

3  
29

05341



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO  
DE Campylobacter jejuni DE AISLAMIENTOS CLINICOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
ESPECIALISTA EN BIOQUIMICA CLINICA

P R E S E N T A :

JORGE ARMANDO ORTIZ MEZA



MEXICO, D. F.

1992

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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

## RESUMEN

Con el objeto de conocer la susceptibilidad antimicrobiana de *Campylobacter jejuni*. Se investigaron los aislamientos clínicos, provenientes de una comunidad periurbana de la Ciudad de México, para lo cual se empleó la técnica de dilución en agar. Se incluyeron 61 muestras (normales y diarreicas) aisladas entre 1989 y 1990, así como 29 cepas diarreicas aisladas y almacenadas en 1985 (4 cepas), 1986 (15 cepas), y 1991 (10 cepas); con el propósito de comparar la susceptibilidad actual a los tres antibióticos más utilizados para su tratamiento, con la susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos previos.

De las 61 cepas de *C. jejuni* probadas, 29 provenían de niños con enfermedad diarreica y 32 de niños asintomáticos, las cuales resultaron altamente sensibles a cloranfenicol, ciprofloxacina, norfloxacina, gentamicina, amikacina, sulfametoxazol; moderadamente resistentes a cefotaxima (4.91%), TMP/SMX (13.11%), doxiciclina (14.75%), metronidazol (14.75%), ampicilina (16.39%) y eritromicina (22.95%) y una resistencia elevada a tetraciclina (60.65%), trimetoprim (100.0%) y cefalotina (100.0%).

No se encontró diferencia significativa al comparar la resistencia entre muestras provenientes de niños con diarrea y sin diarrea. La mayoría de las cepas fueron resistentes de 2 a 5 antibióticos; sin embargo, no se observó un patrón de resistencia común.

La resistencia a eritromicina, tetraciclina y ampicilina, antibióticos de elección para el tratamiento de infecciones graves por *Campylobacter* mostró una resistencia creciente al comparar los aislamientos diarreicos de 1985 con los actuales. En 1985 solo se encontró resistencia a tetraciclinas, en 1986 se agregó resistencia a eritromicina, en 1989 aparece resistencia a ampicilina no detectándose resistencia a eritromicina y en 1990-1991, (n=18), se encontró resistencia a ampicilina (11.11%), tetraciclina (55.55%) y eritromicina (33.33%).

El aumento de resistencia en los últimos años indica la necesidad de conocer en forma periódica la susceptibilidad de *C. jejuni* a los antibióticos más comunes y de acuerdo a ésta recomendar guías de tratamiento.

## ABSTRACT

*Campylobacter jejuni* is a common cause of diarrhea, specially in children of developing countries. Although most cases are mild self-limiting, prolonged illness with severe symptoms and relapses may occur. Erythromycin is considered the drug of choice in *Campylobacter* enteritis; the broad-spectrum fluoroquinolones have also been used, although emergence of resistance during therapy has been reported.

We studied the *in vitro* susceptibilities of 61 *Campylobacter* strains isolated in 1985 to 1991 from a cohort of children from a suburb of Mexico City, by the agar dilution method. Antibiotics tested were erythromycin, ampicillin, cephalothin, cefotaxime, amikacin, gentamicin, metronidazole, chloramphenicol, tetracycline, doxycycline, ciprofloxacin, norfloxacin, trimethoprim, sulfamethoxazole, and cotrimoxazole (TMP/SMX).

*C. jejuni* strains remained susceptible to aminoglycosides, most  $\beta$ -lactams, and quinolones (ciprofloxacin MIC<sub>50</sub> 0.25  $\mu$ g/ml, norfloxacin 0.20  $\mu$ g/ml) over the 5-year period. The proportion of resistant strains were: erythromycin 23%, tetracycline 65%, and ampicillin 15%. When resistance was compared throughout the 5 years, we found an increment in resistant strains, specially to erythromycin (0% in 1985 to 50% 1991), and ampicillin (0% in 1985 to 50% in 1991).

This data questions the use of erythromycin, ampicillin and tetracycline as the first drugs of choice in the treatment of *Campylobacter* enteritis. Although a high susceptibility to quinolones was found among isolates, the acquisition of resistance during therapy may limit its use; other antibiotics should be tested.

## I N D I C E

	PAGINA
<b>INTRODUCCION</b>	2
Importancia Clínica	3
Epidemiología	6
Susceptibilidad Antimicrobiana	8
<b>JUSTIFICACION</b>	11
<b>HIPOTESIS</b>	11
<b>OBJETIVOS</b>	12
<b>METODOLOGIA</b>	13
<b>RESULTADOS</b>	19
<b>DISCUSION</b>	34
<b>CONCLUSIONES</b>	39
<b>APENDICES</b>	41
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	49

## INTRODUCCION

### CARACTERISTICAS DE *CAMPYLOBACTER SP.*

El género *Campylobacter*, fue propuesto en 1963 para un grupo de microorganismos gram negativos que habían sido clasificados inicialmente como *Vibrio fetus* (62). Una década después, Veron y Chetelain (72) describieron un sistema de clasificación para *Campylobacter*, reconociendo a cuatro especies. En 1977 Skirrow, confirmó que una de las especies: *Campylobacter jejuni*, era el agente etiológico en la mayoría de enteritis humanas (54). Desde entonces se han agregado varias especies que comparten con el la forma de espiral, se diferencian y caracterizan con pocas pruebas fenotípicas, debido a que son no sacarolíticos. Estas pocas características fenotípicas son insuficientes y poco confiables ya que el análisis genético y filogenético no respalda totalmente dicha clasificación.

El género *Campylobacter* ha sido propuesto para el grupo de bacterias gramnegativas, cuya forma es curva, de espiral o de S, con un tamaño de 0.2  $\mu\text{m}$  a 0.5  $\mu\text{m}$  de ancho y 0.5 a 5.0  $\mu\text{m}$  de largo, pueden formar cadenas de diferentes longitudes, son móviles, no esporuladas (25), con un contenido de guanina de 28 a 38 mol. % de DNA. Algunas especies adoptan formas cocoides en cultivos incubados por más de 72 horas. Estas células presentan un sólo flagelo polar desvainado en uno o ambos extremos y la movilidad es extremadamente rápida, con un estilo de sacacorchos o dardo. Son generalmente microaerófilicos; sin embargo, algunos pueden desarrollarse en condiciones aeróbicas en un subcultivo después de su primoaislamiento, aunque algunas especies pueden crecer anaeróbicamente en medios suplementados con fumarato o con formato, ya que pueden utilizar aminoácidos o intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico como fuentes de carbono, debido a que carecen de la capacidad de fermentar u oxidar glucosa.

