



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

AISLAMIENTO Y MECANISMOS DE PATOGENISIDAD DE
Campylobacter jejuni, AISLADO DE PACIENTES DE UN
HOSPITAL PEDIATRICO

T E S I S

Que para obtener el título de:

Químico Farmacéutico Biólogo

p r e s e n t a

BERNARDO LOPEZ MEDINA

México, D. F.

1989

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 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.

INDICE

INTRODUCCION

OBJETIVOS

1. GENERALIDADES	1
1.1. TAXONOMIA	1
1.2. IMPORTANCIA CLINICA	2
1.2.1. MANIFESTACIONES CLINICAS	3
1.3. DESCRIPCION GENERAL	4
1.4. MEDIOS DE CULTIVO	5
1.5. REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES Y DE OXIGENO	6
1.6. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION	8
1.6.1. RESERVORIOS	8
1.6.2. RECOLECCION DE LA MUESTRA	9
1.6.3. INOCULACION DEL MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO	9
1.6.4. EXAMEN DE LA PLACA	10
1.7. IDENTIFICACION BIOQUIMICA	11
1.8. BIOTIPIFICACION	12
1.9. SEROLOGIA	14
1.10. SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS	15
1.11. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD	16
1.11.1. MODELOS EXPERIMENTALES.	20
2. PARTE EXPERIMENTAL	21
2.1. MATERIAL	21
2.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO	21
2.1.2. MATERIAL DE VIDRIO Y EQUIPO	21
2.1.3. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS	22
2.1.3.1. AISLAMIENTO	22

2.1.3.2. IDENTIFICACION BIOQUIMICA	22
2.1.3.3. BIOTIPIFICACION	23
2.1.3.4. SEROLOGIA	23
2.1.3.5. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD	24
2.1.3.6. CONSERVACION DE CEPAS	24
2.1.3.7. COLORANTES Y SOLVENTES	24
2.2. METODOLOGIA	25
2.2.1. AISLAMIENTO	25
2.2.1.1 DE <u>C. jejuni</u> y <u>C. coli</u>	25
2.2.1.2. DE LA FAMILIA <u>Enterobacteriaceae</u> Y <u>Pseudomonas sp.</u>	25
2.2.2. EXAMEN DE LA PLACA	25
2.2.3. IDENTIFICACION PRESUNTIVA	27
2.2.4. IDENTIFICACION BIOQUIMICA	27
2.2.4.1. DE <u>C. jejuni</u> y <u>C. coli</u>	27
2.2.4.2. DE LA FAMILIA <u>Enterobacteriaceae</u> y <u>Pseudomonas sp.</u>	27
2.2.5. BIOTIPIFICACION	29
2.2.6. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD	29
2.2.6.1. ADHERENCIA A CELULAS HeLa Y Hep-2	29
2.2.6.2. INVASIVIDAD A CELULAS HeLa Y Hep-2	30
3. RESULTADOS	32
4. ANALISIS DE RESULTADOS	55
5. CONCLUSIONES	61
ANEXOS	62
6. BIBLIOGRAFIA	67

OBJETIVOS

- 1.- DETERMINAR LA PRESENCIA DE Campylobacter jejuni EN HECES OBTENIDAS -
DE NIÑOS.
- 2.- IDENTIFICAR BIOQUIMICAMENTE Y DETERMINAR EL BIOTIPO PREDOMINANTE ---
DE LAS CEPAS AISLADAS.
- 3.- DETERMINAR LA FRECUENCIA DE Campylobacter jejuni CON RESPECTO A ---
OTROS PATOGENOS ENTERICOS.
- 4.- ESTUDIAR LOS MECANISMOS DE ADHERENCIA E INVASIVIDAD DE LAS CEPAS ---
AISLADAS EN BASE A UN MODELO EXPERIMENTAL.

INTRODUCCION

A finales de la década de los 50's, los estudios de Elizabeth King acerca de las infecciones por V. fetus, hicieron sospechar que otra bacteria semejante a este Vibrio también atacaba al hombre aunque el cuadro clínico era diferente, las manifestaciones predominantes eran diarrea y gastroenteritis. -- Una vez establecido el género Campylobacter, esta nueva bacteria recibió el nombre de Campylobacter jejuni. De igual forma se estableció que las especies C. coli y C. lariidis eran causantes de diarreas, aunque aparentemente en menor frecuencia.

Las infecciones por C. jejuni tienen un período de incubación que generalmente varía entre uno y siete días, tanto el período de incubación como la -- gravedad del padecimiento dependen de la magnitud de la dosis infecciosa ingerida, así como de la virulencia del microorganismo y la resistencia específica del huésped.

La dificultad en el aislamiento e identificación de las diferentes especies de Campylobacter, ya que son microorganismos de crecimiento lento, que -- además requieren de medios de cultivo y condiciones especiales de incubación, retardaron el estudio de su epidemiología y patogénesis. En la actualidad este problema se ha superado, lo cual ha permitido demostrar que C. jejuni -- representa una de las causas de diarrea más importantes tanto en los países -- industrializados como en los del Tercer Mundo. En estudios recientes se ha -- considerado a C. jejuni como uno de los principales patógenos entéricos en -- humanos, aislado tan frecuente como Salmonella o Shigella, particularmente en niños.

Debido a que México está catalogado como un país con alto índice de mortalidad y morbilidad, causados por las infecciones intestinales, es de vital

interés determinar la frecuencia de C. jejuni, como causante de enfermedades entéricas entre la población infantil de nuestro país.

1.- GENERALIDADES.

1.1. TAXONOMIA

La especie Campylobacter fetus (Vibrio fetus), se conoció entre los veterinarios como el agente causal de abortos infecciosos del ganado y de las ovejas, otros miembros del género se asociaron con enfermedades de animales domésticos, incluyendo la enteritis en cachorros de perros, gatos, cerdos, - etc.

King fué la primera en estudiar a fondo las cepas de Campylobacter aisladas de humanos, observó que algunas de estas formaban el grupo clásico, -- otras formaban uno similar, pero se distinguían de las del grupo clásico -- por crecer a una temperatura poco usual. Todas las cepas asociadas a enteritis aguda crecían entre 42 y 43°C, por lo que las llamó "vibrios relacionados" [37].

El término Campylobacter (del griego, bacilo curvo), fué propuesto por Sebald y Veron en 1963 como un nombre genérico para nombrar a los vibrios -- microaerófilos y diferenciarlos del grupo del cólera clásico.

La taxonomía de estos Campylobacter termófilos, se basó en un número limitado de características fenotípicas, que causaron gran controversia.

Veron y Chatelain consideraron en un principio dos especies, Campylobacter jejuni y Campylobacter coli. En la 9ª edición del Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey [39], Smibert incluyó, a estas especies en -- una sola subespecie clasificándola como Campylobacter fetus subsp. jejuni. En las Listas Aprobadas de Nombres de Bacterias, Skerman adoptó la nomenclatura de Veron y Chatelain. Más recientemente Skirrow y Benjamin, propusieron que el grupo se dividiera en C. jejuni biotipo 1, C. jejuni biotipo 2, C. coli y Campylobacter termófilos resistentes al ácido nalidíxico (NARTC), de acuerdo a su sensibilidad a este ácido [37].

De acuerdo a la clasificación de Veron y Chatelain, se establece que el microorganismo en estudio se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera:

FAMILIA: Spirilaceae

GENERO : Campylobacter

ESPECIE: jejuni

C. jejuni, inicialmente conocido como V. fetus, se clasificó dentro de la familia Vibrionaceae, debido a su morfología. Aunque el género Campylobacter se diferencia del género Vibrio, en base a que las especies del género -- Vibrio tienen un contenido de G + C de 46 a 47 mol%, son anaerobios facultativos y fermentadores con producción de ácidos como productos finales. Sin embargo, los miembros del género Campylobacter son microaerófilos, no fermentan ni oxidan carbohidratos y su composición de G + C es de 30 a 35 mol% [38, 39].

1.2. IMPORTANCIA CLINICA.

Recientemente se ha identificado a C. jejuni como un importante agente patógeno, causante de enfermedades entéricas en el humano, se le ha asociado con abortos en el ganado y como patógeno entérico en los animales domésticos.

Además de los padecimientos entéricos asociados a C. jejuni, se le ha relacionado con meningitis, colecistitis, infecciones de las vías urinarias, artritis séptica, abortos e inclusive con el síndrome de Reiter [28,38, 42].

C. jejuni infecta a la gente de cualquier edad, pero es más frecuente -- diagnosticarlo en niños que en adultos. Las personas debilitadas o inmunosuprimidas son las más comúnmente infectadas, se establece en el tracto intestinal del hombre, aves, perros, gatos, borregos y del ganado en general, pero puede ser flora normal del tracto intestinal de animales jóvenes.

El aislamiento de C. jejuni es equivalente al número de aislamientos de

Salmonella pero excede a los de Shigella [3,5,41]

La transmisión es a través de alimentos, generalmente de origen animal, como son: la leche cruda, mal hervida o no pasteurizada, o bien por agua -- contaminada. Aunque se ha demostrado la transmisión directa de hombre a hombre por vía fecal-oral, aparentemente la inmensa mayoría de estas infecciones, en particular los brotes epidémicos, se originan gracias al consumo de leche cruda, carne mal cocida de pollo u otros animales, etc.

Estudios recientes han demostrado que C. jejuni se distribuye mundialmente, pero es más frecuente aislarlo de países subdesarrollados que de países - industrializados, su incidencia estacional es más elevada en verano y otoño - que en invierno y primavera [3,4,16,]

1.2.1. MANIFESTACIONES CLINICAS.

C. jejuni se localiza generalmente en el yeyuno. Una vez establecido el microorganismo en el tracto intestinal humano, el período de incubación es -- variable, pero generalmente es de uno a siete días y la diarrea es el rasgo - más característico de la enfermedad, aunque también se presentan dolor abdominal, fiebre y en algunas ocasiones náuseas y vómito.

La presencia de sangre en las heces es generalmente después de dos a cuatro días de haberse iniciado el padecimiento. La duración total de la enfermedad es de menos de una semana, pero la excreción del microorganismo puede - durar de dos semanas a tres meses en pacientes que no son tratados con anti-- bióticos.

No todas las personas expuestas a C. jejuni desarrollan la enfermedad, - ya que se tienen que considerar la susceptibilidad del individuo al microorga-- nismo o bien la relativa virulencia de la cepa.

Estudios epidemiológicos recientes han mostrado que se necesitan alrede-- dor de 500 a 1 000 000 de bacterias para iniciar la enfermedad [41,42].

1.3. DESCRIPCION GENERAL.

El género Campylobacter incluye bacterias curvas o espiriladas Gram-negativas que miden 0.2 - 0.5 μ m de ancho por 0.5 - 5 μ m de largo. Los bacilos tienen una apariencia de "s" o de alas de gaviota cuando dos o más células forman cadenas cortas, no son esporulados, crecen en medios de pH alcalino (pH 8.5 - 9.0). Las células de cultivos viejos o cuando las condiciones no son favorables se presentan en forma coccide o esférica.

Las células presentan una membrana polar multilaminar en ambos extremos y se localiza debajo de la membrana citoplasmática, los extremos de la célula son generalmente puntiagudos, son móviles, con un movimiento característico de "sacacorchos" debido a un flagelo polar localizado en uno o ambos extremos de la célula, aunque ocasionalmente se han descrito cepas inmóviles [42]. El flagelo puede medir de dos a tres veces el tamaño de la célula.

Son microaerófilos, requieren de una concentración de oxígeno entre 3 a 15% y una concentración de 3 a 5% de CO₂. Ocasionalmente se han descrito cepas capaces de crecer bajo condiciones aerobias (20% O₂). Algunas especies sólo crecen en condiciones anaerobias, en presencia de formato y fumarato o bien oxígeno y fumarato en el medio de cultivo.

Son quimiorganótrofos, no fermentan ni oxidan azúcares, no son productores de ácidos. La energía generalmente la obtienen a partir de aminoácidos -glutamato y aspartato- o bien de intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y no de carbohidratos. La gelatina y la urea no son hidrolizados. Son rojo de metilo y Vogel-Proskauer negativos, no son productores de pigmentos, ni tienen actividad de lipasa.

Tienen actividad de oxidasa, superoxidasa-dismutasa y algunas especies son catalasa positiva. Las especies C. fetus, C. jejuni y C. coli son catalasa positivas y son las especies asociadas a enfermedades en el hombre y animal.

les [2,18,19,33].

La mayoría de los miembros del género Campylobacter crecen entre 25 - 37°C, pero solo C. jejuni y C. coli se aíslan a temperaturas entre 42 - 43°C pero no a 25°C.

1.4. MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios de cultivo selectivos más ampliamente usados para el aislamiento de C. jejuni y C. coli a partir de materia fecal, se componen básicamente de un medio base, sangre y una mezcla de antibióticos. Varios investigadores han usado diferentes medios basales, Skirrow empleó para su medio el Agar Base de Sangre Nº 2 y lo adicionó con 5 - 7% de sangre lisada de caballo, vancomicina (10 mg/l), polimixina (2 500 U/l) y trimetoprim (5 mg/l). Butzler empleó el Agar Tioglicolato y lo adicionó con 15% de sangre desfibrada de carnero, bacitracina (2 500 U/l), cicloheximida (50 mg/l), sulfato de colistin (10 000 U/l), cefazolina (15 mg/l) y novobiocina (5 mg/l). Blaser — empleó la base de Agar Brucella y le agregó 10% de sangre desfibrada de carnero, vancomicina (10 mg/l), trimetoprim (5 mg/l), polimixina B (2 mg/l). Lander y Gil emplearon como medio selectivo y de enriquecimiento el Caldo Infusión de Carne de Ternera adicionado de 7% de sangre lisada de caballo y finalmente Preston utilizó el Caldo Nutritivo Nº 2 solidificado con Agar Nueva Zelanda, adicionado de 5% de sangre lisada de caballo. [2,7,8,17,28,31,38,39].

