



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA
División de Estudios de Posgrado

DETERMINACION DE LOS PATRONES
BIOQUIMICOS POR EL METODO MICRO
CAMPY DE LAS CEPAS DE CAMPYLO-
BACTER AISLADAS DE POBLACION
INFANTIL.

T E S I S

Que para obtener el Grado de
ESPECIALIZACION EN BIOQUIMICA CLINICA

p r e s e n t a

Q.F.B. MARIA DE LOS ANGELES GRANADOS SILVESTRE



Agosto de 1993



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

**Determinación de los patrones bioquímicos por el método " Micro Campy " de las
cepas de Campylobacter aisladas de población infantil.**

**María de los Angeles Granados Silvestre, Yolanda López-Vidal, Juan J. Calva
Mercado y María de Lourdes Guerrero Almeida.**

Departamento de Infectología

Instituto Nacional de la Nutrición " Salvador Zubirán "

México, D. F.

**El presente trabajo se llevó a cabo
bajo la asesoría de la Dra. Yolanda López Vidal
en el departamento de Infectología Investigación
del INNSZ.**

Primeramente doy infinitas gracias a Dios por haberme permitido nuevamente terminar con esta faceta de mi formación profesional.

Dedico este trabajo:

A la memoria de mi mamá y a mi papá quien me ha brindado su apoyo y cariño cada día de mi vida.

A la paciencia y dedicación de la Dra. Yolanda López Vidal

A mis hermanos: Jesús, Juanita, Carmen, Martín y Jerónimo por su comprensión durante este tiempo.

A mis amigos: Olga, Carmen, Kathur y Angela, quienes compartieron conmigo momentos gratos de estudio, a Mely y Gonzalo con quienes me identifique plenamente.

A todo el departamemnto de Infectología Investigación de INNSZ por haberme permitido compartir con ellos este período de mi vida.

Abstract.

In Campylobacter is known that three species are related as enteric pathogen in children under five years of age and patients with immunosuppression. Several groups have tried to classify them under biochemical profiles. Up to now exists six different profiles which consisted in 12 individual tests. We have designed a Micro Campy micromethod which allows us to identify *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari* and also to be able of classifying them into several biotypes. 52 Campylobacter strains isolated from human have been studied and finding 24 different patterns. From two of them we were able to classify those strains isolated diarrhea episodes. We proposed the use of this Micro Campy that has a reproducibility higher than 92% in biotyping Campylobacter strains.

Keywords. Campylobacter, Biochemical profiles, micromethod and biotyping scheme.

Resumen.

Tres especies de *Campylobacter* son reconocidas en la actualidad como patógenos entéricos de importancia clínica en niños menores de cinco años y en personas inmunosuprimidas. Su diferenciación bioquímica ha sido propuesta por diversos investigadores existiendo actualmente seis esquemas para su identificación, con doce pruebas representativas de éstos. Se diseñó un micrométodo "Micro Campy" que permite identificar *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari* además de clasificarlos en diversos biotipos. Utilizando 52 cepas de *Campylobacter* de origen humano se encontraron 24 patrones bioquímicos, en dos de ellos se agrupan las cepas provenientes de cuadros diarreicos. Nosotros proponemos el uso de este micrométodo con una reproducibilidad de no menos de 92% en la identificación bioquímica de las especies de *Campylobacter* y por ser de un uso más rápido.

Palabras claves: *Campylobacter*, patrones bioquímicos, micrométodo y biotipificación.

Introducción.

El género *Campylobacter* esta formado por bacilos curvos, gram-negativos, móviles, microaerofílicos y aunque contiene una gran variedad de especies las más comunmente consideradas como patógenos entéricos en el humano son: *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari* (1, 2, 3, 4). El primero de estas tres especies es el que se aísla con más frecuencia después de Rotavirus y *E. coli* en niños con diarrea aún en países industrializados. En países en vías de desarrollo las infecciones por *C. jejuni* y *C. coli* ocurren en los primeros cinco años de vida, pero especialmente en los dos primeros; *C. lari* es de gran importancia en los pacientes con diarrea que cursan con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. (5, 6, 7)

La necesidad de diferenciar estas tres especies termofílicas, es esencial para entender mejor su patofisiología y epidemiología (8, 4).

Los microorganismos antes mencionados no sólo son similares morfológicamente, sino que además carecen totalmente de capacidad fermentativa y por lo tanto estan restringidos a los procesos oxidativos para obtener energía. (3, 9)

Al estudiar Alexander (9) los siguientes sustratos: lactato, piruvato, acetato, Ó-cetoglutarato, succinato, fumárico, málico, aspártico, asparagina, glutámico y prolina encontró que estos le sirven como fuente de energía. Kzudas y Morse en 1956 (10) reportaron a su vez que el ácido nicotínico, tiamina, pantotenato de calcio, piridoxal-HCl y biotina eran necesarios para el desarrollo de *Campylobacter*.

Leece (11) y Kiggins (12), utilizando el primero, la técnica de Thunberg con un sistema metabólico basado en la reducción del cloruro de trifenil tetrazolio en presencia de lactato de sodio y el segundo la de Warburg llegaron a la conclusión que los sustratos capaces de actuar como donadores de electrones eran los mismos reportados por Alexander, además de que los intermediarios glicolíticos no eran oxidados mientras que los del ciclo del ácido tricarboxílico si, y que estos eran oxidados tanto por las células completas como por extractos celulares. Zemjanis (10) mostró que además la adición de magnesio y manganeso estimulaban el desarrollo de *Campylobacter*.