La temperatura óptima de crecimiento es 37 °C, todas las especies son oxidasa positivas, y se emplea para su diferenciación las pruebas de catalasa, producción de H<sub>2</sub>S, reducción de nitratos, hidrólisis de hipurato, susceptibilidad de ácido nalidixico y cefalotina (28,33,36,52,76)

El género *Campylobacter* se ha clasificado en dos grupos: El primero, en el que incluyen las verdaderas campylobacterias, y a su vez se subclasifica en dos grupos:

Subgrupo 1a. Incluye especies enteropatógenas termofílicas como: *C. jejuni*, *C. laridis*, *C. coli* y *C. upsaliensis*. Estas cuatro especies tienen la habilidad de desarrollarse a 42 °C y causar enteritis en los humanos.

Subgrupo 1b. Incluye las especies tipo del género *C. fetus* y cuatro especies más: *C. hyointestinales*, *C. sputorum*, *C. mucosalis* y *C. cosicus*. Este subgrupo comprende bacterias comensales o patógenas.

El segundo grupo lo constituyen: *C. nitrofigilis* y *C. cryaerophila* (psicrofilas), campilobacterias no verdaderas como *C. pylori* y *C. mustelae* (actualmente *Helicobacter*), además de *C. cinedi* y *C. fennelliae*, especies en las que aún existen dificultades para su clasificación.

#### IMPORTANCIA CLINICA.

En el género *Campylobacter* se reconocen 13 especies diferentes (54), siendo solo algunas las especies involucradas en enfermedades humanas, el grupo de campylobacter nitrato negativo son los que más se asocian con enfermedades diarreicas. El prototipo de *Campylobacter* enteropatógeno es la especie *jejuni*, que desarrolla en condiciones microaerofílicas y a 42 °C.

*Campylobacter jejuni* es uno de los patógenos entéricos que con frecuencia se asocia a enfermedades diarreicas en humanos su distribución es universal. El cuadro clínico que producen se caracteriza por: dolor abdominal, fiebre, náuseas y en algunas ocasiones vómito (33,56,59,77). Este microorganismo puede ser aislado de muestras fecales con o sin presencia de sangre, su frecuencia ocupa uno de los primeros lugares comparada con los casos de enfermedades diarreicas provocadas por *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* enteropatógena y enterotoxigénica, *Vibrio cholerae* y rotavirus en edad pediátrica (30,31,33,34,49,51).

La infección ocasionalmente se asocia con hemorragia intestinal y al estudio anatómo-patológico la inflamación del apéndice es poca o ninguna, sin embargo afecta a la totalidad del intestino desde el yeyuno hasta el ano. A la rectoscopia, la mucosa del colon aparece friable o con erosiones superficiales. Por microscopia electrónica pueden verse microorganismos en forma de coma en la mucosa y en la lámina propia. Al microscopio óptico, puede haber abscesos en las criptas del colon y úlceras semejantes a las de la colitis ulcerosa crónica. Las biopsias de intestino delgado muestran hiperemia, edema e infiltrados inflamatorios de neutrófilos, linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia, con cierta disminución de la relación cripta-vellosidad. En la mayoría de los neonatos se presenta fiebre y muestras fecales con sangre. La presencia de fiebre elevada y persistente ocurre generalmente al principio de la enfermedad (64).

En países en desarrollo como el nuestro, el aislamiento de *C. jejuni* se asocia menos a presencia de diarrea en niños menores de cinco años (3,79), asumiéndose que la infección a edades tempranas produce un estímulo antigénico a nivel intestinal que previene diarrea, aunque no de colonizaciones a edades posteriores. De esta diferencia de manifestaciones clínicas en niños, entre países en desarrollo e industrializados, se ha



originado el planteamiento de varias hipótesis como: Variaciones del microambiente intestinal (acidez gástrica, moco intestinal, peristaltismo, competencia bacteriana, inmunidad intestinal), factores específicos en leche materna humana, factores de ambiente, estado nutricional, hábitos higiénicos, estatus socioeconómico, etc. (31,51).

El diseño del estudio realizado en México por un grupo de investigadores (17), ofrece la oportunidad de estudiar la incidencia de infección y enfermedad por *C. jejuni* (18 a 28% en niños menores de dos años) en niños de un país en desarrollo, además de dar a conocer las diferentes manifestaciones clínicas en niños menores de dos años y adultos jóvenes de países desarrollados y subdesarrollados. Un ejemplo de estas manifestaciones clínicas es el número de episodios diarreicos (40,000 episodios / 100,000 habitantes) en países como el nuestro, donde la enfermedad es más frecuentemente limitada a niños menores de cinco años y se presenta como diarrea acuosa leve, a diferencia de los países industrializados en donde la enfermedad se presenta con mayor frecuencia en adultos jóvenes y niños menores de dos años, con menos episodios diarreicos (50 episodios / 100,000 habitantes) y generalmente mucosanguinolenta (16). Con este y otros estudios realizados por el mismo grupo de investigadores dan a conocer una asociación entre enfermedad y factores de virulencia como: Adherencia a células HEP-2, invasividad, producción de enterotoxina tipo cólera (16,19,45,63).

Reportes esporádicos han informado de complicaciones por extensión local, como: colecistitis, pancreatitis y cistitis. Así mismo se han reportado casos de artritis que ocurren varias semanas después de la infección entérica en personas que presentan antígenos de histocompatibilidad HLA-B27, hepatitis, nefritis intersticial, síndrome entérico-hemolítico así como el síndrome de Guillain-Barré, (7,9,23,34,35,50).

## EPIDEMIOLOGIA.

La Campylobacteriosis es una zoonosis de distribución mundial, comprobándose por el aislamiento de los mismos serotipos o biotipos en humanos (1,20,47), *Campylobacter jejuni* se encuentra como comensal del tracto gastrointestinal de animales salvajes o domésticos como: cabras, becerros, perros, gatos, monos, ganado vacuno y toda variedad de aves. La infección primaria en estos animales ocurre a menudo al inicio de la vida y puede ser causante de morbilidad o mortalidad, pero la mayoría permanece como portador permanente, desarrollando una inmunidad específica. Este vasto reservorio en animales es probablemente el último hábitat para la mayoría de infecciones entericas humanas provocadas por *Campylobacter jejuni* (8,38). La carne proveniente de animales con campylobacteriosis entérica se contamina con el contenido intestinal durante los procesos de matanza, y es una de las principales vías de infección para el humano (8), el agua de ríos, lagos, arroyos, etc. y el suelo contaminado con materia fecal de animales contaminados constituyen las vías más frecuentes. La leche no pasteurizada ya sea de cabra o de ganado vacuno, queso, carne mal cocida principalmente de aves de corral (pollo), son también otras vías de infección para el humano.

La transmisión por contacto directo con animales infectados ocurre principalmente con excreciones de animales caseros como perros jóvenes, gatos, roedores y pájaros con o sin diarrea.

Las personas que debido a su ocupación están expuestas a ganado vacuno, becerros y otros animales, por ejemplo Veterinarios, personal de Laboratorio, etc. presentan un riesgo incrementado a adquirir la infección.