El medio más ampliamente utilizado es el formulado por Blaser, conocido también como Campy-BAP. Este autor desarrolló también un método de enriquecimiento frío, el medio base empleado es el Caldo de Tioglicolato, el cual se complementa con la mezcla de antibiótico antes mencionada, el medio se conoce como Caldo Campy-thio, cuyo uso se ha descrito ampliamente [34,36,43].

Comúnmente, estos medios de cultivo presentan el problema de crecimiento de bacterias contaminantes, lo cual resulta perjudicial para el aislamiento —

de C. jejuni y C. coli. Los contaminantes aislados con mayor frecuencia son - los miembros de la familia Enterobacteriaceae, Pseudomonas sp. , Streptococcus sp. , y algunas levaduras.

El uso de la sangre en estos medios de cultivo representa ciertas desventajas, es muy fácil que se contamine, es cara, difícil de conseguir y además de que se le desconoce su función exacta en los medios de cultivo, lo que ha llevado a desarrollar medios de cultivo libres de sangre.

Bolton desarrolló un medio de cultivo selectivo para Campylobacter, en el que sustituyó a la sangre por una mezcla de compuestos que fueron: sulfato ferroso y piruvato de sodio (CFP), lo que demostró ser un excelente sustituto de la sangre, ya que desarrollaron en él la mayoría de las cepas de Campylobacter probadas. Al medio base se le adicionó cefaperazona, un antibiótico -- que teóricamente es un eficiente supresor de los miembros de la familia Enterobacteriaceae y Pseudomonas [23].

Reportes recientes han descrito un nuevo suplemento, que es una mezcla - de sulfato ferroso, metabisulfito de sodio y piruvato de sodio (FBP). Cuando se adiciona al Agar Brucella, eleva la aerotolerancia y el crecimiento de --- Campylobacter [8,11,23].

1.5. REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES Y DE OXIGENO.

Los requerimientos nutricionales de C. jejuni pueden resumirse en los siguientes aspectos: no oxida, fermenta carbohidratos, fosforila, no transporta glucosa; oxida al citrato, cis aconitato, isocitrato, alfa-cetoglutarato, succinato, fumarato, malato y oxalacetato. Presenta un metabolismo respiratorio, su energía para el crecimiento proviene del ciclo del ácido tricarbóxico y de algunos aminoácidos tales como el glutamato y el aspartato que son deaminados en alfa-cetoglutarato y oxalacetato. Crece en un medio definido de aminoácidos y vitaminas [2,38].

La mayoría de las cepas de Campylobacter crecen en una concentración de 3 - 15% de O_2 y de 3 - 5% de CO_2 . C. jejuni utiliza al oxígeno como un aceptor final de electrones y al H_2 como un donador de electrones.

La naturaleza microaerofílica de C. jejuni parecía ser incompatible con el padecimiento de la enteritis. Sin embargo, se estableció que el lumen intestinal, es altamente anaerobio, lo cual podría ser un medio hostil para un microorganismo que depende del oxígeno para su metabolismo respiratorio. Aunque probablemente C. jejuni se multiplica en la mucosa intestinal, puede tener acceso al O_2 , ya que éste lo suministran las células del tejido de la mucosa y el H_2 lo produce la flora anaerobia del intestino. Como C. jejuni tiene actividad de hidrogenasa, el H_2 puede servir como una fuente excelente de energía para la respiración durante la patogénesis [24]

La producción de oxígeno durante el metabolismo celular o durante la autooxidación u oxidación fotoquímica en el medio ambiente, genera una variedad de derivados tóxicos de hidrógeno. Estos derivados tóxicos se generan en los medios de cultivo cuando se exponen a la luz y al O_2 produciéndose radicales de alta energía, tales como superóxidos y peróxidos por reducción fotoquímica del medio, estos radicales inhiben el crecimiento de C. jejuni en el medio de cultivo; o bien pueden producirse por los microorganismos y secretarse al mismo medio de cultivo.

Los microorganismos han desarrollado varias enzimas defensivas para protegerse de los derivados tóxicos. Las enzimas que destruyen al H_2O_2 son la catalasa y peroxidasa, la superóxido-dismutasa destruye a los radicales superóxidos (O_2^-) [20].

Otras sustancias como el manitol y la histidina pueden reprimir la formación de los radicales hidroxilo (OH^-). La combinación de estos agentes en los medios de cultivo aumentan la aerotolerancia de la bacteria.

Cuando al Agar Brucella se le adiciona el suplemento (FBP), - no sólo se previene la toxicidad del medio ambiente contra Campylobacter jejuni, sino que se aumenta también la aerotolerancia al --- oxígeno, cuando el microorganismo se inocula en el medio de cultivo. Esto se debe a la acción conjunta del hierro y del metabisulfito, que actúan en una forma no enzimática destruyendo a los radicales superóxidos, por otro lado el piruvato destruye al peróxido de hidrógeno presente en el medio de cultivo. La toxicidad de los nutrientes del agar la previenen el sulfato ferroso y el piruvato, y más efectivamente la sangre de caballo.

1.6 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION.

1.6.1 RESERVORIOS.

Se ha demostrado que Campylobacter jejuni puede multiplicarse - en bilis humana a 37 °C y sobrevivir en ella durante 2 meses, lo mismo se ha demostrado en medios ácidos con pH mayores de 3.6.

Campylobacter jejuni sobrevive en heces, leche, agua y orina --- conservados a 4 °C, siendo que esta bacteria estuvo en medios a -- 25 °C. La viabilidad máxima se observó a 4 °C durante 3 semanas en las heces y la leche, 4 semanas en el agua y 5 semanas en la orina. Esto sugiere que cuando C. jejuni contamina estos medios, funcionan como - reservorios.

Las infecciones por C. jejuni son en realidad una zoonosis, ya que los reservorios principales están constituidos por diversas especies de animales domésticos, como pollos, pavos, bovinos, etc. Aunque estos no es

tán bien delimitados, se sugiere que los cachorros de animales domésticos - pueden ser los vectores para la infección humana, especialmente las crías -- con diarrea que son las más frecuentemente infectadas por esta bacteria.

Los individuos que padecen de enteritis causada por Campylobacter y que no se han tratado, pueden excretar al microorganismo en sus heces durante va rias semanas. Estos individuos representan un reservorio y una vía de transmisión para el mismo hombre.

Aunque C. jejuni se ha aislado de la vagina esto no indica que sea flora normal de ella, pero sí representa una vía de transmisión de la vagina ma terna al feto, aunque es poco probable que sea una forma común de infección humana [4,6].

1.6.2. RECOLECCION DE LA MUESTRA.

Las muestras tomadas con hisopos del recto, se recolectan de pacientes preferentemente con diarrea, ya que excretan a C. jejuni por medio de éstas. Se recomienda que los especímenes se inoculen en el medio selectivo lo más - pronto posible, o por lo menos antes de las 2 horas de haberse tomado las -- muestras, de no ser posible se recomienda el uso de medios de transporte [34, 36,43].

El transporte y almacenamiento de las muestras no son generalmente un -- problema, pues se ha demostrado que este microorganismo permanece viable en - las heces a temperatura ambiente durante 3 días y por lo menos durante 3 se manas a 4°C.

1.6.3. INOCULACION DEL MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO.

El medio puede inocularse directamente con las muestras tomadas del --- recto con hisopos o bien con las muestras fecales sobre el medio selectivo Campy-BAP. Las muestras diarreicas se inoculan con 3 a 5 gotas sobre el me-- dio de cultivo, se estrían para aislamiento e incuban. En las muestras sólido-

das se usa un hisopo para tomar muestras de toda el área de las heces y, si se presentan, de las áreas con moco y/o sangre, se estrían para aislamiento y se incuban.

Las cajas inoculadas se incuban entre 42 - 43°C durante 24 a 48 horas, en una atmósfera de microaerofilia.

La alta temperatura empleada para el aislamiento de C. jejuni, inhibe el desarrollo de la flora normal, pero favorece el crecimiento de los Campylobacter termófilos.

Las condiciones atmosféricas para el crecimiento de C. jejuni se pueden obtener por diversos métodos. En la actualidad las jarras de anaerobiosis son los sistemas más utilizados, ya que son excelentes métodos en los cuales se logran las condiciones microaerofilas necesarias para el aislamiento de diversos microorganismos del tipo de C. jejuni. Otro sistema utilizado ampliamente para el mismo propósito, es el de la jarra con vela. Este sistema provee de una atmósfera que contiene aproximadamente 17 a 19% de O₂ y de 2 a 3% de CO₂. Aunque esta atmósfera no es ideal para el crecimiento de algunas cepas de Campylobacter, se usa para el aislamiento de C. jejuni. Algunos investigadores han demostrado que cuando la jarra con vela se incubaba entre 42 - 43°C, la atmósfera que se produce es adecuada para el aislamiento de C. jejuni, pero esto no sucede cuando se incubaba a 37°C ya que el aislamiento decrece [25,28,44].

Aunque existen otros métodos comerciales que permiten obtener las condiciones atmosféricas óptimas para el crecimiento de esta bacteria, éstos deben de ser seleccionados en base al tamaño, cantidad de trabajo y presupuesto de cada laboratorio.

1.6.4. EXAMEN DE LA PLACA.

El examen de la placa se recomienda que se efectúe a las 24, 48 y 72 ho-

ras, aunque es aconsejable que se realice únicamente a las 48 y 72 horas.

Las colonias de C. jejuni son no hemolíticas, ligeramente anaranjadas a color marrón, planas con bordes irregulares y de aspecto húmedo o bien redondas, elevadas y de aspecto mucoso. Miden de 1 a 2 mm de diámetro y a veces se extienden a lo largo de la zona de aislamiento.

La identificación de las colonias sospechosas debe de hacerse en base a las siguientes pruebas: movilidad y morfología, por observación en microscopio de campo oscuro o contraste de fase, oxidasa y tinción de Gram; si la preparación de contraste muestra la característica movilidad de salto y/o si en la tinción de Gram se observan bacilos curvos Gram negativos y si la prueba de la oxidasa es positiva, se identifica presuntivamente a C. jejuni o C. coli.

1.7. IDENTIFICACION BIOQUIMICA.

Las especies de Campylobacter asociadas a las infecciones en humanos en base a sus características bioquímicas, se pueden dividir en grupos, de acuerdo a su temperatura de crecimiento, los Campylobacter termófilos que crecen óptimamente de 42 - 43°C pero que no lo hacen a 25°C son: C. jejuni, C. coli y C. laridis.

La resistencia al ácido nalidixico, se usa generalmente para distinguir a C. laridis de C. jejuni y C. coli. La única prueba que hay para distinguir a C. jejuni de C. coli es la prueba de hidrólisis del hipurato, éste último la da negativa, ya que no hidroliza al hipurato.

Las reacciones que identifican a C. jejuni se enlistan a continuación [2,26,28,39]:

CARACTERISTICA:

REACCION:

* Crecimiento:

25°C

CARACTERISTICA	REACCION:
37°C	+
42°C	+
1% de Glicina	+
1% de Bilis	+
3.5% de NaCl	-
* Reacción Bioquímica:	
Oxidasa	+
Catalasa	+
Glucosa	-
Reducción de Nitratos	+
Reducción de Nitritos	-
H ₂ S en TSI	-
H ₂ S en papel acetato	+
Hidrólisis del hipurato	+
* Otras pruebas:	
Resistencia al ácido nalidíxico	-
Resistencia a la cefalotina	+

1.8. BIOTIPIFICACION.

El creciente interés en las cepas de Campylobacter aisladas de humanos y consideradas como patógenas, ha mostrado la necesidad de realizar pruebas adicionales en los laboratorios clínicos que puedan usarse para diferenciar las. Dentro de este género C. jejuni es la especie aislada en mayor frecuencia y considerada como patógena para el humano, por lo que se ha visto la necesidad de tener un esquema de biotipos propio para este microorganismo.

Harvey observó que la mayoría de las cepas de C. jejuni hidrolizaban al

hipurato, mientras que las demás especies no lo hacían, él sugirió que las cepas hipurato negativas, representaban un biotipo diferente dentro de la especie. Smibert previamente había notado que algunas cepas de C. jejuni producían una fosfatasa alcalina, otras una aril-sulfatasa y algunas otras hidrolizaban el DNA. En base a la composición de grasas celulares de C. jejuni y otros Campylobacter, se estableció que C. jejuni contenía ácido ciclopropano C₁₉, el cual no estaba presente en otras especies. Herbert [19] propuso un esquema de biotipos, en base a dos de las pruebas antes mencionadas y adicionó la prueba de crecimiento en Agar Carbón y Levadura (CYE). Las pruebas bioquímicas, más prácticas y reproducibles para la diferenciación de las cepas de C. jejuni fueron: la hidrólisis del hipurato, del DNA y el crecimiento en Agar CYE, la combinación de los posibles resultados de estas pruebas dió origen al sistema de biotipos de Herbert, en el cual se establecen 8 biotipos para las cepas de C. jejuni (Tabla # 1).

