia de leucocitos polimorfonucleares, ya que éstos indican un proceso inflamatorio que sugiere la invasión bacteriana en la mucosa intestinal, siendo éste de gran importancia para la práctica en laboratorios de rutina.

Aún cuando se han realizado diferentes estudios para elaborar un medio más adecuado en condiciones específicas - atmosféricas y temperatura de incubación, para el --- aislamiento de cepas de *Campylobacter*, en el presente estudio se obtuvieron buenos resultados al suplementar medios básicos con aminoácidos y antibióticos, así como creando una atmósfera de CO<sub>2</sub> generada con la efervescencia de Alka-Seltzer con - vela y sin vela, a una temperatura de incubación de 37°C y 42°C [a ésta temperatura se suprime parte de la flora intestinal permitiendo que las cepas de *Campylobacter* crezcan (36, 37)], y la utilización de Cefoperazona como único antibiótico en el medio para ayudar a una mejor inhibición de la flora intestinal. Por tanto es posible, para los laboratorios de rutina emplear métodos más sencillos y menos estrictos como el presentado en este estudio, para lograr las condiciones microaerofílicas específicas y de temperatura para el aislamiento de algunas cepas de *Campylobacter*.

En el presente estudio no se encontró un medio líquido óptimo para llevar a cabo la incubación de 18 horas requerida para las pruebas de sensibilidad, aún cuando los medios se suplementaron no existió un comportamiento homogéneo de las cepas con respecto a éstos.

Como ha sido reportado para la caracterización de la sensibilidad a antimicrobianos de las cepas de *Campylobacter*, en el presente estudio el método de dilución en placa para

La concentración mínima inhibitoria proporciona datos --- satisfactorios.

En general las cepas de *Campylobacter* son sensibles a Ac. Nalidixico, Amikacina, Furazolidona, Tobramicina y - Gentamicinas, sin embargo para los dos últimos se tiene que definir la concentración inhibitoria para considerar a las cepas resistentes, así como un mejor empleo terapéutico.

Por lo tanto se sugiere aislar los plásmidos que --- codifican la resistencia a Ampicilina y Eritromicina ya que su uso terapéutico de verá restringido en un futuro (9, 10).

Las cepas de *Campylobacter* fueron resistentes a ---- Aztreonam, Cefalotina y Cefotaxima. La acción de Ceftazidime no está bien definida, por lo que será conveniente continuar su estudio y definir las concentraciones adecuadas para su empleo terapéutico.

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

- 1) Alvarado A F y Guando B C Frecuencia de microorganismos enteropatógenos aislados en niños con y sin diarrea aguda. *Bol Med Hosp Infan Méx* 1985 42 (6):354-359
- 2) Bhadna R K and Bag P K Comparison of selective medium supplemented with blood and a charcoal based blood-free medium for primary isolation of *Campylobacters* from humans faeces. *J Med Res* 1991 22(5):93-96
- 3) Blaser M J and Benkowitz I D Campylobacter enteritis: clinical and epidemiologic features. *Annals of Internal Medicine* 1979 91(2):179-185
- 4) Blaser M J and Hopkins J A Identification and ---- characterization of Campylobacter jejuni outer membrane proteins. *Infection and Immunity* 1983 42(1):276-284
- 5) Blaser M J and Hopkins J A Antigenicity of Campylobacter jejuni flagella. *Infection and Immunity* 1986 53(1):47-52
- 6) Blaser M J and Hopkins J A Campylobacter jejuni outer membrane proteins are antigenic for humans. *Infection and Immunity* 1984 43(3):986-993

- 7) Blaser M J and Smith P F Susceptibility of *Campylobacter* isolates to the bactericidal activity of humans serum. *J Infect Dis* 1985 151(2):227-235
- 8) Bolton F J and Coates D A Study of thermophilic campylobacters in a river system. *J App Bact* 1987 62(1):167-176
- 9) Bopp C A and Binkness K A In vitro antimicrobial susceptibility, plasmid analysis, and serotyping of epidemic-associated *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 1985 21(1):4-7
- 10) Bradbury W C and Marko M A Occurrence of plasmid DNA in serologically defined strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Infection and Immunity* 1983 40(2):460-463
- 11) Buck G E and Kelly M T Susceptibility testing of *Campylobacter fetus* subsp *jejuni*, using broth microdilution panels. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1982 21(2):274-277
- 12) Caldwell M B and Guerry P E Reversible expression of flagella in *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity* 1985 50(3):941-943
- 13) Chan F T and Mackenzie A M Enrichment medium and control system for isolation of *Campylobacter fetus* subsp *jejuni* from stools. *J Clin Microbiol* 1982 15(1):12-15