Aunque los mecanismos de transmisión aún no son conocidos en detalle, la infección puede ser transmitida de persona a persona y de animales a humanos, ocurriendo generalmente en infantes, confirmado mediante serotipificación (1,12,20,44,47,58)

Las infecciones de *Campylobacter jejuni* ocurren en el primer año de vida en países en desarrollo, a diferencia de los estudios realizados en poblaciones desarrolladas donde se presenta la mayor incidencia en niños de un año y en personas de 15 a 29 años de edad, en ambas poblaciones se observa una mayor incidencia de infección en verano (3).

Un contraste marcado son los resultados de estudios en países en desarrollo como el nuestro, donde el aislamiento de *Campylobacter jejuni* de personas sanas es mucho más común y es especialmente pronunciado en los primeros 5 años de vida (8,34,35,51). En estos países endémicos, la infección ocurre al inicio de la vida siendo con frecuencia sintomáticos y posteriormente la mayoría de las infecciones de forma asintomática. La diferencia de relación infección / enfermedad en países desarrollados y en desarrollo aparece principalmente con la edad o más bien a la exposición relacionada a la inmunidad (79). Esto ha llevado al planteamiento de diversas hipótesis, siendo evidente que se requieren estudios a largo plazo para determinar los factores que condicionan la expresión clínica de un microorganismo enteropatógeno como *Campylobacter jejuni* y explicar así el hallazgo de estos organismos en niños sin manifestaciones de enfermedad diarreica.

## SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.

*C. jejuni* es la especie que con más frecuencia se ha relacionado con resistencia, sugiriendo ser de origen intrínseco o adquirido, es decir, el resultado de una mutación cromosómica o a la adquisición de un ADN externo (plásmido o transposón). Todas las cepas de *C. jejuni* y de *C. coli* son consistentemente resistentes en forma natural a bacitracina, novobiocina, rifampicina, estreptomycin, trimetoprim, vancomicina y cefalotina, por lo que la combinación de estos antibióticos se utiliza para favorecer el primoaislamiento. Existe poca información acerca de los mecanismos involucrados en dicha resistencia y se ha propuesto que involucran la inhabilidad de penetración de la(s) droga(s) a través de la membrana de *Campylobacter* spp.

La prevalencia de patógenos entéricos en niños escolares que viven en zonas rurales es elevada. Siendo *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, los que en la actualidad se presentan con mayor frecuencia (17,52). En la mayoría de estos pacientes no es recomendable tratarlos ya que no se ha observado diferencia en la duración de la enfermedad (4,27,53). Esta enfermedad tiene un curso autolimitado y por lo tanto cuando se obtienen los resultados de un estudio bacteriológico, el paciente ya no presenta los síntomas característicos del cuadro clínico, eludiendo de esta manera el tratamiento. Se cree que el tratamiento que recibe el paciente, únicamente acorta el tiempo de excreción (57), modificando la persistencia de estado de portador (6,79). Los pacientes recomendables para recibir tratamiento son aquellos con campylobacteriosis entérica severa y en campylobacteriosis extraintestinal, estos pacientes se les trata con agentes como tetraciclina y eritromicina, como primera opción y como segunda cloranfenicol, ciprofloxacina y gentamicina. Sin embargo cada vez es más común que se informe de

la existencia de microorganismos resistentes a tetraciclina y a eritromicina (65), ya que un estudio realizado en Canada (39), con cepas aisladas en el hospital for Sick Children en 1978 y 1979 determinaron que el 20% de las cepas probadas, presentaron resistencia a 4 µg/ml de tetraciclina y el 12% a una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 64 a 256 µg/ml. En contraste con Bélgica (70), se demostró que solo el 5% de cepas de *C. jejuni* en aislamientos clínicos presentaban resistencia a tetraciclina; en Suecia en 1979 (75), se encontró que *C. jejuni* era sensible. Por lo que se puede concluir que la resistencia parece tener variaciones geograficas, limitando en consecuencia el uso de este antibiótico en Norteamérica y no así en Europa.

Los estudios de susceptibilidad coinciden en que *C. jejuni* es susceptible a eritromicina, sin embargo se han encontrado cepas resistentes, aunque los porcentajes de resistencia no son uniformes en los diferentes estudios publicados: Esto varia de 0% reportado en 1981 (2) y en 1982 (14) a 0.5% en Edinburgh (13), pasando a 4.2% reportado en 1982 (71) en Bruselas, a 8% en Denver Colorado en 1984 (76) a aproximadamente el 10% en Suecia en 1978 (74) llegando hasta el 12.5% en Israel para 1983 (49). Estas diferencias pueden estar relacionadas al método empleado o a los límites usados para clasificar una cepa como resistente (4 a 8 µg/ml), así como la presencia del cromosoma adjudicado a resistencia.

En 1981 en Canada (39), se encontró resistencia a novobiocina, bacitracina, vancomicina, trimetropim, rifampicina y eritromicina, el 1% de estos aislamientos fueron resistentes a eritromicina y clindamicina, esto fue comprobado por Diana E. Taylor, et al (67), estableciendo además que está resistencia era debida a la presencia de ADN plasmidico, con un peso molecular de 44.7 Kilobases (plásmido MaK175). Así mismo, en Georgia en 1985, (12), no se encontró dicha resistencia en 31 cepas probadas pero se reconocieron cepas resistentes a metronidazol, descritas por

primera vez en 1982 (32,37), dichos microorganismos además de contener plásmidos de 38 megadaltones, con secuencias comunes de bases, pertenecían a serotipos específicos de *campylobacter* (12,32,44). La susceptibilidad a los aminoglicósidos, cloranfenicol, ampicilina, doxiciclina, ha sido muy variable (43,73). La resistencia de *C. jejuni* a ampicilina no se ha encontrado relacionada a la presencia de algún plásmido y se cree que puede ser de origen cromosómico (12,66,68).

El ácido nalidixico, que se empleaba para diferenciar *C. jejuni* de *C. coli*, ha dejado de ser útil para este efecto, debido al creciente reporte de resistencia de *C. jejuni* a este antibiótico.

Los fenómenos de transferencia genética y la aparición de mutantes en las bacterias han dado lugar a la aparición de cepas resistentes a uno o varios antimicrobianos, debido al uso generalizado de éstos, tanto en la comunidad como en el hospital, esto obliga a conocer el patrón de susceptibilidad de las cepas aisladas en los casos clínicos frente a los antimicrobianos disponibles, teniendo en consideración que tal patrón varía ampliamente dentro de la misma especie y aún del sitio y origen donde se aísla el microorganismo (66).

Debido a lo descrito anteriormente es necesario conocer los patrones de susceptibilidad prevalente en aislamientos provenientes de infecciones en nuestro país, con el fin de establecer recomendaciones respecto al tratamiento más apropiado.

## JUSTIFICACION

Las infecciones por *C. jejuni* requieren con frecuencia el uso de antimicrobianos, especialmente aquellos pacientes con fiebre, diarrea sanguinolenta, con 4 o más evacuaciones al día, o quienes han tenido síntomas por más de una semana (61).

Esta población puede beneficiarse entonces del uso de antimicrobianos, por lo que es necesario conocer los patrones de susceptibilidad locales para prescribir el tratamiento adecuado especialmente cuando la sensibilidad a eritromicina parece estar disminuyendo (2,14,26,49,64).