Tabla # 1. ESQUEMAS DE BIOTIPOS PARA C. jejuni [19]

BIOTIPOS:								
PRUEBAS:	1	2	3	4	5	6	7	8
HIDROLISIS DEL HIPURATO	+	+	+	+	-	-	-	-
HIDROLISIS DEL DNA	+	+	-	-	+	+	-	-
CRECIMIENTO EN AGAR CYE	+	-	+	-	+	-	+	-

Skirrow y Benjamin propusieron un esquema de biotipos basado en la hi--

hidrólisis de hipurato y la prueba rápida de H_2S con la cual reconocen a C. jejuni como un microorganismo con capacidad para hidrolizar el hipurato y a C. coli como un microorganismo incapaz de hacerlo. La prueba rápida de H_2S originó la subdivisión de C. jejuni en 2 biotipos y fué también útil para distinguir un cuarto grupo el de los Campylobacter termófilos resistentes al ácido nalidíxico (NARTIC), para los cuales se propuso el nombre de C. laridis.

Recientemente el Centro de Control para las Enfermedades (C.D.C), propuso un esquema de biotipos basado en las pruebas de hidrólisis del hipurato, del DNA y la prueba rápida de H_2S , en la cual solo se diferencian 4 biotipos para C. jejuni, 2 para C. coli y 2 más para C. laridis (Tabla # 2).

Tabla # 2. ESQUEMA DE BIOTIPOS PARA C. jejuni, C. coli y C. laridis (NARTIC).

PRUEBAS:	BIOTIPOS:							
	<u>C. jejuni</u>				<u>C. coli</u>		<u>C. laridis</u>	
	I	II	III	IV	I	II	I	II
HIDROLISIS DEL HIPURATO	+	+	+	+	-	-	-	-
PRUEBA RAPIDA DE H_2S	-	-	+	+	-	-	-	+
HIDROLISIS DEL DNA	-	+	-	+	-	+	-	+

1.9. SEROLOGIA.

Los esquemas de serotipificación y los estudios serológicos involucran la identificación de antígenos comunes que puedan utilizarse en las pruebas diagnósticas y que determinen la presencia de microorganismos en las muestras biológicas y la presencia de anticuerpos en el suero de pacientes infectados.

Recientemente se han desarrollado diversos métodos para serotipificar las cepas de C. jejuni y C. coli, los métodos más comúnmente utilizados son - el método de Penner y el método de Lior. El primero se basa en la presencia de un antígeno termoes estable, la técnica para determinar este antígeno es una hemaglutinación pasiva [16,29,30]. El segundo método involucra a los antígenos termolábiles y la técnica empleada es una aglutinación y absorción de anticuerpos [21,27].

En el método de Penner no se requieren los anticuerpos absorbidos, siendo éste el más fácil de implementar, el método de Lior es simple de efectuar y da resultados más rápidos que el de Penner, éste último tiene el problema de que los cultivos reaccionan con múltiples antisueros; sin embargo, esto no sucede en el método de Lior. Ambos métodos son igualmente útiles para serotipificar las cepas de C. jejuni y C. coli en brotes epidémicos y de grupo.

El diagnóstico serológico se recomienda en los pacientes con cultivos negativos, en los casos de brotes en los que se aisle a C. jejuni en por lo menos uno de los pacientes involucrados en el brote [28].

No se recomienda el uso de técnicas serológicas en el diagnóstico de casos esporádicos de infecciones por Campylobacter, ya que no son prácticas, - debido a la antigenicidad heterogénea que presenta C. jejuni.

1.10. SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS.

Las pruebas in vitro de susceptibilidad antibiótica han mostrado que -- las cepas de C. jejuni probadas son susceptibles a: Cloramfenicol, Dihidroos treptomicina, Eritromicina, Neomicina, Oxitetraciclina, Estreptomicina, y Tetraciclina. Moderadamente susceptibles a Novobiocina, Penicilina, Bacitracina y Polimixina B.

Karmali estableció que C. jejuni es sensible a Eritromicina, Clindamicina, Tetraciclina, Metronidazol, Acido Nalidixico, Nitrofurantoina, Gentami

cina, Kanamicina, Novobiocina, Bacitracina, Vancomicina, Trimetoprim, Polimixina B, Ampicilina, Carbenicilina, Cloxacilina y Cefalosporina.

Se afirma que la Eritromicina es el agente preferido en el tratamiento de la campylobacteriasis, aunque se ha reportado entre un 8 y 10% de resistencia a esta droga en las cepas probadas de C. jejuni.

Se ha determinado que la Eritromicina puede ser sustituida en el tratamiento de la enteritis por Campylobacter, por otros antibióticos como son: - La Tetraciclina, Clindamicina, Gentamicina, derivados del Nitrofurano y Cloramfenicol, aunque ninguno de estos antibióticos se ha evaluado clínicamente [15,22].

1.11. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD.

En la actualidad, los conocimientos sobre la patogenicidad de C. jejuni son particularmente desconocidos, igualmente los mecanismos por los cuales este microorganismo produce la enteritis, no se han establecido claramente.

Clínicamente, las infecciones por C. jejuni pueden presentarse como diarreas agudas o bien como un síndrome disentérico y raramente como infecciones extraintestinales.

Recientemente Livene [42] clasificó a los patógenos entéricos en 5 grupos en base a los mecanismos por los cuales pueden producir el padecimiento.

Las características clínicas que presenta Campylobacter sp. son semejantes a las que presentan los patógenos agrupados en 3 de los grupos de Livene.

El primer tipo de mecanismo involucra la inducción de toxinas para producir la enfermedad, este grupo está representado clásicamente por V. cholerae. Estos microorganismos se adhieren a la mucosa en el intestino proximal y elaboran una toxina, resultando una diarrea. La producción de toxinas es un mecanismo propuesto en pacientes con diarrea aguda.

Ultimamente se ha demostrado la producción de una enterotoxina por C. -

jejuni (actualmente en discusión), lo cual propone un mecanismo en la patogénesis de esta bacteria.

El segundo tipo de mecanismo es aquél en el cual se describe la penetración y la proliferación en las células del epitelio intestinal, donde ocurre daño y muerte celular; sin embargo, la lesión es solo superficial, la adenitis mesentérica y la septicemia muy raramente ocurre.

El ileon terminal y el colon son los involucrados principalmente y la materia fecal contiene sangre y células inflamatorias.

En la enteritis por Campylobacter sp. existen evidencias clínicas de la invasión del epitelio intestinal, siendo éstas la diarrea con sangre y las células inflamatorias en las muestras.

En estudios recientes de Price, en pacientes con enteritis por C. jejuni las biopsias rectales demostraron que las lesiones consistían en infiltrados inflamatorios en la lámina propia y abscesos similares en las criptas. Esto mismo se ha observado en las infecciones por Shigella y Salmonella.

El tercer mecanismo llamado "translocación", está representado por Salmonella sp. y Yersinia sp. En la translocación, el microorganismo penetra la mucosa del intestino ocasionando un daño mínimo con proliferación en la lámina propia y en los nódulos mesentéricos. La presencia de C. jejuni en los nódulos mesentéricos se ha descrito clínicamente en diferentes artículos [42].

C. jejuni se transloca a los nódulos mesentéricos indicando que la translocación es un mecanismo por el cual esta bacteria causa la enfermedad, en la que se presenta una diarrea franca.

En la actualidad uno de los aspectos poco conocidos de la virulencia de C. jejuni, es la naturaleza de la interacción entre este microorganismo y las células intestinales. Estudios in vitro han demostrado que C. jejuni puede adherirse a los enterocitos y posteriormente invadirlos [13,14,35].

Klisterin demostró la invasividad de las cepas de C. jejuni (las cuales inducen a una diarrea con sangre). Así, la naturaleza de la interacción entre Campylobacter sp. y los enterocitos no se ha aclarado todavía.

Hasta donde se sabe, C. jejuni carece de fimbrias, pero posee otras adhesinas. Una variedad de estudios con líneas celulares, particularmente con células HeLa e INT 407, han demostrado in vitro la adherencia de este microorganismo.

Numerosas sustancias y tratamientos pueden interferir con la adherencia de C. jejuni a las células INT 407. Mc Bride y Mewel observaron una inhibición de la adherencia al usar glucosa, galactosa, manosa, N-acetil glucosamina, N-acetil galactosamina y sorbitol. Mc Seweeagan y Walker redujeron la adherencia de C. jejuni a las células INT 407 en por lo menos 50%, al usar D-manoza, D(-) fucosa, 2.5 de glutaraldehído y enzimas proteolíticas [42].

Se ha detectado que el flagelo posee la mayoría de las adhesinas para las células epiteliales. En cepas que carecen de flagelo, se ha observado una pobre adherencia a las células INT 407, lo cual sugiere la presencia de adhesinas en el flagelo, como se ha observado en V. cholerae.

El calentamiento a 100°C durante 30 minutos no modifica la adherencia de C. jejuni, lo cual sugiere la presencia de una determinante, de una proteína-flagelar termolábil, o bien de una cubierta de adhesinas.

Otras estructuras de superficie de C. jejuni que pueden ser importantes en la adherencia al epitelio son las proteínas de la membrana externa (OMPS), los lipopolisacáridos (LPS) y el glicocálix.

Los estudios sobre las estructuras de Campylobacter a nivel molecular, se han enfocado a las estructuras de superficie de la célula, debido a que en las bacterias patógenas esta superficie es la que interacciona directamente con el hospedero. Esta estructura es la que permite al patógeno e--

uitar o vencer los mecanismos de defensa del huésped. Acerca de esta estructura, tentativamente se ha detectado una lámina-S sobre la superficie de C. jejuni, de la cual no hay información suficiente, pero se ha observado que esta misma lámina-S está presente en las cepas de C. fetus, la cual posee una actividad antifagocítica, juega un papel importante en la patogénesis de las infecciones por C. fetus. Esta proteína de superficie, aparece comúnmente en muchas cepas de C. jejuni que pertenecen a una variedad de serotipos termolábiles. La forma de la estructura de este antígeno común todavía no se conoce.

Otro antígeno de superficie, es la OMP, esta proteína de Mr ca 45 000, se parece a las porinas, la cual está asociada a un peptidoglicano. Esta proteína probablemente juega un papel importante en el metabolismo y crecimiento de las células de Campylobacter, pero su función no se ha establecido claramente, no hay evidencias de que intervenga en la patogénesis.

Los lipopolisacáridos de C. jejuni, son predominantemente de bajo Mr, al igual que se encuentran en otros patógenos como Neisseria, Haemophilus y Bordetella sp. En contraste con estas bacterias en las cuales los LPS de bajo Mr confieren solo unos pocos serotipos, los LPS de C. jejuni presentan gran diversidad antigénica, confiriendo diversos serotipos. El papel de estos LPS en la patogénesis de C. jejuni no se ha aclarado.[42].

La movilidad de C. jejuni se debe a uno o más flagelos, constituidos de un filamento de 20 nm de diámetro, un gancho, un cuerpo basal y un gran disco asociado con la región final del gancho y cubierta por el cuerpo basal. El flagelo es de naturaleza proteica y es una importante superficie antigénica.

La mucosa intestinal es la barrera más importante contra la invasión de los microorganismos entéricos, pero la movilidad típica que presenta C. jejuni le facilita la invasión a las células intestinales. Su capacidad invasiva queda demostrada por las manifestaciones clínicas que presentan la mayoría de

Los pacientes que son: sangre, moco y leucocitos en las heces[42].

1.11.1 MODELOS EXPERIMENTALES.

El mecanismo por el cual C. jejuni causa enteritis, no se ha establecido posiblemente por la falta de un modelo experimental adecuado.

Inicialmente los modelos experimentales estándares usados con otros enteopatógenos, se establecieron como negativos para C. jejuni. Por ejemplo, la prueba de Sereny los investigadores la reportaron como negativa para todas las cepas de Campylobacter probadas, trabajos recientes en este aspecto, recomiendan usar nuevos modelos de animales que puedan usarse para el estudio de este patógeno.

Newell ha experimentado en una variedad de especies de animales, estableciendo procedimientos para el estudio de C. jejuni. Pero la mayoría de estos modelos son engorrosos (p.e. el utilizar al ganado), caros como el emplear a los monos rhesus y son imprácticos para su uso en la mayoría de los laboratorios. Aunque la ventaja que presentan algunos de ellos, radica en que la enteritis causada en humanos, se puede reproducir muy similarmente en estos animales de experimentación [9,42].

Los cultivos in vitro, tales como los cultivos de células son más simples, reproducibles y fáciles de monitorear. Las condiciones de estos modelos son lo más cercanas al fenómeno y sus resultados concuerdan con la virulencia de la bacteria. Entre los cultivos de las células que se han utilizado destacan las células de carcinoma cervical humano (HeLa), las células diploides de pulmón (MRC-5), las células INT y las células de carcinoma de laringe humano (Hep-2).[13].

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. MATERIAL.

2.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

Se emplearon muestras de materia fecal de pacientes que durante los meses de noviembre de 1986 a octubre de 1987 se enviaron al Laboratorio de Bacteriología Clínica del Instituto Nacional de Pediatría (I.N.P.), para la búsqueda de Campylobacter jejuni.