Además de sus experimentos sobre la capacidad oxidativa de este género Leece (11) observó el efecto de la glicina sobre su desarrollo con el fin de saber si existía una inhibición selectiva basada en el origen de la cepa aislada sus resultados no mostrarán que hubiera alguna diferencia dentro del género pero si con otros géneros diferentes.

Sin embargo la identificación de *Campylobacter* por especies es difícil ya que éstas comparten ciertas características fenotípicas y dado que su actividad metabólica es mínima y sólo utilizan intermediarios del ciclo de Krebs o aminoácidos que puedan entrar a él, su especiación por métodos bioquímicos no es fácil. (13,14)

Se han propuesto aproximadamente seis esquemas para su identificación bioquímica los cuales son: El de Skirrow que utiliza la hidrólisis del hipurato, la producción rápida de H₂S y resistencia a ácido nalidíxico para el reconocimiento de dos biotipos de

Campylobacter jejuni. El esquema de Lior propone la hidrólisis del hipurato, la producción de H₂S y la actividad de DNAsa. Preston con doce pruebas que incluyen diez de resistencia, desarrollo a 28°C e hidrólisis de hipurato biotipifica cuatro especies de *Campylobacter* y diferencia 55 tipos de *Campylobacter jejuni*. Hebert, Hollander y Roop utilizan además la actividad de fosfatasa alcalina aunque no logran obtener resultados satisfactorios. (8, 15, 16, 17, 18) En todos estos se han determinado su actividad enzimática y su capacidad de tolerar o asimilar compuestos químicos y algunos agentes antimicrobianos.

El objetivo del presente trabajo es diseñar un micrométodo utilizando algunas pruebas propuestas por los esquemas anteriores estandarizando la concentración de sustratos, del inóculo bacteriano y las condiciones de incubación que permitan obtener una descripción de los patrones bioquímicos para las especies termofílicas de *Campylobacter* de origen humano intestinal.

Las pruebas que fueron ensayadas son: reducción de nitratos, hidrólisis de hipurato, reducción del 2,3,5-Trifenil tetrazolio (TTC), producción de ácido sulfhídrico, actividad de fosfatasa alcalina, crecimiento en glicina, crecimiento en verde brillante, asimilación de ácido propiónico, ácido succínico y ácido málico así como resistencia a ácido nalidíxico y cefalotina.

Material y métodos.

Cepas. Se utilizaron 84 cepas del género *Campylobacter*, aisladas de humanos en medio de Campy Bap y conservadas en caldo infusión cerebro corazón (BHI) con glicerol al 10%, a -70°C . 52 de ellas provienen de la colección del departamento de infectología del INNSZ, 11 provenientes de un cuadro diarréico y las restantes de heces normales, 32 fueron enviadas del Instituto de Biotecnología de la UNAM para su identificación por el micrométodo una vez estandarizado. Se incluyeron siete cepas de referencia *C. jejuni* 59, *C. jejuni* 81116, *C. jejuni* C-31, *C. coli* INN 183, *C. coli* T2232, *C. coli* T2144, y *C. lari*, proporcionadas por el Dr. Edmundo Calva. Todas las cepas fueron crecidas por 24 hs en agar sangre de carnero al 5% en condiciones de microaerofilia a 42°C . Se identificaron como del género *Campylobacter* por su morfología (tinción de Gram) y por su reacción de oxidasa. Para cada cepa la prueba de catalasa fue realizada con peróxido de hidrógeno al 3% y bajo el siguiente criterio: positivo (burbujas en menos de 5 s), lento (burbujas en 5-30 s), y negativo (no producción de burbujas en 30 s) (19).

Pruebas bioquímicas. Hidrólisis de hipurato. Se lleva a cabo según la modificación de Harvey (20) con una solución de hipurato de sodio al 1% en solución amortiguadora de fosfatos $\text{pH}=7.2$. Se inocula un volumen de 0.4 mL hasta lograr una opacidad equivalente a la escala 5 de Mc Farland, se incubarán a 37°C por dos horas. Se reveló la presencia de glicina con ninhidrina al 2% en una mezcla de acetona-butanol 1:1, un color violeta se consideró como una reacción positiva. La reducción de nitratos a nitritos se realizó en caldo BHI con KNO_3 al 0.2% inoculando

0.5 mL de sustrato con una asada de cultivo e incubando a 37°C por 24 horas. La presencia de nitritos se llevo a cabo según Paik (21). La aparición de un color púrpura en el medio es considerada positiva. La producción de H₂S se estudio en el medio Hierro/Bisulfito/Piruvato (FBP) de acuerdo a Skirrow para diferenciar *C. jejuni* biotipo 1 y 2 (18). La actividad de fosfatasa alcalina fue medida suspendiendo en solución salina 0.85% cada una de las cepas hasta ajustar una opacidad equivalente a la escala 2 de Mc Farland (6×10^8 ufc/mL); a 0.5 mL de esta suspensión le fue adicionado 0.5 mL de reactivo de fosfatasa alcalina (0.2 % de p-nitrofenilfosfato disuelto en glicina 0.005 M, MgCl₂ 5×10^{-4} M pH=10.5). La prueba fue incubada seis horas a 37°C la aparición de un color amarillo es considerada como una reacción positiva.(8)