La presencia de enfermedad parece estar relacionada con la expresión de ciertos factores como son la capacidad de adherirse, la de producir toxinas y otras que están codificadas extracromosómicamente por lo que la expresión de resistencia pudiera estar relacionada también a este tipo de factores y por tanto las cepas virulentas (capaces de producir diarrea) ser más resistentes.

## HIPOTESIS

El uso creciente de antibióticos favorece la selección de *Campylobacter jejuni* resistente (2-5,12). La resistencia puede depender de algún factor relacionado con virulencia por lo que probablemente los microorganismos resistentes sean con más frecuencia causantes de infecciones sintomáticas en comparación con los microorganismos susceptibles que solamente colonizan.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de resistencia de las cepas de *C. jejuni*, aisladas de muestras fecales de niños provenientes de una población periurbana de la Ciudad de México, a los agentes antimicrobianos de mayor uso en su tratamiento, así como establecer posibles diferencias en la susceptibilidad dependiendo de la capacidad de producir o no diarrea.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Comparar las CIM entre los aislamientos provenientes de infecciones sintomáticas con las asintomáticas.
- 2) Comparar las CIM entre los aislamientos provenientes de muestras sintomáticas de los años de 1985, 1986, 1989, 1990 y 1991. Para los antibióticos de mayor uso en el tratamiento de dichas infecciones.



## METODOLOGIA

### POBLACION.

Se estudió un grupo de cepas procedentes de heces de niños con edad de cero a dos años de una comunidad periurbana situada al suroeste de la Ciudad de Mexico. Como parte de otro estudio (17), un trabajador de campo visitará dos veces por semana al ama de casa para entrevistarla y recolectar una muestra de heces fecales entre Octubre de 1988 a Diciembre de 1991, en caso de ser una muestra diarreica por cumplir los requisitos como: Niños con menos de dos años de edad con cuatro o más evacuaciones líquidas por día o con una o más evacuaciones diarreicas con sangre. Tomando como término del episodio el quinto día con menos de tres evacuaciones por día y la ausencia de sangre.

Todas las muestras se mantenían en medio de transporte de Cary-Blair a 4°C hasta antes de la inoculación, a los medios como Campy-Bap, McConkey, X.L.D. y gelosa sangre con ampicilina para las muestras diarreicas, con el fin de identificar a través de procedimientos estandarizados, microorganismos capaces de provocar diarrea tales como: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Aeromonas* y *Rotavirus* (Identificación de Antígeno en el sobrenadante de las muestras).

Los aislamientos se dividieron en dos grupos: Grupo I.- Muestras provenientes de niños con diarrea (muestras diarreicas). Grupo II.- Muestras provenientes de niños asintomáticos (muestras no diarreicas definidas como aquellas que no presentaban una consistencia líquida, sangre y el número de evacuaciones no excedieran de tres diariamente). En el grupo de episodios diarreicos se tomaron además muestras prediarreicas (muestras recolectadas por lo menos cuatro semanas antes de la muestra diarreica) y/o postdiarreica (muestra recolectada por lo menos

cuatro semanas despues de la última muestra diarreica). Para conocer si los microorganismos resistentes en comparación con los susceptibles se asociaban con más frecuencia a diarrea. En los niños con episodios no diarreicos se seleccionaron por lo menos dos muestras con una diferencia mínima de 28 días para buscar diferencias de susceptibilidad en aislamientos consecutivos (56) (figura 1).

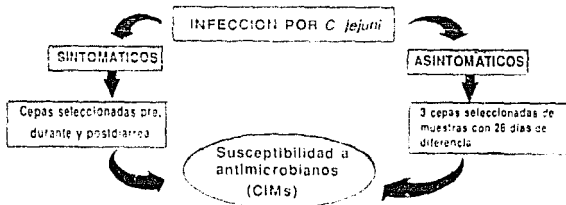


Fig. 1. Selección de cepas de *C. jejuni*, de acuerdo a síntomas

Los criterios establecidos para la identificación de campylobacter fueron: morfología colonial, morfología microscópica, prueba de oxidasa, catalasa, e hidrólisis de hipurato positivas, desarrollo a 42°C en atmósfera microaerofílica por 48 horas (43,58), (apéndices 1-3) (41).

Las cepas aisladas de campylobacter se mantuvieron en medio de BHI-glicerol al 15% a -70°C (apendice 4) hasta antes de ser cultivadas para probar sensibilidad antimicrobiana, para lo cual se inocularon en los medios de gelosa sangre y Campy-Bap.

Se tomaron de dos a tres colonias que cumplieran los criterios ya establecidos, y se preparó una suspensión bacteriana en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (apendice 5) (22), correspondiente a la turbidez del tubo número dos del nefelometro de MacFarland, que contiene  $600 \times 10^6$  bacterias/ml.

**PREPARACION DE PLACAS DE AGAR  
CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ANTIBIOTICO.**

Se prepararon placas de agar Mueller-Hinton (BIOXON S.A. de C.V.) suplementado con polienriquecimiento (ERLIC, S.A.) más el antibiótico en diferentes concentraciones. La cantidad a utilizar de cada uno de los antibióticos para preparar las diferentes diluciones dependió de la potencia de la sal y de la concentración deseada de cada uno de los antibióticos. Para ello se empleó la siguiente fórmula:

$\text{Peso en gramos} = (\text{Concentración} \times \text{Volúmen} / \text{Potencia}) / 1000.$

**EJEMPLO: AMIKACINA**

Volúmen total = 25 ml.

Concentración = 6.2 µg/ml.

Potencia = 630 µg/mg.

$\text{Peso} = (6.2 \times 25 / 630) / 1000$

Peso = 0.00024 g.

En la tabla 1 se muestran los antibióticos empleados y los intervalos de concentración de antibióticos utilizados (apendice 6) (6):

TABLA 1

ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS EN LA VALORACION DE SUSCEPTIBILIDAD A *C. jejuni*.

ANTIBIOTICO	INTERVALOS DE DILUCION EN µg/ml.	
AMITACICINA	2.125 -----	256.0
ERITROMICINA	0.25 -----	1024.0
CLORAMFENICOL	0.025 -----	64.0
TETRACICLINA	0.125 -----	512.0
DOXICICLINA	0.125 -----	64.0
NORFLOXACINA	0.125 -----	32.0
CIPROFLOXACINA	0.016 -----	8.0
GENTAMICINA	0.125 -----	32.0
TRIMETOPIM/ SULFAMETOXAZOL	0.125/1.56 --	160/800
TRIMETOPIM	0.5 -----	512.0
SULFAMETOXAZOL	0.5 -----	1024.0
AMPICILINA	0.125 -----	512.0
CEFALOTINA	0.25 -----	1024.0
CEFOTAXIMA	0.0625 -----	64.0
NETRONIDAZOL	0.125 -----	256.0

INOCULACION BACTERIANA.