Las cepas estudiadas de C. jejuni y C. coli fueron las que se aislaron de las muestras de materia fecal procesadas.

La cepa control de C. jejuni la proporcionó el Departamento de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"

Las cepas controles de E. coli K 88, J 53 y de S. flexneri las proporcionó el Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Ecología Humana de la Fac. de Medicina U.N.A.M.

Las líneas celulares HeLa y Hep-2 las proporcionó el laboratorio de Virología del Hospital Infantil "Federico Gómez".

2.1.2 MATERIAL DE VIDRIO Y EQUIPO.

Cajas petri de 100 X 15	(Pyrex)
Matraz erlenmeyer de 125 ml	(Pyrex)
Matraz erlenmeyer de 250 ml	(Pyrex)
Matraz erlenmeyer de 500 ml	(Pyrex)
Pipetas serológicas de 1 ml	(Pyrex)
Pipetas serológicas de 5 ml	(Pyrex)
Pipetas serológicas de 10 ml	(Pyrex)
Portaobjetos	(Madesa)
Tubos de ensaye de 10 X 75	(Pyrex)
Tubos de ensaye de 13 X 100	(Pyrex)

Tubos de ensaye de 16 X 150	(Pyrex)
Tubos con tapón de rosca de 13 X 100	(Pyrex)
Equipo:	
Asa bacteriológica	(F.N.)
Balanza granataria	(Ohaus)
Cámara para cultivo de tejidos	(Limbro)
Centrífuga	(Sol-Bat)
Congelador Industrial	(American)
Estufas para cultivo (rango de 0 a 80°C)	(Memmert)
Gradillas	(F.N.)
Mechero Bunsen	(F.N.)
Microscopio Junior 2 modelo K-4	(Carl Zeiss)
Microscopio Standar K-7	(Carl Zeiss)
Refrigerador Industrial	(Rheem-Revco)
2.1.3. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.	
2.1.3.1. AISLAMIENTO.	
Agar Selectivo para Campylobacter (base)	(Merck)
Suplemento Selectivo para Campylobacter	(Merck)
Anaerocult C	(Merck)
Agar de MacConkey	(Merck)
Agar para Salmonella y Shigella (SS)	(Merck)
Agar Verde Brillante	(Merck)
Agar XLD	(Merck)
Base de Caldo Tetracionato	(Merck)
Caldo Selenito de Sodio	(Merck)
2.1.3.2 IDENTIFICACION BIOQUIMICA.	
Agar Selectivo para Campylobacter (base)	(Merck)

Suplemento Selectivo para Campylobacter	(Merck)
Agar de Hierro Kligler	(Bioxón)
Infusión Cerebro Corazón	(Bioxón)
Agar Citrato de Simmons	(Bioxón)
Medio SIM	(Bioxón)
Bilis de Cerdo	
Cloruro de Sodio	(Merck)
Acido Hipúrico (sal de sodio)	(Sigma)
Ninhidrina	(Sigma)
N-N-Dimetil p-fenilendiamina grado II	(Merck)
2.1.3.3. BIOTIPIFICACION.	
Agar para prueba D-Nasa (Desoxirribonucleasa)	(Bioxón)
Agar Mueller Hinton	(Merck)
Caldo Brucella	(Gibco)
Agar Bacteriológico	(Bioxón)
Fosfato Dibásico de Sodio (anh)	(Merck)
Fosfato Monobásico de Potasio (anh)	(Merck)
Metabisulfito de Sodio	(M.Ch.W)
Sulfato ferroso 7H ₂ O	(Merck)
Piruvato de Sodio	(Sigma)
2.1.3.4 SEROLOGIA.	
Solución de Acriflavina	
Solución Salina Isotónica al 0.85%	
Equipo de sueros para la tipificación bacteriana, Serobac	(Bigaux)
Equipo de sueros anti coli para prueba anti-O y anti-OK [B,L]	(Behring)

2.1.3.5. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD.

Agar Selectivo para Campylobacter (base)	(Merck)
Suplemento Selectivo para Campylobacter	(Merck)
Caldo Brucella	(Gibco)
Medio Mínimo Esencial de Eagle	(In Vitro)
Desoxicolato de Sodio	(Merck)
Gentamicina	(Scheramex)

2.1.3.6. CONSERVACION DE CEPAS.

Infusión Cerebro Corazón	(Merck)
Glicerol	(Merck)

2.1.3.7. COLORANTES Y SOLVENTES

Safranina	(Sigma)
Verde de Metilo	(Sigma)
Giemsa	(Sigma)
Butanol	(Merck)
Acetona	(Merck)
Metanol	(Merck)

2.2. METODOLOGIA.

2.2.1. AISLAMIENTO.

2.2.1.1. DE C. jejuni y C. coli.

Las muestras de materia fecal remitidas al laboratorio, se procesaron siguiendo la técnica que a continuación se describe (Esquema # 1).

Las placas de Campy-BAP se inocularon con las muestras de materia fecal, las que se diseminaban por estría sobre la superficie de los medios, se incubaron a 42°C durante 48 horas (siendo éstos, la temperatura y tiempo recomendados para el primoisolamiento), en condiciones de microaerofilia, la cual se logró por medio del uso de la jarra con vela, o bien con el sistema comercial Anaerocult C.

Para los subcultivos de C. jejuni y C. coli, bastó con incubarlos a 37°C durante 24 horas, en condiciones de microaerofilia.

2.2.1.2. De la familia Enterobacteriaceae y Pseudomonas sp.

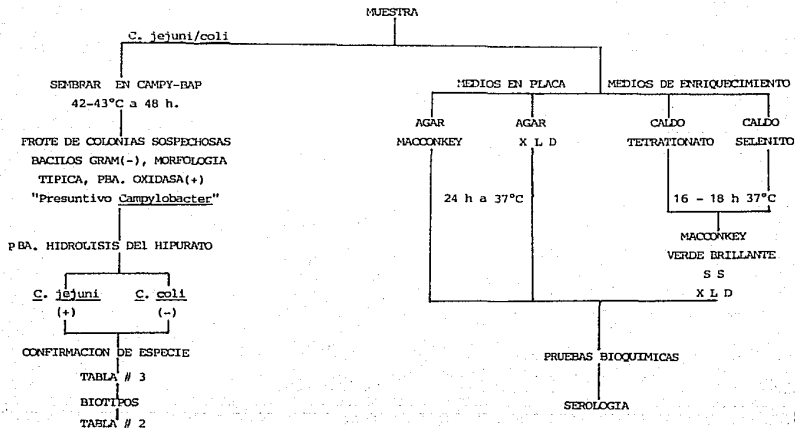
Simultáneamente, las muestras de materia fecal se sembraron en los medios entéricos tradicionales (Agar MacConkey y Agar XLD) para la siembra directa, así como en los Caldos Tetrationato y Selenito, las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas, mientras que los medios líquidos se incubaron a 37°C durante 16 a 18 horas. Después del período de incubación se realizó el examen de las placas para la identificación morfológica colonial.

A partir de los medios líquidos de enriquecimiento (Esquema # 1), se hizo una resiembra en los medios -Agar MacConkey, Agar XLD, Agar SS, Agar Verde Brillante- se incubaron las placas a 37°C durante 24 horas. Después del período de incubación se procedió al examen de las placas para la identificación morfológica de las colonias.

2.2.2. EXAMEN DE LA PLACA.

Después del período de incubación de las placas de Campy-BAP, se proce--

Esquema # 1. AISLAMIENTO DE *C. jejuni/coli*, MIEMBROS DE LA FAMILIA Enterobacteriaceae Y Pseudomonas sp. A PAR
 TIR DE MUESTRAS DE MATERIA FECAL.



dió a examinarlas, con el fin de seleccionar en base a la morfología colonial, las posibles colonias de C. jejuni o C. coli. Las colonias de este microorganismo son no hemolíticas y pueden ser elevadas y redondas con aspecto mucoso o planas y de color marrón, generalmente miden de 1 a 2 mm de diámetro y a veces crecen a lo largo de la zona de aislamiento. Se recomienda un examen rápido de las placas, ya que existen cepas extremadamente sensibles al oxígeno.

2.2.3. IDENTIFICACION PRESUNTIVA.

Se realizan frotos de las colonias sospechosas de Campylobacter y se colorean con Gram (se recomienda el uso de la solución stock de safranina, de esta manera se aumenta la posibilidad de observar más claramente la morfología de la bacteria). La identificación positiva se efectúa al observar al microscopio óptico bacilos delgados, Gram negativos, en forma de "S", de alas de gaviota o en espiral.

2.2.4. IDENTIFICACION BIOQUIMICA.

2.2.4.1. DE C. jejuni y C. coli.

A las colonias sospechosas seleccionadas, se les realiza la prueba de la oxidasa y de la hidrólisis del hipurato. Ambas pruebas son positivas para C. jejuni, mientras que para C. coli, la hidrólisis del hipurato es negativa. Estas pruebas identifican presuntivamente a ambas bacterias.

Las pruebas bioquímicas confirmatorias para C. jejuni y C. coli, utilizadas en el presente trabajo aparecen en la tabla # 3.

2.2.4.2. DE LA FAMILIA Enterobacteriaceae y Pseudomonas sp.

La identificación bioquímica de los patógenos entéricos de la familia Enterobacteriaceae y Pseudomonas sp., se hizo en base a las pruebas metabólicas tradicionales para estas bacterias. Una vez hecha la identificación bioquímica de las cepas de Salmonella, Shigella y E. coli, se hizo la serotipificación para cada una de ellas.

Tabla # 3. REACCIONES BIOQUIMICAS EMPLEADAS EN LA DIFERENCIACION DE LAS ESPECIES DE C. jejuni Y C. coli

ESPECIE	REACCION BIOQUIMICA:									
	OXIDASA	HIDROLISIS DEL HIPURATO.	H ₂ S EN MEDIO CON HIERRO	ACIDO NALIDIXICO(30 g)	CEPALOTINA(30 g)	CRECIMIENTO EN:		CRECIMIENTO A:		
						NaCl 3.5%	BILIS 1%	25°	37°	43°C
<u>C. jejuni</u>	+	+	-	S ^a	R ^o	-	+	-	+	+
<u>C. coli</u>	+	-	-	S ^a	R ^o	-	-	-	-	+

S^a = susceptible R^o = resistente

2.2.5. BIOTIPIFICACION.

Aisladas e identificadas las cepas de C. jejuni y C. coli, se procedió a biotipificarlas en base al esquema de biotipos propuesto por el C.D.C. (Tabla # 2). De esta manera se obtuvo el biotipo correspondiente para cada cepa aislada.

2.2.6. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD.

2.2.6.1. ADHERENCIA A CELULAS HeLa Y Hep-2.

Se determinaron la adherencia y la invasividad como mecanismos de patogenicidad de las cepas de C. jejuni y C. coli aisladas. Se probó simultáneamente en dos líneas celulares de mamíferos, en células HeLa y Hep-2, siguiendo la técnica descrita por Fauchere y col (modificada) [13].

A. Obtención de las células HeLa y Hep-2.

Ambas líneas celulares crecieron rutinariamente en el medio M-199, suplementado con suero fetal de ternera al 10%, 200 U.I. de Penicilina G, 50 microgramos de Estreptomicina y 2.5 microgramos de Anfotericina B por ml. Las células se propagaron en botellas de plástico para cultivo de tejidos, en una atmósfera de 5% de CO₂ aproximadamente, 24 horas antes de la prueba. la monocapa celular se tripsinizó y se agregó nuevo medio, la suspensión resultante se dividió en nuevas botellas de cultivo de tejidos. La incubación se efectuó a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%.

Dos horas antes de la prueba la monocapa celular se tripsinizó nuevamente y la suspensión celular resultante se diluyó con 25 ml de medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM).

A cada uno de los pozos de una cámara para cultivo de tejido, se le adicionó un mililitro de la suspensión celular anterior, la cámara se mantuvo a 37°C en condiciones de microaerofilia hasta su uso. De esta manera se obtuvo una monocapa celular en cada uno de los pozos para cada línea celular.

B. Desarrollo de la prueba de Adherencia.

Las cepas de C. jejuni y C. coli se cultivaron en Caldo Brucella a 37°C durante 48 horas en condiciones de microaerofilia. Una muestra de 5 ml del cultivo bacteriano se centrifugó a 3 500 rpm/20 min, el botón resultante se resuspendió en MEM y se ajustó la concentración a 10^7 o 10^8 bacterias/ml.

Se probó la viabilidad de la suspensión bacteriana en Agar Campy-BAP. Se adicionó a la monocapa celular un mililitro de la suspensión bacteriana, la mezcla se incubó a dos diferentes períodos, 30 minutos y una hora a una temperatura de 37°C en condiciones de microaerofilia. En estos períodos se espera que la bacteria se adhiera a las células eucariotes.

Después de la incubación, la monocapa celular se lavó cuidadosamente 5 veces con MEM. Las células se fijaron con metanol y Giemsa para su observación microscópica.

El mismo procedimiento se siguió para ambos períodos así como para ambas líneas celulares.

2.2.6.2. INVASIVIDAD A CELULAS HeLa Y Hep-2.

La técnica utilizada para determinar la invasividad a las líneas celulares, es una continuación de la técnica empleada para determinar la adherencia, se continúa después del primer período de incubación.