Pruebas de tolerancia y asimilación. Para la tolerancia al TTC se prepararon placas de gelosa sangre al 5% con una concentración final de 0.04% de TTC se inocularon con un replicador de Steers (19, 22). El medio de verde brillante fue preparado por adición de 100 μL de una solución de verde brillante al 1% a 1 L de agar Brucella se inoculó con un replicador de Steers. Ambas inoculaciones con el replicador correspondieron a un inóculo final de 6×10^5 ufc/mL (23). La susceptibilidad a ácido nalidíxico y cefalotina se llevó a cabo utilizando unidiscos de ácido nalidíxico y cefalotina de 30 μg por disco y fue realizada en agar Muller Hinton, la presencia de una zona clara de inhibición (≥ 10 mm) fue tomada como resistencia.

El crecimiento en glicina se llevo a cabo en medio BHI semisólido con polienriquecimiento y glicina al 1% inoculándose por picadura. La asimilación de

ácidos orgánicos (propiónico, succínico y málico) se realizó en un medio mínimo semisólido con una concentración final de 2 g/L de cada uno de ellos, inoculándose por picadura. En el caso de las pruebas en placa se llevo a cabo un control de crecimiento en gelosa sangre al 5%, y en la pruebas en tubo un medio semisólido de agar Muller Hinton con polienriquecimiento. Todas las pruebas para asimilación y resistencia fueron incubadas a 42°C por 48 horas en condiciones de microaerofilia.

Estandarización del micrométodo.

Pruebas Bloquímicas.

Hidrólisis de hipurato. Se prepararon soluciones al 1, 2, 3 y 5% de hipurato de sodio en solución amortiguadora de fosfatos.

Reducción de nitratos: se realizaron soluciones al 0.2 y 0.3% de KNO_3 en caldo BHI.

Reducción de TTC: las soluciones se obtienen con una concentración de 0.04, 0.08, 0.12 y 0.25% de TTC en una solución saturada de Na_2HPO_4 con 1.1 mg de piruvato de sodio por 100 mL de solución.

Para la prueba de fosfatasa alcalina las soluciones se preparon en solución amortiguadora Tris 0.02 M pH=8.0 en concentraciones de 0.2, 0.5, 1.0 y 2% de p-nitrofenil fosfato. La producción de H_2S se realizó en caldo FBP omitiendo el agar. Todas las soluciones son esterilizadas por filtración con membrana de 0.22 μm .

Pruebas de asimilación y resistencia.

Crecimiento en glicina: la solución se prepara en BHI más polienriquecimiento, y 1% de glicina. Verde Brillante: se utilizó caldo BHI, con polienriquecimiento, se agregó por cada 100 mL de solución 100 μ L de una solución de verde brillante al 1%. Para la asimilación de ácidos orgánicos se preparó un medio mínimo según Roop, pero utilizando los aminoácidos a una concentración final de 10 mg/L con este medio se prepararon soluciones de ácido málico, ácido succínico y ácido propiónico (en su forma de sal sódica) al 0.1, 0.2 y 0.5%. Los antibióticos son disueltos según sus especificaciones y aforados con caldo Muller-Hinton con polienriquecimiento en concentraciones de 30, 45 y 60 μ g/mL para el ácido nalidíxico y de 45, 60 y 75 μ g/mL para cefalotina. Todas las soluciones son esterilizadas por filtración.

Estas soluciones son preparadas al doble de su concentración y vertidas en microplacas para cultivo de 96 pozos en volumen de 50 μ L por cada pozo. Se congelaron a -70°C para posteriormente ser liofilizadas.

Las cepas fueron cultivadas como se describió previamente, realizándose una suspensión de cada una de ellas en solución salina al 0.85% hasta lograr una opacidad correspondiente al tubo 2 y 6 de Mc Farland (6×10^8 y 1.8×10^{10} respectivamente), con estas se inocularon con 100 μ L las pruebas de: reducción de nitratos, reducción de TTC, hidrólisis de hipurato, fosfatasa alcalina y producción de H₂S, en ésta última los pozos se cubrieron con aceite mineral estéril. Se incubaron a 37°C por 24 horas. Se revelaron de acuerdo a los métodos ya descritos y fueron interpretados de la misma forma. Por otra parte se prepararon dos suspensiones bacterianas una a la escala 1 de Mc Farland (3×10^8 ufc/mL) y otra a la de 0.5 de Mc Farland (1.5×10^8 ufc/mL) en solución amortiguadora de fosfatos pH=7.2,

posteriormente de esta última se toman 10 μ L y aforan a 10 mL con la misma solución amortiguadora para obtener una concentración final de aproximadamente 1.5×10^8 ufc/mL. Se inocularon con esta suspensión las pruebas de asimilación y resistencia, incubándose por 24 horas a 42°C en condiciones de microaerofilia, una turbidez en el fondo se interpreta como prueba positiva.

Las diluciones de sustratos seleccionadas se muestran en la tabla 1.