La placa de agar con la concentración de antibiótico deseada se inoculó con 10 µl utilizando el replicador de Steers, correspondiendo a un inóculo final de 600,000 U.F.C. (41). De tal manera que se depositaron 36 cepas diferentes por placa. El procedimiento se repite para todas las placas con antibiótico, una vez inoculadas se incubaron a 42 °C., por 48 horas en condiciones de microaerofilia (21,26,55,76,77). Siguiendo las normas de la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards).

CONTROL DE CALIDAD

Las cepas control utilizadas (tabla 2) para medir la reproducibilidad de esta técnica fueron: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), que se emplearon siempre bajo las mismas condiciones que las cepas problemas (49).

TABLA 2

INTERVALO DE CIM ( $\mu\text{g/ml}$ ) PARA LAS CEPAS TIPO DE LA ATCC\*

ANTIBIOTICO	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)
AMIKACINA	-----	0.5 --- 4.0	2.0 --- 8.0
ERITROMICINA	0.12 --- 0.5	-----	-----
CLORAMFENICOL	-----	2.0 --- 8.0	-----
TETRACICLINA	0.25 --- 1.0	1.0 --- 4.0	8.0 -- 32.0
DOXICICLINA	0.06 --- 32.0	0.5 -- 256.0	2.0 -- 128.0
NORFLOXACINA	0.5 --- 2.0	0.03 --- 0.12	1.0 --- 4.0
CIPROFLOXACINA	0.12 --- 0.5	0.004 --- 0.015	0.25 --- 1.0
GENTAMICINA	0.12 --- 1.0	0.25 --- 1.0	1.0 --- 4.0
TRIMETOPIM/ SULFAMETOXAZOL	=0.5 / 9.5	=0.5 / 9.5	-----
TRIMETOPIM	1.0 --- 4.0	0.5 --- 2.0	>64.0
SULFAMETOXAZOL	31.0 -- 128.0	8.0 --- 32.0	-----
AMPICILINA	-----	2.0 --- 8.0	-----
CEFALOTINA	0.12 --- 0.5	4.0 --- 16.0	-----
CEFOTAXIMA	-----	0.06 --- 0.25	4.0 -- 16.0

\* AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION.

CIM = CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA.

### INTERPRETACION DE RESULTADOS.

La concentración inhibitoria mínima (CIM) se definió como la más baja concentración del agente antimicrobiano en  $\mu\text{g/ml}$  del cual resultó una inhibición de desarrollo bacteriano observable a simple vista (18,48,71).

TABLA 3

INTERPRETACION DE CIM, ( $\mu\text{g/ml}$ ) PARA LAS CEPAS DE *C.jejuni*

ANTIBIOTICO	RESISTENTE
AMIKACINA	» 64.0
ERITROMICINA	» 8.0
CLORAMFENICOL	» 32.0
TETRACICLINA	» 16.0
DOXICICLINA	» 32.0
NORFLOXACINA	» 16.0
CIPROFLOXACINA	» 4.0
GENTAMICINA	» 16.0
TMP/SMX	» 4.0/20.0
TRIMETOPIM	» 16.0
SULFAMETOXAZOL	» 512.0
AMPICILINA	» 32.0
CEFALOTINA	» 32.0
CEFOTAXIMA	» 32.0
NETRONIDAZOL	» 16.0

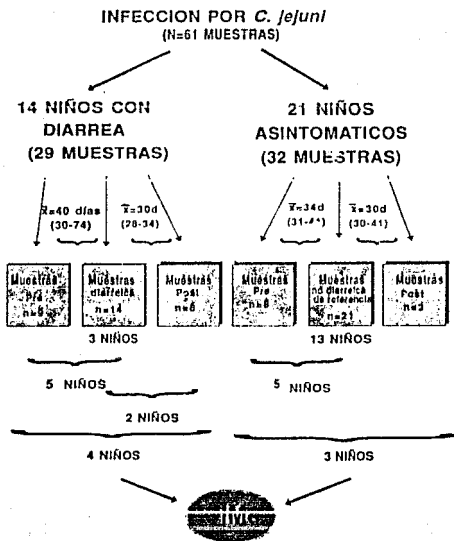
CIM = CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA

## RESULTADOS

### TIPO Y NUMERO DE MUESTRA

Se seleccionaron un total de 35 niños. De los cuales 14 presentaron infección sintomática (diarreica) y 21 infección asintomática por *Campylobacter jejuni*. Del grupo de 14 niños sintomáticos se recuperaron 29 cepas de *C. jejuni* los cuales correspondieron a: fase pre-diarreica 9 cepas/niño (intervalo promedio de 40 días); de la fase post-diarreica (intervalo promedio de 30 días) solo fueron 6 cepas/niño; 14 cepas/niño se recuperaron de la fase diarreica (figura 2).

Del grupo de 21 niños con infección asintomática; solo se recuperaron 32 cepas de los cuales 8 cepas/niño pertenecieron a la fase pre-no diarreica de referencia (intervalo promedio de 34 días); 21 cepas/niño correspondieron a la fase no diarreica de referencia; en la fase post-no diarreica se recuperaron 3 cepas/niño (intervalo promedio de 30 días) (figura 2).



**Fig. 2 Representación esquemática de selección de muestras obtenidas de niños sintomáticos y asintomáticos.**



En la tabla 4, se muestran las CIM<sub>50</sub> y <sub>90</sub> de las 61 cepas de *C. jejuni* probadas así como los intervalos de concentración de antibiótico encontrado.

TABLA 4

CIMs 50 y 90 DE LAS CEPAS DE *C. jejuni* DE TODAS LAS MUESTRAS (DIARREICAS Y NO DIARREICAS)

ANTIBIOTICO	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	INTERVALO
CIPROFLOXACINA	0.0312	0.25	0.0071 - 0.25
NORFLOXACINA	0.10	0.2	0.05 - 4.0
GENTAMICINA	0.25	0.2	0.125 - 2.0
AMIKACINA	1.56	3.125	0.195 - 6.25
CLORAMFENICOL	1.0	2.0	0.50 - 4.0
TETRACICLINA	16.0	32.0	0.25 - 32.0
DOXICICLINA	4.0	2.0	0.125 - 32.0
CEFALOTINA	64.0	64.0	32.0 - 128.0
CEFTOXIMA	4.0	4.0	0.25 - 64.0
AMICILINA	1.0	16.0	0.25 - 64.0
ERITROMICINA	0.25	12.0	0.125 - 64.0
SULFAMETOXASOL	8.0	8.0	4.0 - 16.0
TRIMETOPRIM	64.0	64.0	16.0 - 64.0
IMP/SMX	2.5/12.5	5.0/25.0	0.62/3.1 - 10.0/50.0
NETRONIDAZOL	1.0	4.0	0.125 - 16.0

CIM = Concentración Inhibitoria Mínima en µg/ml.

La susceptibilidad de *Campylobacter* en muestras de niños con y sin diarrea (una muestra por niño); se presenta en la tabla 5.