La monocapa celular se lavó cuidadosamente 5 veces con MEM y se reincubó durante 2 horas en las mismas condiciones.

En este período las bacterias adheridas invaden a la célula eucariote, después de la incubación la monocapa celular se lavó con cuidado 10 veces con MEM.

Para la enumeración de las bacterias intracelulares viables, el MEM contenía 50 mg de Gentamicina por ml, se adicionó a la monocapa celular después del último lavado.

Después de un contacto de 2 horas a 37°C, la monocapa celular se lavó cuidadosamente 10 veces con MEM sin antibióticos y se trató con desoxicolato de sodio al 0.5% para lisar las células HeLa y Hep-2. El lisado se diluyó apropiadamente con Caldo Brucella, sobre la suspensión resultante se agregó Agar Campy-BAP para determinar el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), las cajas se incubaron a 37°C durante 24 a 48 horas en condiciones de microaerofilia. Después del período de incubación se procedió a examinar las placas, con el fin de observar las colonias de C. jejuni o C. coli que hayan desarrollado.

La prueba se dió como positiva donde se observó desarrollo de colonias de C. jejuni o C. coli y como prueba negativa donde no hubo desarrollo.

Las cepas controles empleadas fueron:

Shigella flexneri y E. coli K88 como controles positivos.

E. coli J 53 como control negativo.

3. RESULTADOS.

Durante un año de investigación que abarcó desde noviembre de 1986 a octubre de 1987, se procesaron un total de 440 muestras de materia fecal, que fueron remitidas al laboratorio de Bacteriología Clínica del Instituto Nacional de Pediatría, para la búsqueda de Campylobacter jejuni, pero que paralelamente se procesaron para la búsqueda de algún otro patógeno entérico presente en la muestra.

Se obtuvo la siguiente incidencia de la flora normal (Tabla # 4 y Gráfica # 1): E. coli 96.3%, Enterobacter sp. 59.7%, Proteus sp. 58.8%, Proteus mirabilis 53.8%, Klebsiella sp. 51.6%, Citrobacter sp. 37.5%, Proteus vulgaris 27.9% y Pseudomonas sp. 30.0%.

En tanto que para las bacterias patógenas identificadas en base a las pruebas bioquímicas tradicionales para estas enterobacterias, se obtuvo la siguiente frecuencia: Salmonella sp. 12.7%, Shigella sp. 3.4% y en base a la prueba de la acriflavina se detectaron presuntivamente 14 cepas de E. coli enteropatógena que corresponde al 3.1%

Para las cepas de Salmonella sp. (Gráfica # 2) se determinó que la mayor incidencia correspondió a los meses de marzo a mayo, siendo más representativo el mes de abril en el que se presentaron 15 aislamientos correspondiéndole el 26.7% del total.

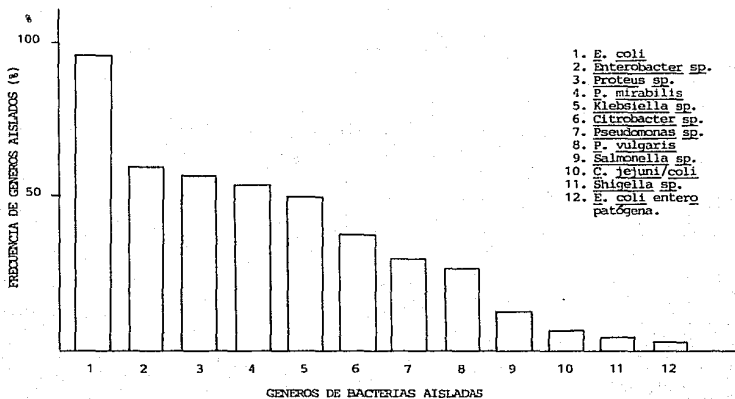
Con lo que respecta a Shigella sp. (Gráfica # 3), se observó una incidencia similar durante los meses de abril a octubre, incrementándose ésta en el mes de julio, correspondiéndole un 26.6% del total y decreciendo en septiembre a 0.0%.

En cuanto al aislamiento de E. coli enteropatógena (Gráfica # 4), se observó un incremento durante el mes de junio con un 35.5% que corresponde a 5 aislamientos, manteniéndose en los meses de febrero, mayo y octubre con un

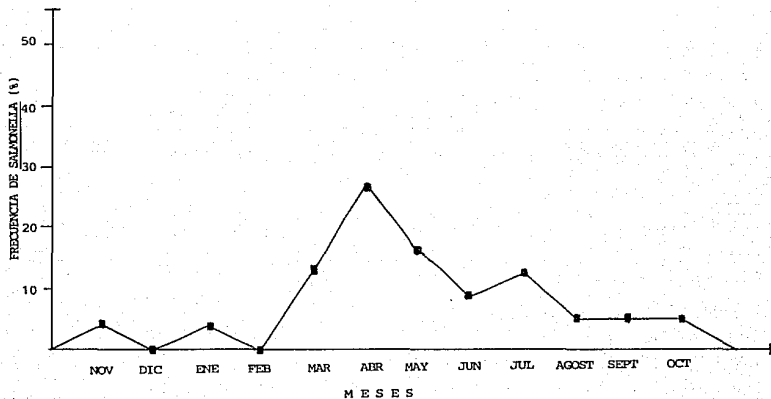
Tabla # 4. BACTERIAS AISLADAS DE LAS MUESTRAS ENVIADAS AL LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA CLINICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA DURANTE LOS MESES DE NOVIEMBRE DE 1986 A OCTUBRE DE 1987.

BACTERIAS/MESES:	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGOST	SEPT	OCT	TOTAL	F(%)
<u>E. coli</u>	8	13	18	21	40	86	71	53	55	23	25	25	438	96.3
<u>Enterobacter sp.</u>	3	12	11	12	22	47	48	31	34	13	15	15	263	59.7
<u>Proteus sp.</u>	5	7	14	6	25	50	40	26	37	18	19	12	259	58.8
<u>P. mirabilis</u>	7	10	11	13	28	50	30	27	26	11	15	9	237	53.8
<u>Klebsiella sp.</u>	2	6	8	19	24	52	50	31	37	16	13	19	227	51.6
<u>Citrobacter sp.</u>	3	9	3	8	12	25	13	23	32	10	16	11	165	37.5
<u>Pseudomonas sp.</u>	1	4	9	8	11	13	30	9	25	15	3	4	132	30.0
<u>P. vulgaris</u>	3	3	1	6	12	14	15	17	25	7	13	7	123	27.9
<u>Salmonella sp.</u>	2	0	2	0	7	15	9	5	7	3	3	3	56	12.7
<u>C. jejuni/coli</u>	0	0	0	0	0	6	0	6	2	3	1	0	18	4.0
<u>Shigella sp.</u>	0	0	0	1	0	2	2	2	4	2	0	2	15	3.4
<u>E. coli enteropatógena</u>	0	0	1	2	1	0	2	5	0	1	0	2	14	3.1
TOTAL BACTERIAS													1 933	100.0
TOTAL DE MUESTRAS: 440														

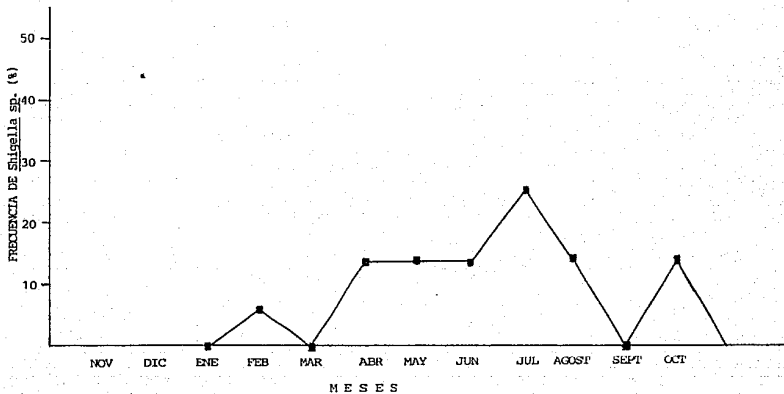
Grafica # 1. BACTERIAS AISLADAS DE LAS MUESTRAS DE MATERIA FECAL ENVIADAS AL LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA CLINICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA, DURANTE EL PERIODO DE NOVIEMBRE DE 1986 A OCTUBRE DE 1987.



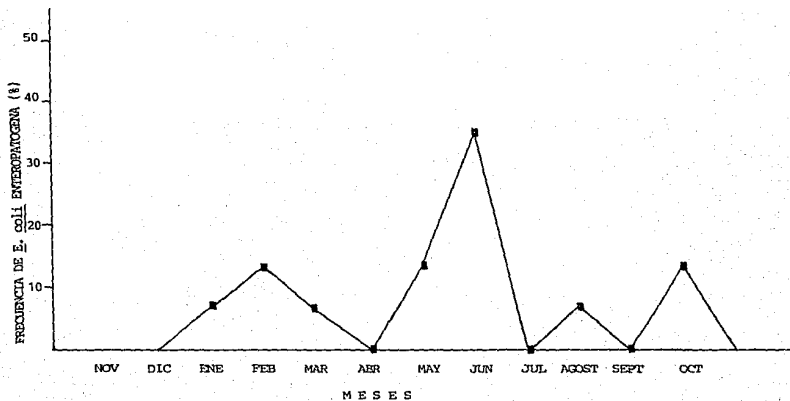
Gráfica # 2. CEPAS DE Salmonella sp. AISLADAS DE MUESTRAS DE MATERIA FECAL DE PACIENTES DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA, DURANTE EL PERIODO DE NOVIEMBRE DE 1986 A OCTUBRE DE 1987.



Gráfica # 3. CEPAS DE Shigella sp. AISLADAS DE MUESTRAS DE MATERIA FECAL DE PACIENTES DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA, DURANTE EL PERIODO DE NOVIEMBRE DE 1986 A OCTUBRE DE 1987.



Gráfica # 4. CEPAS DE E. coli ENTEROPATOGENA AISLADAS DE MUESTRAS DE MATERIA FECAL DE PACIENTES DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA, DURANTE EL PERIODO DE NOVIEMBRE DE 1986 A OCTUBRE DE 1987.



14.2% y decreciendo hacia los meses de enero, marzo y agosto en un 7.1% del total.

Para lograr la identificación final de las bacterias patógenas aisladas, se recurrió a las pruebas serológicas (reacciones de aglutinación en placa), entre los antígenos de Salmonella, Shigella y E. coli enteropatógena y los respectivos sueros anti-especie.

En base a las pruebas serológicas, se determinaron los serogrupos correspondientes para las cepas de Salmonella sp. (Tabla # 5), se identificaron 7 - grupos los que corresponden al B, C₁, C₂, C₁ y C₂, E, Vi, D, de los cuales -- el que predominó más fué el serogrupo B con 26 aislamientos y una frecuencia del 46.4%, siguiéndole el serogrupo C₁ con 26.8% y el C₂ con 14.4%.

Para Shigella sp. (Tabla # 6), se encontró lo siguiente: con el uso de -- los sueros polivalentes se determinó el grupo de Shigella sonnei, al que le -- corresponden 7 aislamientos lo que equivale al 46.7%, al grupo de Shigella --- flexneri le corresponden 5 aislamientos lo que representa el 33.3% y al grupo de Shigella boydii solo le corresponden 3 aislamientos lo que equivale a un -- 20.0% del total de cepas aisladas para este género.

Por lo que respecta a las cepas de E. coli enteropatógena (Tabla # 7), se detectaron 3 grupos, que fueron el A, B y C, observando una mayor frecuencia del grupo A serogrupo O111:K 58 (B4), obteniendo para este serogrupo 6 -- aislamientos lo que equivale a una frecuencia de 42.9%. Para el grupo B, el -- serogrupo con mayor incidencia fué el O86: K 61 (B7), con una frecuencia de -- 14.2% finalmente para el grupo C se obtuvo una frecuencia del 17.1%

Tabla # 5. IDENTIFICACION SEROLOGICA DE LAS CEPAS DE Salmonella sp. AISLADAS DE MUESTRAS DE MATERIA FECAL DE PACIENTES DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA, DURANTE EL PERIODO DE NOVIEMBRE DE 1986 A OCTUBRE DE 1987.

SEROGRUPO	No. DE AISLAMIENTOS	FRECUENCIA(%)
B	26	46.4
C ₁	15	26.8
C ₂	8	14.4
C ₁ y C ₂	2	3.6
E	2	3.6
VI	2	3.6
D	1	1.8
TOTAL	56	100.0

Tabla # 6. IDENTIFICACION SEROLOGICA DE LAS CEPAS DE Shigella sp. AISLADAS DE MUESTRAS DE MATERIA FECAL DE PACIENTES DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA, DURANTE EL PERIODO DE NOVIEMBRE DE 1986 A OCTUBRE DE 1987.

SEROGRUPO	No. DE AISLAMIENOS	FRECUENCIA(%)
<u>S. sonnei</u>	7	46.7
<u>S. flexneri</u>	5	33.3
<u>S. boydii</u>	3	20.0
TOTAL	15	100.0

Tabla # 7. IDENTIFICACION SEROLOGICA DE LAS CEPAS DE E. coli ENTEROPATOGENA AISLADAS DE MUESTRAS DE MATERIA FECAL DE PACIENTES DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA, DURANTE EL PERIODO DE NOVIEMBRE DE 1986 A OCTUBRE DE 1987.