- 14) Chow A W and Patten V Susceptibility of Campylobacter fetus to twenty-two antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1978 13(3):416-418
- 15) Dunn B E and Blaser M J Two-dimensional gel ----- electrophoresis and immunoblotting of -- Campylobacter outer membrane proteins. *Infection and Immunity* 1987 55(7):1564-1572
- 16) Fernández H and Fagundes U N Culture supernatants of Campylobacter jejuni induce a secretory response in jejunal segments of adult rats. *Infection and Immunity* 1983 40(1):229-231
- 17) Gebhart C J and Ward G E In vitro activities of 47 antimicrobial agents against three --- Campylobacter sp from pigs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1985 27(1):55-59
- 18) Goossens H and De Boeck M A new selective medium for the isolation of Campylobacter jejuni from human faeces. *Eur J Clin Microbiol* 1983 2(4):389-394
- 19) Guerry P and Logan S M Genomic rearrangements associated with antigenic variation in Campylobacter coli *J Bact* 1988 170(1):316-319
- 20) Hazell S L and Lee A Campylobacter pyloridis and --- gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric



- 21) Hebert G A and Hollins D G Serogroups of Campylobacter jejuni, Campylobacter coli and Campylobacter fetus defined by direct immunofluorescence. *J Clin Microbiol* 1983 17(3):529-538
- 22) Huilan S and Zhen L G Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries: a multicentre study in five countries. *WHO Bulletin OMS* 1991 69(5):549-555
- 23) Karmali M A and Fleming P C Campylobacter enteritis in children. *J Ped* 1979 94(4):527-533
- 24) Karmali M A and Roscoe M Modified ammoniu electrode method to investigate D-asparagine breakdown by Campylobacter strains. *J Clin Microbiol* 1986 23(4):743-747
- 25) Klipstein F A and Engert R F Immunological relationship of the B subunits of Campylobacter jejuni and Escherichia coli heat-labile enterotoxins. *Infection and Immunity* 1985 48(3):629-633
- 26) Lai-King N G and Stiles M E Comparison of basal media for culturing Campylobacter jejuni and -- Campylobacter coli. *J Clin Microbiol* 1985 21(2):226-230
- 27) Lai-King NG and Taylor D E Characterization of freshly isolated Campylobacter coli strains and -- suitability of selective media for their growth. *J Clin Microbiol* 1988 26(3):518-523

- 28) Lindblom G B and Kaijser B Enterotoxin production and serogroups of Campylobacter jejuni and --- Campylobacter coli from patients with diarrhoea and from healthy laying hens. *J Clin Microbiol* 1989 27(6):1272-1276
- 29) Logan S M and Trust T J Molecular identification of surface protein antigens of Campylobacter jejuni *Infection and Immunity* 1983 42(2):675-682
- 30) Logan S M and Trust T J Outer membrane characteristics of Campylobacter jejuni. *Infection and Immunity* 1982 38(3):898-906
- 31) Logan S M and Trust T J Structural and antigenic -- heterogeneity of lipopolysaccharides of ---- Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. *Infection and Immunity* 1984 45(1):210-216
- 32) Mascant L F and Duchateau J R Kinetics of anti- ----- Campylobacter jejuni monomeric and polymeric immunoglobulin A1 and A2 responses in serum - during acute enteritis. *J Clin Microbiol* 1987 25(7):1253-1257
- 33) Miller J F and Dower W J High-voltage electroporation of bacteria: genetic transformation of ---- Campylobacter jejuni with plasmid DNA. *Proc Acad Sci* 1988 85(1):856-860