Resultados

Del total de 84 cepas del género *Campylobacter* probadas por el método convencional, 52 provenientes de la colección del departamento de Infectología del INNSZ, 42 de ellas fueron clasificadas como *C. jejuni* biotipo 1 y 10 como *C. coli* de acuerdo a los criterios de Skirrow (18); estas cepas y las de referencia fueron utilizadas para la estandarización del micrométodo. Las 32 cepas restantes fueron enviadas por el Instituto de Biotecnología UNAM, para ser identificadas por el micrométodo una vez estandarizado y se agruparon como sigue: 18 *C. jejuni*, 10 como *C. coli* y 4 como *C. lari*.

La estandarización para el Micrométodo "Micro Campy" se muestra en la tabla No.1, los sustratos que fueron ensayados y modificados en cuanto al crecimiento o resistencia son: el hipurato de sodio, el p-nitrofenilfosfato, TTC, ácido málico, ácido propiónico y la cefalotina, estos cambios se hicieron valorando los resultados obtenidos con las cepas de referencia. Tabla No.2

Una vez estandarizado las concentraciones de los sustratos y el inóculo bacteriano, se procedió a efectuar 4 veces en diferentes días con las seis cepas de referencia las doce pruebas con el fin de analizar la variación interensayo y evaluar la reproducibilidad de cada prueba. Los resultados se muestran en la tabla No 3. Los sustratos que tuvieron una menor variabilidad fueron: crecimiento en glicina, verde brillante, ácido propiónico, ácido málico, resistencia a cefalotina y ácido nalídixico con un 4.1%, seguida por la reducción de TTC e hidrólisis de hipurato con un 8.3%, la

prueba de fosfatasa alcalina fué la que tuvo mayor variabilidad con 12.8%.

Inicialmente se procedió a caracterizar las 52 cepas del INNSZ y las 6 cepas de referencia por las pruebas sugeridas por la bibliografía (8, 15, 16, 17, 18), dichas pruebas se llevaron a cabo en tubo y fueron llamadas como método convencional todas las pruebas tanto las del micrométodo "Micro Campy" como las del método convencional se realizaron por duplicado. La asociación entre el método convencional y el "Micro Campy" se analizó mediante el índice de correlación de kappa, (tablas 4, 5, 6), analizándose primero todo el conjunto de las 52 cepas y posteriormente por especies, las 42 cepas de *Campylobacter jejuni* (hidrólisis de hipurato positivo) y las 10 cepas de *Campylobacter coli* (hidrólisis de hipurato negativo). En el análisis global se encontró una correlación del 100% para las pruebas de reducción de nitratos, hidrólisis de hipurato, producción de H₂S, crecimiento en glicina y resistencia a cefalotina; el ácido nalidíxico correlacionó en un 95%, en el crecimiento en verde brillante, ácido propiónico, y ácido succínico, esta correlación fué de entre un 85 y 87%, el crecimiento en ácido málico y reducción de TTC de 70% y 76% respectivamente, y en la prueba de fosfatasa alcalina de 70%. En el análisis por especies de cepas *C. jejuni* aumentó su índice de correlación en las pruebas de asimilación de ácido succínico, crecimiento en verde brillante con un 93% el primero y 92% el segundo junto con la reducción del TTC en un 82%, las pruebas donde disminuyó ésta fueron asimilación de ácido propiónico con 85% y ácido málico con 73%. En cuanto a las cepas de *Campylobacter coli* mejoró su asociación con 89% en la prueba de fosfatasa alcalina, asimilación de ácido propiónico y málico, mientras que en las pruebas de reducción de TTC y crecimiento en verde brillante disminuyó con 67% y 78% respectivamente, todas las demás pruebas permanecieron sin cambio.

Uno de nuestros objetivos era conocer si dentro de una misma especie de *Campylobacter* ya sea que hidrolizaran el hipurato o no, existían diferencias metabólicas en su actividad enzimática o en la capacidad de poder asimilar o resistir algunos compuestos químicos y antibióticos, y con ello establecer patrones bioquímicos, lo que encontramos fué que en sustratos como: nitratos, crecimiento en glicina, producción de H₂S, resistencia a ácido nalidíxico y cefalotina no había variación en ninguna de las cepas por lo que se procedió únicamente a tomar en cuenta para establecer los patrones bioquímicos aquellos sustratos donde existían variaciones, estos sustratos fueron: actividad de fosfatasa alcalina, reducción de TTC, crecimiento en verde brillante, asimilación de ácido propiónico, ácido succínico y ácido málico. Se describieron 24 patrones bioquímicos 16 de los cuales corresponden a las cepas de *Campylobacter jejuni*, y dos de ellos los número 3 y 9 son comunes a cepas de *Campylobacter coli* (hidrólisis de hipurato negativo), tablas 7 y 8. Aunque en los patrones 1 y 2 se concentran las cepas provenientes de cuadros diarreicos al realizarse la prueba del índice de correlación de kappa y regresión logística para saber si existía alguna asociación de cuadro clínico con patrón bioquímico, se observó que si había asociación con algunos sustratos pero no fué estadísticamente significativo. (resultados no mostrados)

De las 33 cepas de *Campylobacter* enviadas a doble ciego por el Instituto de Biotecnología UNAM, para su identificación por el micrométodo "Micro Campy", 18 (54.5%) de ellas tuvieron patrones similares a los obtenidos por las cepas provenientes del INNSZ (tabla 9) y las 15 (45.5%) restantes no pudieron clasificarse dentro de los patrones previamente establecidos, cuatro (12.1%) de ellas además

fueron resistentes a ácido nalidíxico y cefalotina por lo que se puede establecer un tercer grupo de *Campylobacter* con hidrólisis de hipurato negativo pero resistentes a los dos antibióticos anteriores.