GRUPO	SEROGRUPO	No. DE AISLAMIENTOS	FRECUENCIA(%)
A	O111:K 58 (B4)	6	42.9
	O26 :K 60 (B6)	2	14.2
	O55 :K 59 (B5)	1	7.1
B	O86 :K 61 (B7)	2	14.2
	O128:K 67 (B12)		
	O125:K 70 (B15)	1	7.1
	O125:K 70 (B15)	1	7.1
C		1	7.1
TOTAL		14	100.0

Con el empleo del medio Campy- BAP, incubado a 43°C durante 48 horas y - en condiciones de microaerofilia, se aislaron e identificaron presuntivamente 18 cepas de Campylobacter, de las cuales 4 de ellas que equivalen al 22.2% -- del total de aislamientos no pudieron identificarse bioquímicamente, ya que - no fué posible el subcultivo de estas cepas.

En base a la hidrólisis del hipurato (Tabla # 8), de las 14 cepas restan- tes, 12 cepas que representan el 66.6% se identificaron como C. jejuni, las - 2 restantes como C. coli que equivale al 11.1%. Complementariamente se reali- zaron las pruebas bioquímicas recomendadas para estas bacterias.

En cuanto a los biotipos (Tabla # 9), se consideran 4 para C. jejuni, de las 12 cepas identificadas como de C. jejuni, sólo 8 de ellas se identifica- ron en base a su biotipo, obteniendo solo 2 para estas cepas, los que fueron el I y II, el que se presentó con mayor frecuencia fué el biotipo I. Las 4 ce- pas restantes no se pudieron identificar en base a su biotipo.

Para las cepas de C. coli se identifican solo 2 biotipos, de los que en esta investigación el que se presentó con mayor frecuencia fué también el bio- tipo I.

En cuanto al aislamiento de C. jejuni (Tabla # 10 y Gráfica # 5), se ob- tuvo durante los meses de abril a septiembre, siendo abril y junio los de --- mayor incidencia, obteniéndose 6 aislamientos positivos lo que equivale a --- 33.3% del total de aislamientos para cada mes respectivamente.

En relación a los aislamientos de las cepas de C. coli, uno fué durante el mes de junio y otro en agosto, lo que representa el 5.5% del total de ais- lamientos para cada mes respectivamente.

Durante el mes de mayo se observó un decremento en los aislamientos de - C. jejuni, lo cual se atribuye a la falta de medio de cultivo para el aisla- miento de este microorganismo.

Tabla # 8. IDENTIFICACION BIOQUIMICA DE LAS CEPAS DE C. jejuni y C. coli AISLADAS DE PACIENTES DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA, DURANTE EL PERIODO DE NOVIEMBRE DE 1986 A OCTUBRE DE 1987.

REACCION: CEPA:	OXIDASA	HIDROLISIS DEL HIPURATO	H ₂ S EN MEDIOS CON HIERRO	ACIDO NALIDIXICO (30 g)	CEFALOTIXIM NA(30 g)	CRECIMIENTO EN:		CRECIMIENTO A:			ESPECIE:
						NaCl 3.5%	BILIS 1%	25°	37°	43°C	
3	+	+	-	S	R	-	+	-	+	+	<u>C. jejuni</u>
47	+	+	-	S	R	-	+	-	+	+	<u>C. jejuni</u>
63	+	+	-	S	R	-	+	-	+	+	<u>C. jejuni</u>
64	+	+	-	S	R	-	+	-	+	+	<u>C. jejuni</u>
115	+	+	-	S	R	-	+	-	+	+	<u>C. jejuni</u>
126	+	+	-	S	R	-	+	-	+	+	<u>C. jejuni</u>
10	+	+	-	S	R	-	+	-	+	+	<u>C. jejuni</u>
11	+	+	-	S	R	-	+	-	+	+	<u>C. jejuni</u>
163	+	-	-	S	R	-	+	-	+	+	<u>C. coli</u>
212	+	+	-	S	R	-	+	-	+	+	<u>C. jejuni</u>
228	+	+	-	S	R	-	+	-	+	+	<u>C. jejuni</u>
22	+	-	-	S	R	-	+	-	+	+	<u>C. coli</u>
174	+	+	-	S	R	-	+	-	+	+	<u>C. jejuni</u>
191	+	+	-	S	R	-	+	-	+	+	<u>C. jejuni</u>

S= susceptible

R= resistente

Tabla # 9. BIOTIPOS DE C. jejuni Y C. coli AISLADOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA, DURANTE EL PERIODO DE NOVIEMBRE DE 1986 A OCTUBRE DE 1987.

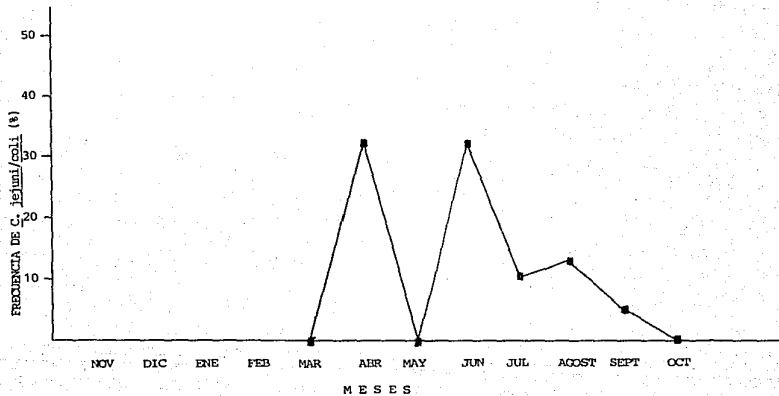
REACCION: ESPECIE:	HIDROLISIS DEL HIPURATO	PRUEBA RAPIDA DE H ₂ S	HIDROLISIS DEL DNA	BIOTIPO
<u>C. jejuni</u>				
3	+	-	+	II
47	+	-	-	I
63	+	-	-	I
64	+	-	-	I
115	+	-	-	I
126				*
10				*
11	+	-	-	I
212				*
228				*
174	+	-	-	I
191	+	-	-	I
<u>C. coli</u>				
163	-	-	-	I
22	-	-	-	I

* Cepas no probadas.

Tabla # 10. CEPAS DE C. jejuni AISLADAS DURANTE LOS MESES DE NOVIEMBRE DE 1986 A OCTUBRE DE 1987.

MES:	No. DE AISLAMIENOS	FRECUENCIA(%)
NOVIEMBRE	0	0.0
DICIEMBRE	0	0.0
ENERO	0	0.0
FEBRERO	0	0.0
MARZO	0	0.0
ABRIL	6	33.3
MAYO	0	0.0
JUNIO	6	33.3
JULIO	2	11.1
AGOSTO	3	16.6
SEPTIEMBRE	1	5.5
OCTUBRE	0	0.0
TOTAL	18	100.0

Gráfica # 5. CEPAS DE Campylobacter jejuni/coli AISLADAS DE MUESTRAS DE MATERIA FECAL DE PACIENTES DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA, DURANTE EL PERIODO DE NOVIEMBRE DE 1986 A OCTUBRE DE 1987.



Con respecto a la variación estacional, se encontró que en Primavera y Verano se aisló con mayor frecuencia a C. jejuni, observando que de estas dos estaciones, fué el Verano la que presentó mayor número de aislamientos con un 55.6% (Tabla # 11).

De los enteropatógenos que se aislaron con mayor frecuencia (Tabla # 12) comparativamente con C. jejuni, se observó que Salmonella sp. ocupa un lugar preponderante sobre Shigella sp., E. coli enteropatógena y C. jejuni.

C. jejuni ocupó el segundo lugar de entre los enteropatógenos aislados, cabe mencionar que Salmonella sp. se aisló en un 54.3% mientras que C. jejuni y C. coli lo fueron en un 17.4% de un total de 103 bacterias patógenas aisladas.

Tabla # 11. INCIDENCIA ESTACIONAL DE LAS CEPAS DE C. jejuni AISLADAS DURANTE EL PERIODO DE NOVIEMBRE DE 1986 A OCTUBRE DE 1987.

ESTACION	No. DE AISLAMIENOS	FRECUENCIA (%)
INVIERNO	0	0.0
PRIMAVERA	8	44.4
VERANO	10	55.6
OTOÑO	0	0.0
TOTAL	18	100.0

Tabla # 12. ENTEROPATOGENOS AISLADOS EN EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA CLINICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA, DURANTE EL PERIODO NOVIEMBRE DE 1986 A OCTUBRE DE 1987.

PATOGENO	No. DE AISLAMIENTOS	FRECUENCIA (%)
<u>Salmonella</u> sp.	56	54.3
<u>Shigella</u> sp.	15	14.5
<u>E. coli</u> enteropatógena	14	13.8
<u>C. jejuni</u> y <u>C. coli</u>	18	17.4
TOTAL	103	100.0

Con relación a la adherencia e invasividad de las cepas de C. jejuni y C. coli como mecanismos de patogenicidad, se probó la adherencia a células -- HeLa y Hep-2 con 5 de las cepas aisladas -47,63,64,228 y 22- de las cuales -- las cuatro primeras pertenecían a la especie de C. jejuni y la última a la de C. coli, los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

Tabla # 13. ADHERENCIA A CELULAS HeLa Y Hep-2.

CEPA	30 min	1 Hora	30 min.	1 Hora
47	-	-	-	-
63	-	-	-	-
64	+	-	-	-
228	-	-	-	-
22	+	-	-	-

La adherencia se detectó en 2 de las cinco cepas probadas -64 y 22- sin embargo, después de una hora no fué detectada. El fenómeno de adherencia solo se observó en las células HeLa, en las células células Hep-2 no se presentó (Fig. # 1).

En cuanto a la invasividad se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla # 14). La invasividad se observó en 3 de las 5 cepas probadas -64,228 y -22- la capacidad invasiva se determinó por la presencia de colonias en las placas de cultivo como se puede observar en la figura # 2. El fenómeno de invasividad solo se observó en células HeLa, en las células Hep-2 no se detectó.

Tabla # 14. INVASIVIDAD EN CELULAS HeLa Y Hep-2.

CEPA	HeLa	Hep-2
47	-	-
63	-	-
64	+	-
228	+	-
22	+	-

Cabe mencionar que las cepas 64 y 22 fueron positivas tanto para la adherencia como para la invasividad, mecanismos observados únicamente en células HeLa.

La cepa 228 que se detectó como una cepa invasiva, en ningún momento mostró su capacidad de adherencia. La capacidad de invasividad sólo se observó en células HeLa.

Sólo 2 de las 5 cepas probadas de C. jejuni y C. coli, mostraron su capacidad de adherencia e invasividad a células eucariotes.

FIGURA # 1. ADHERENCIA DE C. jejuni A CELULAS HeLa. .

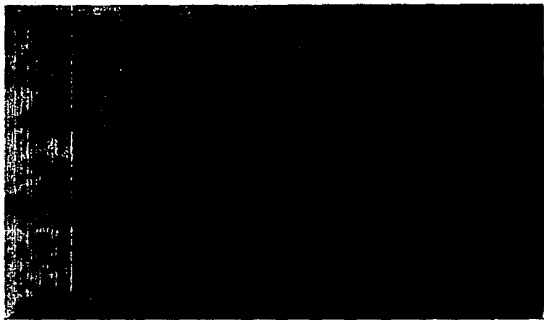


FIGURA # 2. INVASIVIDAD DE C. jejuni y C. coli A CELULAS HeLa.

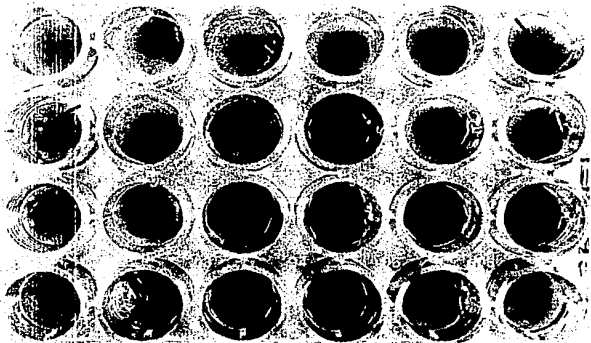


Tabla # 15. BACTERIAS ENTEROPATOGENAS AISLADAS DE LAS MUESTRAS DE MATERIA FECAL ENVIADAS AL LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA CLINICA PARA LA BUSQUEDA DE Campylobacter

PATOGENO	AISLAMIENTO	FRECUENCIA(%)
<u>Salmonella</u> sp.	56	12.8
<u>C. jejuni/coli</u>	18	4.0
<u>Shigella</u> sp.	15	3.5
<u>E. coli</u> enteropatógena	14	3.2
Otros		76.5
TOTAL	440	100.00

4. ANALISIS DE RESULTADOS.

Las diarreas representan una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad durante la edad pediátrica, particularmente en los países en desarrollo donde ocupan el segundo lugar como causas de enfermedad y muerte, muy cerca de las infecciones agudas de las vías respiratorias.

México está dentro de las naciones con tasas de mortalidad más elevadas en el mundo, con respecto a las enfermedades diarreicas [41].

A pesar de los innumerables esfuerzos encaminados a explicar el origen o etiología del enorme grupo de las enfermedades diarreicas por medio de los más diversos mecanismos, el factor infeccioso continúa siendo el más importante, sin duda por su carácter contagioso.