- 34) Mills S D and Bradbury W C Human antibody response to outer membrane proteins of Campylobacter jejuni during infection and Immunity 1984 43(2): 739-743
- 35) Mills S D and Bradbury W C Basis for serological heterogeneity of thermostable antigens of Campylobacter jejuni. Infection and Immunity 1985 50(1):284-291
- 36) Monfont J D and Stills H T Effect of sample holding time, temperature and atmosphere on the isolation of Campylobacter jejuni from dogs. J Clin Microbiol 1989 27(6):1419-1420
- 37) Morris G K and Patton Ch M Campylobacter. M Clin Microbiol chapter 27 Public Health Service 4<sup>a</sup> and 5<sup>a</sup> Ed 1985, 1991 302-308
- 38) Moss C W and Lambert F M Isoprenoid quinones of Campylobacter caryaerophila, C. cinaedi, C. fennelliae, C. hyointestinalis, C. pylori and C. upsaliensis. J Clin Microbiol 1990 28(2): 395-397
- 39) Olarte J M and Pérez G P Campylobacter jejuni in children with diarrhoea in Mexico city. Pediatric Infect Dis 1983 2(1):18-20
- 40) Pai C H and Sorger S Campylobacter gastroenteritis in children. J Ped 1979 94(4):589-591
- 41) Parra M N y Morales V A Aislamiento de Campylobacter fetus ss jejuni en pacientes adultos con síndrome

- dianneico. *Arch Invest Med* 1984 15(3):245-253
- 42) Pasternak J and Silver R Bacteremia caused by *Campylobacter*-like organisms in two male homosexuals. *Anal Int Med* 1984 101(3):339-340
- 43) Pérez P G and Hopkins A J Antigenic heterogeneity of lipopolysaccharides from *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter fetus*. *Infection Immunity* 1985 48(2):528-533
- 44) Rautelin H and Kosonen U T An acid extract as a common antigen in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* strains. *J Clin Microbiol* 1983 17(4):700-704
- 45) Rogal M and Sechter I Extended scheme for serotyping - *Campylobacter jejuni*: results obtained in Israel from 1980 to 1981. *J Clin Microbiol* 1983 18(2):283-286
- 46) Simon A E and Shames B Typing of *Campylobacter pylori* by bacterial DNA restriction endonuclease analysis and determination of plasmid profile. *J Clin Microbiol* 1990 28(1):83-86
- 47) Skinner B M *Campylobacter enteritis*: a "new" disease. *British Medical Journal* 1977 2(1):9-11
- 48) Tee W and Anderson N B Atypical *Campylobacter* associated with gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 1987 25(7):248-252

- 49) Tenover C F and Bronsdon A M Isolation of plasmids ---  
 encoding tetracycline resistance from ---  
Campylobacter jejuni strains isolated from  
 simians Antimicrobial Agents and Chemotherapy,  
 1983 23(2):320-322
- 50) Thompson S J and Hodge S D Use of tri-gas incubator for  
 routine culture of Campylobacter species from  
 fecal specimens J Clin Microbiol 1990 28(12)  
 :2802-2803
- 51) Thorson M S and Lohr A J 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
- 52) Vanhoof R and Goossens H Susceptibility pattern of  
Campylobacter jejuni from human and animal  
 origins to different antimicrobial agents.  
 Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1982 21  
 (6):990-992
- 53) Vanhoof R and Vanderlinden M P Susceptibility of  
Campylobacter fetus subsp. jejuni to twenty  
 nine antimicrobial agents. Antimicrobial Agents  
 and Chemotherapy 1978 14(4):553-556
- 54) Villanueva R A Biotipificación y serotipificación según  
 el esquema de H-Lion de cepas de Campylobacter

ap aisladas en México. Tesis profesional ENEP  
Zaragoza 1990 1-60

- 55) Walder M Susceptibility of Campylobacter jejuni subsp. jejuni to twenty antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1979 16 (1):37-39
- 56) Walker J R and Caldwell B M Pathophysiology of Campylobacter enteritis. *Microbiol Revis* 1986 50(1):81-94
- 57) Wang L W and Blaser J M Detection of Pathogenic Campylobacter species in blood culture systems. *J Clin Microbiol* 1986 23(4):709-714
- 58) Wenman N W and Chai J Antigenic analysis of Campylobacter flagella protein and other proteins. *J Clin Microbiol* 1985 21(1):108-112
- 59) Skirrow Campylobacter's medium. *WHO/DDC/EPE* 1980 4(1) :6-7
- 60) Picker K L Serum antibodies to heat-labile enterotoxin of Campylobacter jejuni. *J Infect Dis* 1985 152(2):413-415
- 61) De Witt G T White blood cell counts in patients with Campylobacter-induced diarrhea and in controls. *J Infect Dis* 1985 152(2):427-429
- 62) Campylobacter agar with 5-antimicrobics and 10% sheep blood. *BBL Microbiology systems* 1980:427-428

63) Fernández H Comunicación personal escrita. Servicio  
Público Federal. Sao Paulo 1983

64) Escobar G A Atlas de Bacteriología Schenamex 1988 3(1)  
:35-36

A P E N D I C E.