Tabla 1. Estandarización del micrométodo **MicroCampy**. Los sustratos se estandarizaron con cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *C. freundii*, *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*.

Reactivos y Pruebas	Diluciones empleadas	Dilución seleccionada
a) Actividad enzimática		
Reducción de nitratos		
KNO ₃ (J.T Baker)	0.2, 0.3%	0.2%
Hidrólisis de hipurato		
Hipurato de sodio (Sigma)	1, 2, 3, 5%	2%
Actividad de fosfatasa alcalina		
P-nitrofenilfosfato (Merck)	0.2, 0.5%, 1, 2%	0.5%
Reducción de TTC		
2,3,5-cloruro de trifeníl-Tetrazolio (TTC) (Merck)	0.04, 0.08, 0.12, 0.25%	0.12%
Producción de H₂S		
Caldo Hierro/Piruvato/ Bisulfito (J.T Baker y Sigma)	0.05% c/u	0.05%
b) Pruebas de asimilación y/o resistencia		
Resistencia a:		
Glicina (Sigma)	1, 2%	1%
Verde Brillante (Harlic)	1:100,000	1:100,000
Asimilación de:		
Ac. succínico (Sigma)	0.1, 0.2, 0.5%	0.2%
Ac. málico (Sigma)	0.1, 0.2, 0.5%	0.5%
Ac. propiónico (Sigma)	0.1, 0.2, 0.5%	0.5%
Resistencia a:		
Ac. nalidíxico (Bigaux)	30, 45, 60 µg/mL	45 µg/mL
Cefalotina (Eli Lilly)	45, 60, 75 µg/mL	75 µg/mL

Tabla 2. Patrones bioquímicos de las cepas de referencia obtenidos con el micrométodo "Micro Campy"

Cepa	S U S T R A T O S											
	N	H	F	T	H	G	V	P	S	M	N	C
	I	I	A	T	2	L	B	R	U	A	A	E
	T	P	L	C	S	I	R	O	C	L	L	F
<i>C. jejuni</i>												
*59	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
*81116	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
*C-31	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
Código	1	1	1	1	2	1	2	3	2	3	2	3
<i>C. coli</i>												
**INN 183	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
T2232	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+
T2144	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
código	1	2	3	1	2	1	3	1	3	4	2	1
*<i>C. lari</i>												
	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+

* Cepas proporcionadas del IBT UNAM

** INNSZ Infectología

Todas las cepas fueron ensayadas por duplicado.

Sustratos:

NIT=Nitratos

HIP= hidrólisis del hipurato

FAL=Fosfatasa alcalina

TTC=Reducción de cloruro de trifenil tetrazolio

H2S=Producción de ácido sulfhídrico

GLI=Crecimiento en glicina

VBR=Crecimiento en verde brillante

PRO=Asimilación de ácido propiónico

SUC=Asimilación de ácido succínico

MAL=Asimilación de ácido málico

NAL=Resistencia a ácido nalidixico

CEF=Resistencia a cefalotina

Tabla 3. Variación interensayo para la estandarización del micrométodo "Micro Campy" para la identificación bioquímica de *Campylobacter*

S U S T R A T O S

cepa	hip	fal	ttc	gli	vbr	pro	suc	mal	nal.	cef
59	4	4	4	3	0	4	0	4	0	4
81116	3	4	4	4	0	4	0	0	0	4
C-31	4	3	3	4	0	1	0	3	0	3
INN183	0	3	3	4	3	4	4	4	1	4
2144	1	4	4	4	0	4	3	0	0	4
2232	0	1	4	4	4	4	1	0	0	4
Var (%)	8.3	12	8.3	4.1	4.1	4.1	8.3	4.1	4.1	4.1

Cepas: 59 *C. jejuni*; 81116 *C. jejuni*; C-31 *C. jejuni*; INN183

C. coli; 2144 *C. coli*; 2232 *C. coli*

Los resultados están expresados como número de resultados positivos por cuatro ensayos realizados en diferentes días.

La variación interensayo está expresada como porcentaje

Tabla 4. Asociación entre el método convencional y el "Micro Campy" mediante el índice de correlación de kappa, de 52 cepas de *Campylobacter*.

Prueba bioquímica	Método convencional	%	MicroCampy	%	kappa
nitratos	52	100	52	100	100
h. de hipurato	42	80	42	80	100
F. alcalina	48	92	43	82	70
TTC	48	92	42	80	76
H ₂ S	0	0	0	0	100
Glicina	52	100	52	100	100
V. brillante	10	19	8	15	87
Propiónico	24	46	31	59	86
Succínico	36	69	38	73	85
Málico	20	38	19	36	75
Ac. nalidíxico	0	0	1	2	95
Cefalotina	52	100	52	100	100

Los valores están dados como el número de cepas que tuvieron reacciones positivas para sustratos o crecimiento.