En la CIM<sub>50</sub> y <sub>90</sub> de ciprofloxacina, de TMP/SMX y en las CIM<sub>50</sub> de norfloxacina, gentamicina, cloranfenicol, ampicilina, además en la CIM<sub>50</sub> de tetraciclina, doxiciclina, trimetoprim y metronidazol, existe diferencia pero no es significativa por la prueba exacta de Fisher ( $P > 0.05$ ). Cefalotina y sulfametoxazol, no presentaron diferencia alguna (CIM<sub>50</sub> y <sub>90</sub>), cuyos valores fueron de 4 µg/ml y 8 µg/ml respectivamente.

TABLA 5

CIMS 50 Y 90 DE CEPAS DE *C. jejuni* PROVENIENTES DE MUESTRAS DE NIÑOS CON Y SIN DIARREA

ANTIBIOTICOS	TIPO DE MUESTRAS			
	DIARRICAS (n=14)		NO DIARRICAS (n=21)	
	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>
CIPROFLOXACINA	0.0625	0.25	0.0312	0.125
NORFLOXACINA	0.1	1.6	0.1	0.2
GENTAMICINA	0.25	1.0	0.25	0.2
AMPICILINA	1.56	3.12	1.56	3.12
CLORANFENICOL	1.0	4.0	1.0	4.0
TETRACICLINA	8.0	32.0	16.0	32.0
DOXICICLINA	16.0	32.0	4.0	32.0
CEFOFOXITIMO	4.0	4.0	2.0	4.0
AMPICILINA	4.0	32.0	4.0	16.0
ERITROMICINA	0.25	32.0	0.25	32.0
TRIMETOPRIM	32.0	64.0	32.0	64.0
TMP/SMX	1.25/6.25	5.0/25.0	2.5/12.5	7.5/37.5
METRONIDAZOL	0.5	4.0	1.0	4.0

Quando se compararon las CIM de las cepas aisladas de muestras diarreas con las no diarreas (pre y/o post) de los mismos niños no se encontró diferencia en cuanto a frecuencia de resistencia para ningún antibiótico. En el caso de ciprofloxacina, norfloxacina y gentamicina la CIM<sub>50</sub> de las cepas de muestras diarreas se encontró 3 diluciones por arriba del necesario para inhibir a las no diarreas aunque aún dentro del intervalo de susceptibilidad (tabla 6). La susceptibilidad de cefalotina y cefotaxima permaneció estable (CIM<sub>50</sub> y ...) siendo de 64 µg/ml y 4 µg/ml respectivamente.

TABLA 6

CIMS DE CEPAS DE *C. jejuni* AISLADAS DE MUESTRAS FECALES DE NIÑOS CON DIARREA

ANTIBIOTICO	E P I S O D I O S			
	DIARRICOS (n=16)		NO DIARRICOS (n=15)	
	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>
CIPROFLOXACINA	0.0625	0.25	0.0312	0.0312
NORFLOXACINA	0.1	1.6	0.1	0.2
GENTAMICINA	0.25	1.0	0.25	0.25
AMIKACINA	1.56	3.12	0.78	3.12
CLORAMFENICOL	1.0	4.0	1.0	4.0
TETRACICLINA	16.0	32.0	16.0	32.0
DOXICICLINA	8.0	32.0	4.0	32.0
AMPICILINA	4.0	32.0	8.0	32.0
ERITROMICINA	0.25	32.0	2.0	32.0
TRIMETOPRIM	32.0	64.0	32.0	64.0
SULFAMETOXASOL	8.0	8.0	4.0	8.0
TMP/SMX	1.25/6.25	5.0/25.0	2.5/12.5	5.0/25.0
METRONIDAZOL	0.25	4.0	0.25	2.0

Al analizar por separado las muestras no diarreicas (pre y/o post) procedentes de pacientes que desarrollaron diarrea se tubieron 9 cepas de *C. jejuni* procedentes de muestras pre-diarreicas con un promedio de 40 dias antes de la diarrea; la susceptibilidad como se observa en la tabla 7 fue semejante al de las cepas provenientes de los niños cuando tenian diarrea, así como las muestras post-diarreicas (6 cepas) con un promedio de 30 dias. Se encontró una diferencia en la susceptibilidad a ampicilina cuya CIM<sub>50</sub> en las cepas pre-diarreicas fue de 32 µg/ml, mientras que en las muestras post-diarreicas fue de 8 µg/ml sin ser estadísticamente significativa de acuerdo a la prueba exacta de Fisher, nuevamente cefalotina y cefotaxima permanecieron sin cambio (tabla 7).

TABLA 7

CIM<sub>50</sub> Y <sub>90</sub> DE CEPAS AISLADAS DE MUESTRAS DE NIÑOS CON DIARREA

ANTIBIOTICO	PRE-DIARREICA (n=9)		DIARREICA (n=14)		POST-DIARREICA (n=6)	
	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>
AMPICILINA	4.0	32.0	4.0	32.0	4.0	8.0
TMF/SMX	2.4/12.5	5.0/25.0	1.2/6.2	5.0/25.0	1.2/6.2	2.5/12.5
METRONIDAZOL	0.25	4.0	0.25	4.0	0.25	2.0
TETRACICLINA	16.0	32.0	16.0	32.0	32.0	32.0
DOXICICLINA	2.0	32.0	8.0	32.0	32.0	32.0
CLOXANFENICOL	1.0	2.0	1.0	4.0	1.0	4.0
CIPROFLACALINA	0.034	0.261	0.252	0.25	0.252	0.194
MORFLOXACINA	0.1	0.2	0.1	1.6	0.1	1.0
GENTAMICINA	0.25	0.25	0.25	1.0	1.0	1.0
AMIKACINA	0.78	3.125	1.56	3.12	1.56	3.12
TRIMETROPIM	32.0	64.0	32.0	64.0	32.0	64.0
SULFAMETOXAZOL	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0

Para el análisis de frecuencia de resistencia las muestras pre-diarreicas se incluyeron con las diarreicas debido a que tuvieron un patrón de sensibilidad semejante, las post-diarreicas no se incluyeron por ser muy pocas; sin embargo, se presentan por separado en la tabla 8, se compararon también con las muestras procedentes de pacientes que nunca desarrollaron diarrea (tabla 8).

No se encontró diferencia significativa al comparar las cepas aisladas de los diferentes tipos de muestras por la prueba exacta de Fisher  $P \geq 0.05$ .

TABLA 8

PORCENTAJE DE CEPAS DE *C. jejuni* RESISTENTES PROCEDENTES DE MUESTRAS FECALES DIARREICAS Y NO DIARREICAS.

ANTIBIOTICO	TOTAL (n=61)	NO DIARREICA (n=32)	PRE-DIARREICAS Y DIARREICAS (n=23)	POST-DIARREICA (n=6)
ERITROMICINA	22.00%	19.00%	30.00%	17.00%
AMPICILINA	16.00%	12.00%	26.00%	0%
TRIF/GNA	14.00%	9.00%	22.00%	0%
METRONIDAZOL	15.00%	3.00%	35.00%	0%
TETRACICLINA	61.00%	66.00%	70.00%	0%
DOMICICLINA	15.00%	16.00%	17.00%	0%
CEFOTAXIMA	5.00%	3.00%	9.00%	0%

La resistencia a cloranfenicol, ciprofloxacina, norfloxacina, gentamicina, amikacina y sulfametoxazol fue del 0% para todas las cepas aisladas. Para cefalotina y trimetopim fue del 100%.