*Medios de cultivo básicos suplementados para el aislamiento de Campylobacter: ---*

*Agar Brucella al 5% de sangre de carnero.*

<i>Caldo Brucella .....</i>	<i>2.90 gr.</i>
<i>Agar Base .....</i>	<i>2.00 gr.</i>
<i>Agua Destilada .....</i>	<i>90.00 ml.</i>
<i>Sangre de Carnero desfibrinada .....</i>	<i>5.00 ml.</i>

*El caldo Brucella con el Agar se disuelven en agua, se esteriliza en autoclave, a 15 lb. de presión, 121°C por 15 minutos. Se deja enfriar hasta alcanzar una temperatura de 45°C y entonces se adiciona la sangre de carnero, se incorpora y homogeneiza bien por agitación manual; se vierte en cajas Petri, se dejan solidificar a temperatura ambiente y se conservan en refrigeración (4-8°C) hasta su uso. --*

*Agar Columbia al 10% de sangre de carnero.*

<i>Agar Columbia .....</i>	<i>4.40 gr.</i>
<i>Cefoperazona .....</i>	<i>0.50 ml.</i>
<i>Trimetoprim .....</i>	<i>0.50 ml.</i>
<i>Polimixina .....</i>	<i>0.50 ml.</i>
<i>Sangre de Carnero desfibrinada .....</i>	<i>10.00 ml.</i>
<i>Agua Destilada .....</i>	<i>86.00 ml.</i>



Se disuelve el agar con el agua, se esteriliza en autoclave, a 15 lb. de presión, 121°C por 15 minutos, se deja enfriar hasta alcanzar una temperatura de 45°C y -- entonces se adicionan los antibioticos de la siguiente manera; primero la Polimixina o Cefoperazona y por último el Trimetoprim. Posteriormente se adiciona la sangre de carnero, se incorporan y homogeneizan por agitación ---- manual; se vende en cajas Petri, se dejan solidificar a temperatura ambiente y se conservan en refrigeración (4-8°C) hasta su uso.

Agar Soya-Tripticasa al 5% de sangre de carnero.

Caldo Soya Tripticasa .....	3.00 gr.
Agar Base .....	2.00 gr.
L-Triptofano .....	0.20 gr.
Cefoperazona .....	0.50 ml.
Hemina .....	0.02 ml.
L-Cistina .....	0.20 ml.
Agua Destilada .....	90.00 ml.
Sangre de Carnero desfibrinada .....	5.00 ml.

El caldo Soya-Tripticasa con el agar, el L-Triptofano, L-Cistina y la hemina, se disuelven en el agua, se esteriliza en autoclave, a 15 lb. de presión, 121°C por 15 minutos. Se deja enfriar hasta alcanzar una temperatura de 45°C y entonces se adiciona la Cefoperazona y posteriormente la sangre de carnero; se incorpora y homogeneiza bien por agitación manual.

se vierte en cajas Petri, se dejan solidificar a temperatura ambiental y se conservan en refrigeración (4-8°C), hasta su uso.

Agar Müeller-Hinton al 5% de sangre de carnero.

Agar Müeller-Hinton ..... 3.80 gr.  
Sangre de Carnero desfibrinada ..... 5.00 ml.  
Agua Destilada ..... 94.00 ml.

El agar se disuelve en el agua, se esteriliza en autoclave, a 15 lb. de presión, 121°C por 15 minutos. Se deja enfriar hasta alcanzar una temperatura de 45°C y entonces se adiciona la sangre de carnero, se incorpora y homogeneiza bien con agitación manual; se vierte en cajas Petri, se dejan solidificar a temperatura ambiente; se conservan en refrigeración (4-8°C) hasta su uso.

Medio de Transporte.

Medio de Stuart ..... 1.41 gr.  
Agua Destilada ..... 100.00 ml.

Se disuelve el medio de Stuart en el agua, se homogeneiza por agitación manual, Se vierten 2,5 ml. por cada tubo, en tubos de 13x100, con hisopo y tapón de hules; se esterilizan en autoclave, a 15 lb. de presión, 121°C por 15 minutos. Se dejan enfriar a temperatura ambiente; se conservan en refrigeración (4-8°C) hasta su uso.