Tabla 5. Asociación entre el método convencional y el "Micro Campy" mediante el índice de correlación de kappa de 42 cepas de *Campylobacter jejuni*.

Prueba bioquímica	Método convencional	%	MicroCampy	%	kappa
nitratos	42	100	42	100	100
h. de hipurato	42	100	42	100	100
F. alcalina	39	93	35	83	70
TTC	38	90	35	83	82
H ₂ S	0	0	0	0	100
Glicina	42	100	42	100	100
V. brillante	4	9	2	5	92
Propiónico	22	52	27	64	85
Succínico	30	71	32	76	93
Málico	13	31	11	26	73
Ac. nalidíxico	0	0	1	2	95
cefalotina	42	100	42	100	100

Los valores están dados como el número de cepas que tuvieron reacciones positivas para sustratos o crecimiento.

Tabla 6. Asociación entre el método convencional y el "Micro Campy" mediante el índice de correlación de kappa para 10 cepas de *Campylobacter coli*.

Prueba bioquímica	Método convencional	%	MicroCampy	%	kappa
Nitratos	10	100	10	100	100
h. de hipurato	0	0	0	0	100
F. alcalina	8	80	9	90	89
TTC	10	100	7	70	67
H ₂ S	0	0	0	0	100
Glicina	10	100	10	100	100
V. brillante	4	40	6	60	78
Propiónico	3	30	4	40	89
Succínico	6	60	6	60	100
Málico	7	70	8	80	89
Ac. nalidíxico	0	0	0	0	100
Cefalotina	10	100	10	100	100

Los valores están dados como el número de cepas que tuvieron reacciones positivas para sustratos o crecimiento.

Tabla 7. Patrones bioquímicos encontrados para la cepas de *Campylobacter* hidrólisis de hipurato positivo.

S U S T R A T O S

No de patrón	F A L	T T C	V B R	P R O	S U C	M A L	N n	D n	Total n
1	+	+		+	+		11	2	13
2	+	+					3	4	7
3	+	+		+	+	+	3	1	4
4	+	+			+		3	0	3
5	+						2	0	2
6	+			+	+		2	0	2
7	+	+			+	+	1	1	2
8		+		+	+	+	0	1	1
9	+	+	+	+	+	+	1	0	1
10	+	+	+	+	+		0	1	1
11		+		+	+	+	1	0	1
12				+	+		0	1	1
13		+		+			1	0	1
14				+	+	+	1	0	1
15					+		1	0	1
16		+		+	+		1	0	1
total							31	11	42

N= normal; D= diarréica

Tabla 8. Patrones bioquímicos encontrados para las cepas de *Campylobacter* hidrólisis de hipurato negativo.

S U S T R A T O S

No de patrón	F A L	T T C	V B R	P R O	S R O	M C L	N n	Total n
3	+	+	-	+	+	+	1	1
9	+	+	+	+	+	+	1	1
17	+	+	+	+	-		1	1
18	+	-		+	-	+	1	1
19	+	+	+	-			1	1
20	+	+	+	-	-	+	1	1
21			+	+	-	+	1	1
22	+	+	+	-	+	+	1	1
23					+	+	1	1
24	+	-			+	+	1	1
total							10	10

N= normal

Tabla 9. Clasificación de las cepas de *Campylobacter* valoradas a doble ciego para su identificación por el micrométodo "Micro Campy" con los patrones bioquímicos previamente establecidos.

No de patrón	No cepas
1	2
3	2
4	1
6	5
8	1
10	2
16	1
18	2
22	1
24	1
s/c	15
total	33

s/c. Sin clasificar

Discusión.

Se han propuesto diversos esquemas para la biotipificación de las especies de *Campylobacter* donde se incluyen pruebas de resistencia a ciertos antibióticos tales como ácido nalidíxico, cefalotina y metronidazol o a sustancias químicas y colorantes que pueden ser desarrollo en glicina al 1% o crecimiento en verde brillante 1:100 000 y safranina al 0.02%, así como su desarrollo a diferentes temperaturas 25°C y 42°C aunado a su capacidad enzimática frente a ciertos sustratos como lo son el hipurato, el p-nitrofenil fosfato y el TTC.

Hébert encontró que las cepas de *C. jejuni* de diversos orígenes (humanos y animales así como de diferentes fuentes: heces, sangre etc.) podrían agruparse de acuerdo a su capacidad de hidrolizar hipurato y DNA así como su desarrollo en agar CYE (Charcoal Yeast extract) en ocho biotipos, a su vez Skirrow los clasifico en dos biotipos I y II por su producción de H₂S en medio FBP y separo a *C. coli* y *C. lari* por la hidrólisis de hipurato y resistencia a ácido nalidíxico y cefalotina. Lior por su parte agrupo a *C. jejuni* en 4 biotipos en base a la hidrólisis de hipurato, resistencia a ácido nalidíxico, hidrólisis de DNA y desarrollo anaerobio en presencia de óxido de N-trimetilamina (TMAO), *C. coli* en dos y *C. lari* en dos, Roop estableció cuatro biotipos tanto como para *C. jejuni* como para *C. coli* adicionando la prueba de actividad de fosfatasa alcalina y desarrollo en medio mínimo, el esquema que parece ser más utilizado para fines epidemiológicos es el de Bolton que clasifica a *C. jejuni* en aproximadamente 55 biotipos diferentes utilizando 10 pruebas de resistencia a sustancias químicas como la pirronina, safranina, arsenito de sodio, permanganato