La mayor parte de los microorganismos procedentes de muestras no diarreicas fueron resistentes a tres antibióticos (46.87%), mientras que en las pre-diarreicas fueron con más frecuencia resistentes a 5 antibióticos (44.4%) y las post-diarreicas a 4 antibióticos (66.0%). No se encontró diferencias entre los grupos en cuanto a la frecuencia a resistencia (tabla 9).

**TABLA 9**

**CEPAS DE *C. jejuni* AISLADAS DE MUESTRAS FECALES RESISTENTES A NINGUN, UNO O MAS ANTIBIOTICOS**

ANTIBIOTICO (6)	CEPAS (%) n=61	NO DIARRERICA n=32	PRE-DIARRERICAS n=9	DIARRERICAS n=14	POST-DIARRERICAS n=6
0	0%	0%	0%	0%	0%
1	0%	0%	0%	0%	0%
2	20.00%	25.00%	11.00%	21.00%	0%
3	39.00%	47.00%	22.00%	36.00%	33.00%
4	26.00%	16.00%	22.00%	36.00%	67.00%
5	15.00%	12.00%	44.00%	7.00%	0%
≥6	0%	0%	0%	0%	0%

De acuerdo a nuestra hipótesis de que la producción de resistencia a antibióticos pudiera estar relacionada a factores extracromosómicos relacionados con factores de patogenicidad, nos propusimos a buscar un patrón común que pudiera sugerir una combinación de resistencia en particular, como puede observarse en la tabla 9 no se encontró diferencia significativa por la prueba de  $\chi^2$  entre alguno de los grupos en niños con o sin diarrea.

**TABLA 10**

**CEPAS DE *C. jejuni* AISLADAS EN 1989 Y 1990 RESISTENTES A NINGUN, UNO O MAS ANTIBIOTICOS**

AÑO	NUMERO DE ANTIBIOTICO						
	0	1	2	3	4	5	6
1989	0%	0%	29.00%	54.00%	12.00%	14.00%	0%
1990	0%	0%	11.00%	30.00%	39.00%	19.00%	0%

En la tabla 10 se puede apreciar que el mayor porcentaje de cepas resistentes aisladas en 1989, se encuentran asociadas con la resistencia a tres antibióticos, a diferencia de las cepas aisladas en 1990 donde el mayor porcentaje de resistencia se encuentra en el grupo de resistencia a cuatro antibióticos. La diferencia marcada entre los dos años se encuentra en el grupo de resistencia a tres, cuatro y cinco antibióticos. Siendo mayor el porcentaje de 1989 para el grupo de tres antibióticos lo contrario de 1990 donde el porcentaje mayor se encuentra en el grupo de cuatro y cinco antibióticos.

TABLA 11

MEDIA GEOMETRICA DE CIM ( $\mu\text{g/ml}$ ) DE CEPAS DE *C. jejuni* DE INFECCION SINTOMATICA Y ASINTOMATICA POR AÑOS

ANTIBIOTICO	S U F C E P T I B I L I D A D (n)							
	S I N T O M A T I C O S				A S I N T O M A T I C O S			
	AÑO (n)		AÑO (n)		AÑO (n)		AÑO (n)	
	1985 (4)	1986 (15)	1989 (6)	1990 (8)	1991 (10)	1989 (15)	1990 (17)	
AMPICILINA	1.0	1.0	2.0	2.9	6.0	0.70	6.50	
ERITROMICINA	1.7	0.94	0.3	0.5	6.0	1.32	0.50	
TETRACICLINA	11.0	6.0	5.0	6.0	14.0	9.08	9.44	

CIM = EXPRESADA EN MEDIA GEOMETRICA.

La CIM de cepas aisladas de *C. jejuni* en los años 1985 a 1991 demostraron ser diferentes (tabla 11) para los antimicrobianos ampicilina, tetraciclina y eritromicina. Esta diferencia fué estadísticamente significativa cuando se compararon entre años (tabla 12), para ampicilina durante 1985 v.s. 1991 con una  $p=0.015$  y 1986 v.s. 1991 con una  $p=0.006$ ; tetraciclina mostró diferencia solo al comparar los años 1986 v.s. 1991 con una  $p=0.007$ . Finalmente eritromicina resultó ser diferente al comparar los años 1985 v.s. 1989, 1985 v.s. 1991, 1986 v.s. 1989, 1986 v.s. 1991 y 1990 v.s. 1991 con una  $p$  entre 0.0007 y 0.011 (figura 3 y 4).

TABLA 12

DIFERENCIA DE SUSCEPTIBILIDAD DE AMPICILINA, TETRACICLINA Y ERITROMICINA, ANALIZADAS POR AÑO EN CEPAS DE *C. jejuni* AISLADAS DE MUESTRAS DIARREICAS.

	A N T I B I O T I C O S							
	AMPICILINA		TETRACICLINA	ERITROMICINA				
	1985/1991	1986/1991	1986/1991	1985/1989	1985/1991	1986/1989	1986/1991	1990/1991
p <sup>*</sup>	0.015	0.006	0.007	0.011	0.03	0.04	0.007	0.003

\* VALOR DE P. POR LA PRUEBA ESTADISTICA T DE STUDENT.

El antibiótico que presentó diferencia estadísticamente significativa fué ampicilina, para las cepas provenientes de niños asintomáticos entre los años 1989 v.s. 1990 con un valor de  $p < 0.0005$  (tabla 11) (figura 5).

Al analizar los valores de CIMs obtenidas para las cepas de *C. jejuni* por la prueba exacta de Fisher en el grupo de muestras normales (pre, no diarreicas y post) no se encontró ninguna diferencia importante; por lo que se decidió considerarlas en un solo grupo de "normales". A este grupo se les comparó las CIMs contra los grupos pre-diarreicas, diarreicas y post-diarreicas mediante la prueba de T de Student. Los resultados encontrados son de importancia para los siguientes antimicrobianos: ampicilina, tetraciclina, gentamicina, doxiciclina y trimetoprim con sulfametoxazol, mostradas en las tabla 13 y 14.



TABLA 13

VALORES PROMEDIOS DE CIM PARA LAS CEPAS DE *C. jejuni* PROVENIENTES DE MUESTRAS NORMALES, PRE-DIARREICAS, DIARREICAS Y POST-DIARREICAS.