*Solución de Hemina: ..... 0.0015 mg. en 1.0 ml. de  
una solución de NaOH 0.1N*

*Medio Tioglicolato.*

*Medio Tioglicolato ..... 1.50 gr.  
Hemina ..... 0.0025 ml.  
Vitamina K ..... 0.0005 ml.  
Agua Destilada ..... 50.00 ml.*

*Se disuelve el medio Tioglicolato con la Hemina y la -  
Vitamina K en el agua, se homogeneiza por agitación manual;  
se vierte en tubos de 13x100 con tapón de rosca; se esteriliza  
en autoclave a 121°C, 15 lb. de presión, por 15 minutos. Se  
dejan enfriar a temperatura ambiente y se guardan en ---  
refrigeración (4-8°C) hasta su uso.*

*Medio de Soya-Tripticasa.*

*Caldo Soya-Tripticasa ..... 1.50 gr.  
Hemina ..... 0.0015 mg.  
L-Triptofano ..... 0.10 mg.  
L-Cistina ..... 0.20 mg.  
Agua Destilada ..... 50.00 ml.*

*Mismo procedimiento que el medio anterior.*

*Medio de Wilkins-Chalgren.*

*Caldo Wilkins-Chalgren ..... 1.65 gr.  
Agua Destilada ..... 50.00 ml.*

*Mismo procedimiento que el medio THIO.*

*Medio de Eugon.*

*Caldo Eugon ..... 1.50 gr.*

Agua destilada ..... 50.00 ml.

Mismo procedimiento que para el medio THIO.

Soluciones de antibióticos para medios de cultivo.

Cefoperazona ..... 0.10 mg. en 10.00 ml. de  
agua destilada estéril.

Polimixina B (sulfato) ..... 2.50 mg. en 10.00 ml. de  
agua destilada estéril.

Trimetoprim ..... 10.00 mg en 5.00 ml. de  
metanol.

Soluciones Stock de antibióticos.

ANTIBIOTICO

SOLVENTE/DILUENTE.

Ac. Nalidixico

1.2ml. 0.1M NaOH/ H<sub>2</sub>O

Amikacina

H<sub>2</sub>O / H<sub>2</sub>O

Ampicilina

H<sub>2</sub>O / H<sub>2</sub>O

Aztreonam

1-2ml. de sol. NaHCO<sub>3</sub> al 10%  
/ H<sub>2</sub>O

Cefalotina

H<sub>2</sub>O / H<sub>2</sub>O

Cefotaxima

H<sub>2</sub>O / H<sub>2</sub>O

Ceftazidime

H<sub>2</sub>O / H<sub>2</sub>O

Eritromicina

9ml. de metanol/1ml. Buffer  
de fosfatos  
pH 7.2.

Furazolidona

9ml. de N-N-dimetilformamida  
C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NO / H<sub>2</sub>O

Gentamicina

H<sub>2</sub>O / H<sub>2</sub>O

Kanamicina

H<sub>2</sub>O / H<sub>2</sub>O

Tetraciclina

H<sub>2</sub>O / H<sub>2</sub>O

Tobramicina

H<sub>2</sub>O / H<sub>2</sub>O

ANTIBIOTICO

SOLVENTE/DILUENTE.

Sulfametoxazol

2ml. de NaOH al 4% / H<sub>2</sub>O

Trimetoprim

9ml. de metanol / H<sub>2</sub>O

TMP / SMX.

Trimetoprim:5ml. Sulfametoxazol:1ml. / H<sub>2</sub>O

FORMULA EMPLEADA PARA LA DILUCION INICIAL DE CADA ANTIBIOTICO

$$\text{Peso (mg.)} = \frac{\text{Vol. (ml.)} \times \text{Conc. (mcg./ml.)}}{\text{Potencia (mcg./ml.)}}$$

**PREPARACION DE DILUCIONES DE ANTIBIOTICOS.**

Preparar 10ml de dilución de --  
antibiótico a una concentración  
de 1280mcg/ml.



Congelar a -20°C hasta su uso.



Se tienen aparte 10 tubos de -  
ensaye con 5ml de agua estéril  
cada uno, y se adicionan 5 ml  
de dilución de antibiótico a  
partir de la dilución inicial  
de 1280mcg/ml., por lo tanto  
tenemos diluciones que van de  
128 a 0.25 mcg/ml.



Guardar en refrigeración --  
hasta su posterior uso.

## PREPARACION DE PLACAS CON DILUCION DE ANTIBIOTICOS.