Además del papel que los microorganismos enteropatógenos clásicos -V. cholerae, Shigella, Salmonella, serotipos enteropatógenos de E. coli y E. histolytica- juegan en la etiología de las diarreas, a últimas fechas se han incorporado nuevos agentes enteropatógenos de importancia mundial, como son los rotavirus, C. jejuni y las cepas enterotoxigénicas de E. coli.

Son variables los datos que se encuentran en la literatura mexicana, --- acerca de la distribución y frecuencia de los distintos grupos de microorganismos involucrados en la diarrea. En el caso de los miembros del género Salmonella, son capaces de producir cuadros clínicos tanto en el hombre como en algunos animales, con excepción de S. typhi, se ha referido que su capacidad para producir diarreas es inferior a la que ocasiona Shigella, pero a últimas fechas se ha visto un incremento debido a la industrialización de los productos alimenticios fabricados y distribuidos en forma masiva. En México se encuentra Salmonella en niños con diarrea aguda entre un 5 a 12% [1]. Notando un predominio en niños con respecto a las niñas, siendo la salmonelosis la enfermedad reportada en menores de dos años. En México es endémica, con máximos

hacia finales de Primavera y durante Verano.

En esta investigación del total de las muestras de materia fecal recibidas para la búsqueda de Campylobacter, el género Salmonella se identificó en un 12.7% del total de bacterias aisladas (Tabla # 4), siendo este género el aislado con mayor frecuencia de entre los enteropatógenos identificados, cuya frecuencia fué de 54.3% (Tabla # 2). Del género Salmonella el serogrupo B fué el que se presentó con mayor frecuencia 46.4% de los distintos serogrupos identificados (Tabla # 5), dato que concuerda con lo reportado por el Dr. Kumate, en un estudio realizado en el Hospital Infantil de México "Federico Gómez", donde Salmonella B se identificó en un 51.3% [1].

La identificación del serogrupo Vi de Salmonella que corresponde a S. typhi, sólo pudo identificarse en un 3.5%, dato que es lógico encontrar si se toma en cuenta que las muestras procesadas provenían de niños.

Desde el punto de vista estacional, el género Salmonella fué aislado durante casi todo el año, observando una frecuencia máxima hacia la Primavera y disminuyendo en Verano (Gráfica # 2), lo cual concuerda en parte con lo reportado en la literatura [41].

En el caso de Shigella se ha referido en la literatura que, de los tres enteropatógenos clásicos principales, ésta se encuentra con mayor frecuencia y de manera más uniforme en la mayoría de los países. Por los datos obtenidos en el presente trabajo, se pudo observar que el género antes referido ocupó el tercer lugar en frecuencia (Tabla # 12). En los países con precarias condiciones sanitarias predomina S. flexnerii, pero a medida que estas condiciones mejoran va siendo remplazada por S. sonnei, fenómeno epidemiológico que no tiene una explicación clara [41].

Como se puede observar en la Tabla # 6, la especie predominante en este estudio fué S. sonnei, el Dr. Olarte refiere que S. boydii y S. dysenteriae

son menos frecuentes. En este trabajo sólo se pudo aislar a S. boydii en un 20%, pero nunca se aisló a S. dysenteriae.

Por otro lado, se puede asegurar que en el caso de los pacientes del Instituto Nacional de Pediatría que provienen de toda la República, el aislamiento de este género se efectuó prácticamente durante casi todo el año (Gráfica # 3), salvo algunos meses donde el aislamiento fué nulo.

A diferencia de lo que ocurre con los miembros del género Shigella y Salmonella, sólo unos cuantos serogrupos de E. coli se consideran patógenos para el niño. En México, en diversos estudios realizados en diferentes casos de diarreas, se ha podido aislar casi la totalidad de los serotipos enteropatógenos de E. coli, con predominio de E. coli 0111, E. coli 0127, E. coli 0126 y E. coli 0142. En el presente trabajo se reporta a E. coli 0111 como el sero grupo con mayor frecuencia y a los serogrupos 0126 y 086 con una frecuencia menor pero significativa (Tabla # 7). De lo anterior observamos el predominio antes referido de E. coli 0111, estos datos son importantes si se toma en cuenta que en todo niño menor de dos años de edad con diarrea aguda y sobre todo si es recién nacido, deberá de sospecharse la presencia de E. coli enteropatógena hasta no comprobar lo contrario. Sin embargo, en el presente trabajo de las 440 muestras sólo se logró identificar 14 cepas de E. coli enteropatógena. En este renglón cabe hacer mención que la carencia por parte del Instituto de todos los sueros anti-E. coli para detectar la totalidad de las cepas enteropatógenas, pudo ser la causa de la baja frecuencia con que se detectó a este patógeno 3,1% (Tabla # 4). No obstante, la literatura refiere que E. coli enteropatógena ocupa el tercer lugar después de Salmonella y Shigella dato que fué corroborado en el presente trabajo si tomamos en cuenta, sólo a estos tres enteropatógenos. Por otra parte, a nivel estacional la máxima frecuencia de aislamiento se logró en Verano.

Campylobacter, originalmente conocido como V. fetus, es un bacilo Gram negativo conocido desde los inicios de este siglo. La importancia de esta bacteria permaneció desconocida durante muchos años, fué hasta 1918 cuando se estableció que podía causar abortos esporádicos en el ganado y carneros [40]. Hasta 1947 fué cuando se reportó el primer caso de infección por V. fetus en humano, y en los siguientes 20 años solo se reportaron 100 casos [3, 28,37,38,39].

Una de las posibles razones por las cuales C. jejuni no se había relacionado con las enfermedades en humanos, pudo haber sido por las condiciones especiales que requiere para su cultivo -un medio selectivo, atmósfera reducida de oxígeno y una temperatura óptima de 42 a 43°C- esto aunado a que se ha descrito a C. jejuni como una bacteria que no oxida ni fermenta carbohidratos [2,38,39], dificultaba su aislamiento e identificación con el uso de medios y pruebas bioquímicas tradicionales.

Con el desarrollo de técnicas de cultivo y medios de cultivo selectivos [7,8,10,17], ahora se aísla a C. jejuni de muestras de materia fecal con mayor frecuencia y en base a pruebas bioquímicas establecidas de acuerdo a sus características metabólicas se puede identificar con mayor facilidad.

Estudios realizados en poblaciones infantiles en Europa, Canadá, Australia, Africa y Estados Unidos, han demostrado que C. jejuni es actualmente un importante patógeno entérico, cuya distribución es mundial y que presenta un rango variable de frecuencia para personas sintomáticas que en términos generales es de 3 a 10% [3,4,5,6,16,35].

La explicación a este fenómeno es que, en los países en desarrollo, la incidencia de las infecciones por C. jejuni es menor y hay unos pocos portadores; en contraste, con los países en vías de desarrollo, donde la incidencia de las infecciones diarreicas por Campylobacter es mayor, el número de

portadores es superior [5,16]. Este alto número de portadores de C. jejuni - en países en desarrollo, no se ha explicado, pero puede haber dos posibilidades que expliquen esta diferencia; baja patogenicidad de las cepas en los -- países en desarrollo o temprana inmunización de los niños, debida a un bajo nivel de higiene en estos países, permitiendo así una alta frecuencia de la bacteria [16].

En este estudio realizado, C. jejuni se aisló en 18 de 440 muestras de materia fecal procesadas lo que equivale a un 4.0%. En contraste con el 5.0% de aislamientos logrado en el Instituto Nacional de la Nutrición en 1980 [35].

De las cepas aisladas, 12 de ellas se identificaron como C. jejuni, 2 - como C. coli y el resto, debido a las exigencias en el desarrollo del microorganismo, no pudieron identificarse.

Se ha reportado en la literatura, que durante el Verano y Otoño es más alta la incidencia de C. jejuni que durante la Primavera y el Invierno [39]. En base a los resultados obtenidos (Tabla # 11), se observa que la mayoría de los casos ocurrieron durante la Primavera 44.4% y el Verano 55.6%, no observándose una diferencia estadística significativa. Los resultados obtenidos concuerdan con los de la literatura solo en lo reportado para el Verano, no así para la Primavera. Se considera que esto puede deberse a factores fortuitos que pueden interferir, como serían costumbres alimenticias, de consumo o bien higiénicas, etc [40,41].

Como se observa en la tabla # 15, de las 440 muestras enviadas al laboratorio para la búsqueda de Campylobacter, se detectaron 56 cepas de Salmonella sp. 12.8%, 15 cepas de Shigella sp. 3.5%, 14 cepas de E. coli enteropatógena 3.2% y 18 cepas de C. jejuni/coli 4.0%, lo cual indica que los síntomas de la campylobacteriasis pueden confundirse con los de otros patógenos - entéricos, de ahí la necesidad de implementar las técnicas para el cultivo e

identificación de C. jejuni/coli en los laboratorios de rutina; de lo contrario, este patógeno pasará desapercibido como causante de enfermedades entéricas, siendo que en otros países se le ha aislado con igual o mayor frecuencia que los otros tres enteropatógenos reportados en el presente trabajo [3, 41].

El desarrollo de pruebas de diagnóstico rápido para detectar la adherencia e invasividad de C. jejuni/coli a líneas celulares, permitió determinar la asociación de estas dos especies únicamente con células HeLa, propiedad ya estudiada por otros autores [12,42]. La adherencia de las bacterias a la superficie de las células, se observó únicamente a los 30 minutos, pasado este tiempo la asociación ya no se detectó, lo cual puede deberse a la destrucción del citoplasma, como consecuencia de la invasividad de estos microorganismos, ya que las cepas que resultaron positivas para la adherencia lo fueron para la invasividad. Cabe hacer notar que la cepa 228, que se detectó como una cepa invasiva, en ningún momento mostró su capacidad de adherencia; sin embargo, al observar las placas para evaluar el fenómeno de invasividad en los cultivos de líneas celulares, esta cepa resultó ser invasiva.

En cuanto a las células Hep-2 no presentaron alteración en su morfología ni evidencias de haber sido invadidas, por lo cual, se puede asegurar que la capacidad de adherencia e invasividad de las cepas de C. jejuni y C. coli estudiadas solo se detectaron en las cepas 64,228 y 22, en tanto que las otras dos cepas estudiadas -47 y 63- se comprobó que no eran adherentes ni invasivas.

CONCLUSIONES

- 1.- De las 440 muestras de materia fecal estudiadas, se aislaron 18 cepas de Campylobacter, identificándose bioquímicamente 12 de estas como C. jejuni y 2 más de C. coli.
- 2.- Para C. jejuni se identificaron 2 biotipos, siendo el más frecuente el biotipo I. Para las cepas de C. coli el biotipo predominante fué también el I.
- 3.- Se observó entre la población infantil estudiada, que C. jejuni es más frecuente que C. coli.
- 4.- El aislamiento de C. jejuni fué más frecuente durante las épocas ca-
lurosas del año como son Primavera y Verano.
- 5.- De entre los patógenos aislados C. jejuni/coli ocupó el segundo lugar en aislamiento, lo cual demuestra que este microorganismo debe de tomarse en cuenta como causante de diarreas entre la población infantil de México.
- 6.- Las muestras de materia fecal que sean enviadas al laboratorio de -
Bacteriología para coprocultivo, deberán incluir la búsqueda de Campylobac-
ter, de lo contrario, este microorganismo seguirá pasando desapercibido o --
bien el padecimiento se puede atribuir a otro enteropatógeno.
- 7.- La capacidad de adherencia e invasividad se determinaron en dos de-
las cepas probadas, únicamente en células HeLa, por lo cual se puede asegu-
rar que poseen los mecanismos necesarios para causar daño.

A N E X O

I AGAR SELECTIVO PARA CAMPYLOBACTER (BASE)

El Agar Selectivo para Campylobacter (Base) es un medio de cultivo seco, presentado en forma de gránulo de eficiencia probada. Según Skirrow, agregando junto al Suplemento Selectivo para Campylobacter, 5% de sangre desfibriada de carnero, se obtiene un medio completo para el cultivo óptimo de Campylobacter sp.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Mezcla de Peptonas - Proteínas	21.0
Electrolitos	5.0
Almidón soluble	1.0
Agar- agar	13.0

pH final 7.3 ± 0.1

Preparación:

Se suspenden 40 g. de Agar Selectivo para Campylobacter (Base) en un litro de agua desmineralizada y se calienta en un baño maría con agua hirviendo o con el chorro de vapor hasta que se haya disuelto totalmente, se distribuye el medio líquido en matraces de 200 ml. Esterilizar a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos. Después de esterilizar hacer rotar los matraces y enfriar a unos 45°C. Para preparar 200 ml de Agar Selectivo para Campylobacter, se agrega al medio de cultivo base todavía en estado líquido, un frasco de Suplemento Selectivo para Campylobacter disuelto en 2 ml de agua estéril y 10 ml de sangre de carnero desfibrinada, se vierte el medio en cajas de Petri estériles y se deja solidificar a temperatura ambiente.

Se puede conservar el Agar Selectivo para Campylobacter ya listo para u-

sar durante un período de por lo menos 3 meses en el refrigerador.

SUPLEMENTO SELECTIVO PARA CAMPYLOBACTER

El Suplemento Selectivo para Campylobacter se usa para suprimir otros microorganismos contaminantes, presentes en abundancia en las muestras de materia fecal.