de potasio, TTC, etc. Nosotros encontramos que la prueba de hidrólisis de hipurato basada en la presencia de la enzima hipuricasa en algunas bacterias y que hidroliza el hipurato a ácido benzoico y glicina diferencia a *C. jejuni* de *C. coli* y que utilizando 6 pruebas del Micrométodo "MicroCampy" se pueden establecer 16 patrones bioquímicos para *C. jejuni* y 10 para *C. coli* teniendo 2 patrones en común, patrón 3 y 9 (tabla No.8) para cepas de origen humano estas pruebas son: actividad de fosfatasa alcalina, reducción de TTC, crecimiento en verde brillante, ácido propiónico, succínico y málico. Todos los investigadores anteriores han establecido sus biotipos a través de pruebas en placa o en tubo y han estandarizado las concentraciones de sus sustancias inhibitoras (0.001-1%), así como el tiempo (1-3 días) y temperaturas (25-42°C) de desarrollo sin embargo no han establecido cual es la concentración óptima de inóculo con excepción de Bolton que utiliza 2×10^8 ufc/mL para pruebas de resistencia, por lo que en pruebas como lo es la actividad de fosfatasa alcalina existen resultados variables (38-74.6%), esta prueba en particular es difícil de estandarizar ya que la gama de colores amarillos que se pueden encontrar es muy variado dependiendo de la concentración de sustrato y del tamaño de inóculo, por nuestra parte, encontramos que por micrométodo el 83% de las cepas de *C. jejuni* eran positivas a esta prueba mientras que *C. coli* lo era en un 90% estos resultados tal vez podrían modificarse si el número de cepas probadas fuera más grande como en el caso de los investigadores antes mencionados ya que el número de cepas estudiadas por ellos va de aproximadamente 200 a 1000 y nosotros utilizamos 52. Estudios previos hechos por Megraud con la finalidad de conocer los patrones enzimáticos, los sustratos que favorecen el desarrollo y que pueden diferenciar además las cepas de *Campylobacter*, utilizando 58 sustratos para enzimas y 98

pruebas de asimilación, dan como resultado que existen tres enzimas que tienen un buen valor predictivo L-pirrolidonil arilamidasa, L-arginil amidasa y la gama glutamil arilamidasa.

Entre los sustratos de asimilación parece existir una asociación entre la utilización de d-malato y la prueba de hipurato y con el ácido propiónico para las cepas de *C. coli*. Todas estas pruebas fueron ya realizadas en micrométodo y las concentraciones de inóculo bacteriano fueron estandarizadas previamente por API, 10^8 ufc/mL para actividad enzimática y 1×10^6 ufc/mL para asimilación, esta última concentración bacteriana fue la que finalmente utilizamos para las pruebas de asimilación en el "Micro Campy", mientras que para las pruebas de actividad enzimática fue de 1.8×10^{10} como lo marca Holmes en la bibliografía. Nosotros incluimos sólo tres pruebas de asimilación similares que son: la del ácido propiónico (5 gr/L), ácido málico (5 gr/L) y ácido succínico (2 gr/L), y se encontró que las cepas de *C. jejuni* utilizan sólo un 26% el ácido málico mientras que *C. coli* utiliza el propiónico en un 40%; las diferencias en estos resultados pueden deberse a que Megraud utilizó la microplacas preparadas por API con 2 gr/L de estos ácidos orgánicos.

Por nuestra parte modificamos las concentraciones a 5 gr/L de ácido propiónico y málico ya que con 2 gr/L no se apreciaba ningún crecimiento en las cepas de referencia, además de que las cepas probadas por el grupo de Megraud provenían de diferentes orígenes y las usadas por nosotros son sólo de origen humano.

Los sustratos que nosotros incluimos en el micrométodo y que Megraud no incluyó son: hidrólisis de hipurato, producción de H_2S , reducción de nitratos, reducción de

TTC, crecimiento en glicina y verde brillante, resistencia a ácido nalídixico y cefalotina, en los esquemas que fueron mencionados al principio algunas de estas pruebas se llevan a cabo pero en placa o tubo.

Entre las investigaciones que se están realizando en la actualidad para la especiación de *Campylobacter* se encuentran además las referidas al uso de la Biología Molecular con las sondas de hibridación. El Dr. Edmundo Calva en el Instituto Nacional de Biotecnología (UNAM) nos proporcionó cepas de *Campylobacter* que fueron trabajadas conjuntamente a doble ciego tanto por el "Micro Campy" como por hibridación, lográndose más tarde establecer una comparación por ambos métodos con una similitud en los resultados obtenidos del 98% (datos no mostrados).