La mezcla de los antibióticos vancomicina, polimixina y trimetoprim, se presenta en forma liofilizada y almacenándola en frío se puede conservar durante largo tiempo. Un frasco de Suplemento Selectivo para Campylobacter es suficiente para preparar 200 ml de Agar Selectivo para Campylobacter.

II PRUEBA DE HIDROLISIS DEL HIPURATO

Reactivos:

Solución de Hipurato de Sodio al 1%

Solución de Ninhidrina en butanol-acetona (1:1)

Procedimiento:

Distribuir 0.4 ml de la solución de hipurato de sodio en tubos de 10 X 75 mm, almacenar los tubos a -20°C hasta su uso.

Antes de usar, dejar que los tubos tomen temperatura ambiente y emulsificar un inóculo de un cultivo de 24 a 48 horas. Mezclar bien e incubar durante 2 horas a 37°C. Al término de la incubación, resbalar lentamente por los lados del tubo 0.2 ml del reactivo de ninhidrina, no mezclar y reincubar durante 10 minutos y leer.

Interpretación:

La aparición de un color púrpura intenso en la mezcla de reacción, representa una reacción positiva.

Un color púrpura claro o tenue es indicativo de una reacción negativa pa

ra esta prueba.

III PRUEBA RAPIDA DE H_2S (MODIFICADA)

El medio de FPB se prepara como sigue:

A. Caldo Brucella	2.9 g
Na_2HPO_4 (anh)	0.118 g
KH_2PO_4 (anh)	0.023 g
Agar	0.2 g
H_2O	97 ml

Esterilizar durante 15 minutos a 15 lb y enfriar a 45°C.

Prepara las siguientes soluciones por separado en agua destilada y filtrar para esterilizar.

Solución B: Sulfato ferroso $7H_2O$ al 10%

Solución C: Metabisulfito de sodio al 10%

Solución D: Piruvato de Sodio al 10%

Preparación:

Asépticamente adicionar 1 ml de la solución B a 1 ml de la solución C, -mezclar bien y adicionar a 1 ml de la solución D. La mezcla anterior se vierte a la base del medio A. Ajustar el pH a 7.3. Distribuir asépticamente 3 ml del medio en tubos de 13 X 100 mm estériles y con tapón de rosca. Preparar el medio cada 2 semanas.

Procedimiento:

Suavemente, suspender un inóculo de un cultivo de 24 horas en la tercera parte superior del medio, no mezclar e incubar a 37°C en un baño de agua durante 2 horas.

Interpretación:

Una zona negra alrededor de la masa bacteriana representa una reac---

ción positiva que generalmente aparece entre los 30 a 45 minutos de incubación.

Se recomienda usar cultivos de 24 horas, ya que la reproducibilidad con cultivos de 48 horas o más es muy pobre.

IV PRUEBA DE HIDROLISIS DEL DNA (MODIFICADA)

Preparar el Agar para prueba de D-Nasa de acuerdo con las instrucciones del fabricante, adicionar 1.35 ml de una solución de Verde de metilo al 0.5% en 100 ml del medio. Esterilizar y distribuir el medio en cajas de Petri estériles.

Procedimiento:

Inocular en forma circular un área aproximada de 1 cm de diámetro, --- sobre la superficie de una placa con un inóculo de cultivo de 24 a 48 horas e incubar a 37°C en una mezcla de gases recomendada para Campylobacter. Examinar la caja diariamente durante 3 a 5 días.

Interpretación:

Una zona con disminución de color alrededor del crecimiento bacteriano se considera como reacción positiva. Una zona angosta se considera como una reacción dudosa. Se recomienda hacer la lectura contra una luz indirecta.

SOLUCION DE VERDE DE METILO

Reactivos:

Verde de Metilo 0.5 g

Agua destilada 100 ml

Disolver en agua destilada y lavar 3 a 5 veces con cloroformo hasta que los lavados disminuyan de color.

V MEDIO BHI CON GLICEROL

(CONSERVACION DE CEPAS)

Preparar Caldo Infusión Cerebro y Corazón siguiendo las instrucciones del fabricante, una vez preparado adicionar 15 ml de glicerol por cada 100 ml de medio, ya preparado colocar en tubos de 13 X 100 mm con tapón de rosca 1 ml de la mezcla anterior y esterilizar.

Para inocular este medio, tomar un buen inóculo del microorganismo a preservar y hacer una suspensión homogénea con el caldo, tapar los tubos, etiquetarlos y almacenar a -70°C , a esta temperatura se conservan por tiempo indefinido.

BIBLIOGRAFIA.

1. Ambrosius-Diener K., Salazar-Flores M., Valencia-Mayoral P. "La salmonellosis en niños; observaciones morfológicas y bacteriológicas en estudios post mortem". Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 43:300-306. (1986)
2. Barrett T. J., Patton Ch. M., Morris G.K. "Differentiation of Campylobacter Species Using Phenotypic Characterization". Lab. Med. 19:96-102. (1988)
3. Blaser M. J., Berkowitz I. D., LaForce F. M. "Campylobacter Enteritis: -- Clinical and Epidemiologic Features". Ann. Intern. Med. 91:179-185. ---- (1979)
4. Blaser M. J., Hardesty H. L., Power B. "Survival of Campylobacter fetus - subsp. jejuni in Biological Milieus". J. Clin. Microbiol. 11:309-313. --- (1980)
5. Blaser M. J., Glass R. I., Imdadul Huq M., Stoll B. "Isolation of Campylobacter fetus subsp. jejuni from Bangladeshi Children". J. Clin. Microbiol. 12:744-747. (1980)
6. Blaser M. J., LaForce F. M., Wilson N. A. "Reservoirs for Human Campylobacteriosis". J. Infects. Dis. 141:665-669. (1980)
7. Bolton F. J., Coates D. "Development of a blood-free Campylobacter medium: screening test on basal media and supplements and the ability of selected supplements, facilitate aerotolerance". J. Appl. Bacteriol. 54:115-125. (1983)
8. Bolton F. J., Hutchinson D. N. "Blood-Free Selective Medium for Isolation of Campylobacter jejuni from Feces". J. Clin. Microbiol. 19:169-171 ---- (1984)
9. Caldwell M. B., Walker R. I. "Simple Adult Rabbit Model for Campylobacter jejuni Enteritis". Infect. Immun. 42:1176-1182. (1983)

10. Chan F.T., Mackenzie A.M.R. "Enrichment Medium and Control System for In-
solation of Campylobacter fetus subsp. jejuni from Stools". J. Clin. Mi-
crobiol. 15:12-15. (1982)
11. Chou S. P., Dular R. "Effect of Ferrous Sulfate, Sodium Metabisulfite, -
and Sodium Pyruvate on Survival of Campylobacter jejuni". J. Clin. Micro-
biol. 18:986-987. (1983)
12. Du Pont H. L. "Diarrheal Diseases". Am. J. Med. 78:63-64. (1985)
13. Fauchure J. L. Rosenau A., Moyen E. N. , "Association with Hela Cells of
Campylobacter jejuni and Campylobacter coli Insolated from Human Feces".
Infect. Immun. 54:283-287. (1986)
14. Field L. H., Headley V. L., Underwood J. L. "The Chicken Embryon as a Mo-
del for Campylobacter Invasion: Comparative Virulence of Human Insolates
of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli ". Infect. Immun. 54:118-
125. (1986)
15. Flores B. M., Fennell C. L., Holmes K. K. " In vitro Susceptibilities of
Campylobacter-Like Organisms to twenty Antimicrobial Agents". Antimi-
crob Agents. Chemother. 28:188-191. (1985)
16. Georges M. C., Baya C., Beraud A. M. "Distribution and Serotypes of ---
Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in Enteric Campylobacter ---
Strain Insolated from Children in the Central African Republic". J. Clin.
Microbiol. 23:592-594. (1986)
17. Gilchrist M. J., Grewell C.M. "Evaluation of Media for Insolation of ---
Campylobacter fetus subsp. jejuni from Fecal Specimens". J. Clin. Micro-
biol. 14:393-395. (1981)
18. Goodman T. G., Hoffman P. S. "Hydrogenase Activity in Catalasa-Positive
Strains of Campylobacter spp.". J. Clin. Microbiol. 18:825-829. (1983)
19. Herbert G. A., Hollis D. G., Weaver R. E. "30 Years of Campylobacter:

- Biochemical Characteristics and a Biotyping Proposal for Campylobacter jejuni". J. Clin. Microbiol. 15:1065-1073. (1982)
20. Hoffman P. S., George H. A., Krieng N. R. "Studies of the microaerophilic nature of Campylobacter fetus subsp. jejuni. II. Role of exogenous superoxide anions and hydrogen peroxide". Can. J. Microbiol. 25:8-16 (1979)
 21. Jones D. M., Robinson D. A. "Serological studies in two outbreak of --- Campylobacter jejuni infection". J. Hyg. Camb. 87:163-170. (1981)
 22. Karmali M. A., Grandis S., Fleming P. C. "Antimicrobial Susceptibility - of Campylobacter jejuni with Special Reference to Resistance Patterns of Canadian Isolates". Antimicrob. Agents. Chemother. 19:593-597 (1981)
 23. Karmali M. A., Simor A. E., Roscoe M. "Evaluation of a Blood-Free, Charcoal-Based, Selective Medium for the Isolation of Campylobacter Orga----nisms from Feces". J. Clin. Microbiol. 23:456-459 (1986)
 24. Krieg N. R., Hoffman P. S. "Microaerophily and Oxygen Toxicity". Ann. -- Rev. Microbiol. 40:107-130 (1986)
 25. Luechtefeld N. W., Barth-Reller L. "Comparison of Atmospheres of Incuba- tion for Primary Isolation of Campylobacter fetus subsp. jejuni from --- Animal Specimens: 5% Oxygen Versus Candle Jar". J. Clin. Microbiol. 15: 53-57 (1982)
 26. Luechtefeld N. W., Wang W. L. "Hippurate Hydrolysis by and Triphenyltetrazolium Tolerance of Campylobacter fetus". J. Clin. Microbiol. 15:137-140 (1982)
 27. Milss S. D., Bradbury W. C. "Isolation and Characterization of a Common Antigen in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli". J. Clin. Microbiol. 24:69-75 (1986)
 28. Morris G. K., Patton C. M.
"Campylobacter"

ESTA TESIS NO DEBE
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

Manual of Clinical Microbiology

Lennette E. H., Balows A., Hausler W. J. (eds).

Ed. 4th. Washington, D. C.

American Society for Microbiology.

pp 302-308.

1985

29. Monroe D. L., Prescott J. F., Penner J. L. "Campylobacter jejuni and ---
Campylobacter coli Serotypes Isolated from Chickens, Cattle and Pigs".
J. Clin. Microbiol. 18:877-881. (1983)
30. Penner J. L., Pearson A. D., Hennessy J. N. "Investigation of a Waterbor
ne Outbreak of Campylobacter jejuni Enteritis with a Serotyping Scheme -
Based on Thermostable Antigens". J. Clin. Microbiol. 18:1362-1365.(1983)
31. Patton Ch. M., Mitchell S.W., Potter M. E. "Comparison of Selective Me--
dia for Primary Isolation of Campylobacter fetus subsp. jejuni". J. Clin.
Microbiol. 13:326-330. (1981)
32. Roop R. M. A., Stribert R. M. "Differential Characteristics of Catalasa-
Positive Campylobacters Correlated with DNA homology groups". Can. J. --
Microbiol. 30:938-951. (1984)
33. Robinson D. A., Jones D.M. "Milk-borne Campylobacter Infection". Br. ---
Med. J. 282:1374-1376. (1981)
34. Rubin S. J., Woodard M. "Enhanced Isolation of Campylobacter jejuni by
Cold Enrichment in Campy-thio Broth". J. Clin. Microbiol. 18:1008-1010.
(1983)
35. Ruiz-Palacios G. M., Escamilla E., Torres N. "Experimental Campylobacter
Diarrhea in Chickens". Infect. Immun. 34:250-255. (1981)
36. Shinada K., Tsuji H. "Enrichment for Detection of Campylobacter jejuni".

J. Clin. Microbiol. 23:887-890. (1986)

37. Skirrow M. B. "Campylobacter enteritis: a "new" disease". Br. Med. J. 2: 9-11. (1977)
38. Sribert R. M. "The Genus Campylobacter". Ann. Rev. Microbiol. 32:673-709 (1978)
39. Sribert R. M.
 "Genus Campylobacter"
 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology
 Krieg N. R., Holt J. G. (edits)
 Vol. 1
 Baltimore, Williams and Wilkins (ed)
 pp 111-118
 1986
40. Svedhem A., Kaijser B. "Campylobacter fetus Subspecie jejuni: A Common Cause of Diarrhea in Sweden". J. Infect. Dis. 142:353-359. (1980)
41. Torregrosa L. F., Olarte J., Rodriguez R. S., Santos J. P.
 "Enfermedades Diarreicas en el niño"
 9ª edición.
 Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México "Federico Gómez"
 (1988)
42. Walker R. I., Blake M. "Pathophysiology of Campylobacter Enteritis". Microbiol REV. 50:81-94 (1986)
43. Wang W. L., Reller L. B. "Evaluation of Transport Media for Campylobacter jejuni in Human Fecal Specimens". J. Clin. Microbiol. 18:803-807. (1983)
44. Wang W. L., Luechtefeld N. W. "Effect of Incubation Atmosphere and Temperature on Isolation of Campylobacter jejuni from Human Stool". Can. J. Microbiol. 29:468-470. (1983)