En este estudio se trabajaron 11 cepas de *C. jejuni* recuperadas de niños con un cuadro de diarrea, de este total, 4 de ellas eran de cepas pareadas, es decir también se recuperó *C. jejuni* de heces antes del episodio de diarrea y se obtuvo que en 2 de los casos (50%) el patrón bioquímico de la cepa recuperada fue el mismo tanto para cepa proveniente de cuadro normal como para la de cuadro con diarrea estos patrones fueron los No 1 y No 2 y en los casos restantes correspondieron a los patrones No 3, 8 y 10 repitiéndose además el No 2.

Por último cabe señalar que el uso de micrométodos en los laboratorios clínicos son de gran ayuda para la identificación bacteriana por lo que este micrométodo "Micro Campy" puede ser útil en estos casos, por lo que se propone como siguiente paso en este estudio, su validación a través de su uso en múltiples aislados de muestras

clínicas provenientes de población abierta con el fin de establecer si la especificidad del micrométodo es la adecuada o si es necesario adicionar uno o más sustratos para mejorarlo y tal vez poder acortar el tiempo para lograr una identificación.

Bibliografía.

- 1.- Benjamin J., S. Leaper, R. J. Owen. 1983. Description of *Campylobacter laridis*, a New Species Comprising the Nalidixic Acid Resistant Thermophilic *Campylobacter* (NARTC) Group. *Current Microbiol.* 8:231-238.
- 2.- Blaser J.M., Berkowitz I., Laforce M. 1979. *Campylobacter* Enteritis: Clinical and Epidemiological Features. *Ann Int Med.* 91:179-185.
- 3.- Smibert M. R., Genus *Campylobacter*, Sebald and Véron 1963, 907 ^{AL} in *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*. Vol.1, Ed. N.R. Krieg and S.G. Holt. William and Wilkins. Baltimore E.U.A. pp 111-118.
- 4.- Walker R., Caldwell B., Lec E. et al. 1986. Pathophysiology of *Campylobacter* Enteritis. *Microbiol Rev.* 50: 81-94.
- 5.- Blaser J.M., Taylor D., Feldman R. 1983. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* Infections. *Epidemiol Rev.* 5: 156-157.
- 6.- Fennell C., Totten P., Quinn T. 1984. Characterization of *Campylobacter*-Like Organisms Isolated from Homosexual Men. *J Infec Dis.* 149: 58-66.
- 7.- Villafán H., Ordoñez R., Tello A. 1991. Infección por *Campylobacter jejuni* en niños de una comunidad rural. *Bol Med Hos Inf Mex.* 48: 458-462.
- 8.- Lior H. 1984. New Extended Biotyping Scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and "*Campylobacter laridis*". *J Clin Microbiol.* 20: 636-640.
- 9.- Alexander K. 1957. Energy Sources Utilized by *Vibrio fetus*. *J Bacteriol.* 74: 168-170.
10. Smibert M. 1963. Nutrition of *Vibrio fetus*. *J Bacteriol.* 85: 394-398.

- 11.- Lecce G. 1958. Some Biochemical Characteristics of *Vibrio fetus* and other related Vibrios Isolated from Animals. *J Bacteriol.* 76: 312-316.
- 12.- Kiggins E., Plastringe W. 1958. Some Metabolic Activities of *Vibrio fetus* of Bovine Origin. *J Bacteriol.* 75:205-208.
- 13.- Elharrif Z., Mégraud F. 1986. Characterization of Thermophylic *Campylobacter*: I Carbon-substrate Utilization Test. *Current Microbiol.* 13: 117-122.
- 14.- Elharrif Z., Mégraud F. 1986. Characterization of Thermophylic *Campylobacter*: II Enzymatic Profiles. *Current Microbiol.* 13: 317-322.
- 15.- Hébert A., Hollis D., Weaver R. et al. 1982. 30 Years of *Campylobacters*: Biochemical Characteristics and a Biotyping Proposal for *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol.* 15: 1065-1073.
- 16.- Patton Charlott. Useful Method? in *C. jejuni* Current status and future trends, Edited by Irving Nachamkin, M.J. Blaser and Lucy Tompkins. ASM 1992, Washington D.C.
- 17.- Roop II M., Martin R., Smibert R. et al. 1984. Improved Biotyping Schemes for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Clin Microbiol.* 20: 990-992.
- 18.- Skirrow M., Benjamin J. 1980. Differentiation of Enteropathogenic *Campylobacter*. *J Clin Pathol.* 33: 1112.
- 19.- Skirrow M., Benjamin J. 1980. "1001" *Campylobacters*: Cultural Characteristics of Intestinal *Campylobacter* from Man and Animals. *J Hyg.* 45: 427-442.
- 20.- Harvey S. 1980. Hippurate Hydrolysis by *Campylobacter fetus*. *J Clin Microbiol.* 11: 435-437.
- 21.- Paik G. Reagents, strains and miscellaneous test procedures In: Lennette EH, Balows A. Hausler WJ. eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 3rd ed. Washington D.C.:

American Society for Microbiology. 1980: 1000-23

22.- Luechtefeld N., Lou W. 1982. Hippurate Hydrolysis by and Triphenyl Tetrazolium Tolerance of *Campylobacter fetus*. 15: 137-140.

23.- On S.L.W and Holmes B. 1991. Effect of Inoculum Size on the Phenotypic Characterization of *Campylobacter* Species. *J Clin Microbiol.* 29: 923-926.