ANTIBIOTICO	TIPO DE MUESTRA			
	NORMAL (32)	PRE-DIARREICA (7)	DIARREICA (14)	POST-DIARREICA (6)
AMPICILINA	2.42	6.80	2.91	3.54
TETRACICLINA	9.24	15.64	5.62	22.38
GENTAMICINA	0.23	0.23	3.26	0.39
DOXICICLINA	2.17	1.62	3.38	22.38
ND/SMV	1.60	29.30	1.55	1.30

TABLA 14

VALORES DE P OBTENIDOS MEDIANTE EL ANALISIS DE PRUEBA NO PARAMETRICA CON LOS DIFERENTES ANTIBIOTICOS

TIPO DE MUESTRA	ANTIBIOTICOS				
	AMPICILINA	TETRACICLINA	GENTAMICINA	DOXICICLINA	%NS
NORMAL/PRE-DIARREICA	0.045	<0.0001	N.S.	N.S.	N.S.
NORMAL/POST-DIARREICA	N.S.	0.012	N.S.	<0.0001	N.S.
PRE-DIARREICA/DIARREICA	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	<0.0001
PRE-DIARREICA/POST-DIARREICA	N.S.	N.S.	0.043	0.016	<0.0001
POST-DIARREICA/DIARREICA	N.S.	0.02	N.S.	<0.003	N.S.

\* t Student N.S. = NO SIGNIFICATIVO.

Al realizar el análisis mediante prueba no paramétrica en este caso la t de Student se encontró que la significancia de las CIMs por tipo de muestra resultó ser importante cuando se compararon muestras normales versus pre-diarreicas o post-diarreicas, en ampicilina, tetraciclina y doxiciclina.

La muestra pre-diarreica versus diarreica ó post-diarreica mostraron ser diferentes para TMP/SMX en ambas combinaciones y solo cuando se compararon pre-diarreicas versus post-diarreicas, esta diferencia además fué también importante con gentamicina y doxicilina. Finalmente la comparación post-diarreicas versus diarreicas resultaron con diferencias significativas para tetraciclina y doxiciclina.

Lo que sugiere que en la mayoría de las muestras pre y post-diarreicas resultaron ser más resistentes al compararse con las muestras normales y diarreicas.

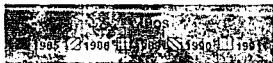
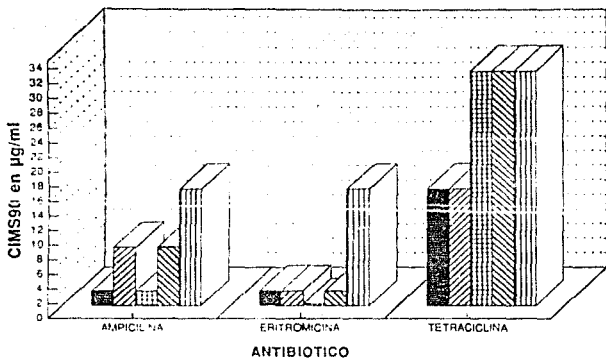


Fig.3 CIM50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) DE AMPICILINA, ERITROMICINA, Y TETRACICLINA DE CEPAS DE *C. jejuni* AISLADAS DE MUESTRAS DE NIÑOS SINTOMÁTICOS DE 1985 A 1991.  
 1985 (n=4), 1986 (n=5), 1987 (n=6) 1988 (n=8), 1989 (n=10), 1990 (n=10), 1991 (n=10)

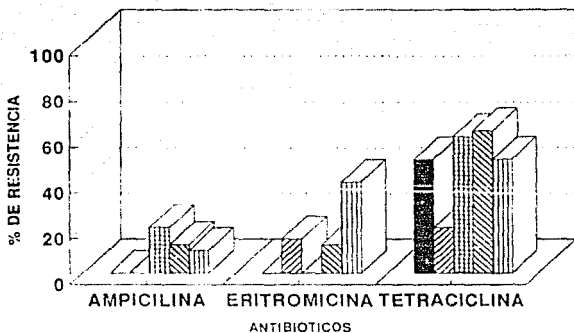
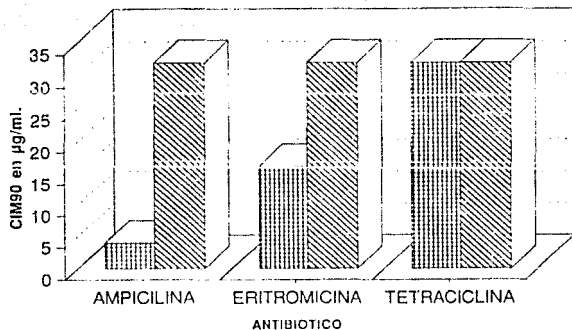


Fig.4 FRECUENCIA DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN 42 CEPAS DE *C.jejuni* AISLADAS DE MUESTRAS DE NIÑOS SINTOMATICOS DE 1985-1991. 1985 (n=4); 1986 (n=15); 1989 (n=6); 1990 (n=8); 1991 (n=10).



**Fig.5 COMPARACION DE CIM90 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) PARA CEPAS DE *C. jejuni* AISLADAS DE MUESTRAS DE NIÑOS ASINTOMATICOS DE 1989-1990. 1989 (n=15); 1990 (n=17).**

## DISCUSION

Se han publicado un gran número de informes concernientes a la susceptibilidad de *C. jejuni* a diversos antibioticos; sin embargo, la frecuencia de resistencia en los aislamientos de este estudio fue mayor que la informada previamente. (14,21,39,71)

Eritromicina es el antibiótico de elección, y en nuestro estudio 22.95% de los aislamientos se encontraron resistentes, lo cual contrasta con lo reportado previamente, donde la frecuencia de resistencia va del 0 al 12.5%. La CIM<sub>50</sub> fue de 32 µg/ml (con límites de 0.125-64 µg/ml); sin embargo algunos autores han informado CIMs de 64 hasta 256 µg/ml.(39).

Las tetraciclinas, otro de los antibióticos utilizados frecuentemente para el tratamiento de infecciones entéricas, tuvieron una pobre actividad en contra de *Campylobacter jejuni* ya que 60.6% de los aislamientos fueron resistentes. La prevalencia de resistencia a este antibiótico es claramente superior a lo ya informado ya que en general no es mayor del 20% (65). Doxiciclina tuvo mejor actividad; sin embargo, 15% de los microorganismos probados se encontraron resistentes, lo cual coincide con lo informado por otros (39).

La actividad de β-lactámicos en general es buena. En relación con ampicilinas la frecuencia de resistencia fue desde 12% en muestras no diarreicas hasta un 26% en muestras diarreicas, en otros países varía de el 0% (46) a 16% en muestras diarreicas (13). La CIM<sub>50</sub> fue de 16 µg/ml similar a la ya informada por otros (14). Los β-lactámicos, especialmente cefalosporinas de tercera generación tienen muy buena actividad, en el caso de cefotaxima se ha informado una resistencia no mayor del 5%, nosotros encontramos una frecuencia del 5%. *Campylobacter* se considera resistente en forma natural a cefalotina ya que el

100% de los microorganismos muestran este comportamiento, nosotros encontramos este mismo comportamiento lo cual era esperable debido a que este antibiótico se agrega rutinariamente a los medios para su primoaislamiento (34). Lo que implica ya una selección previa al eliminar *Campylobacter* sensible a este antibiótico.

La frecuencia de resistencia a los aminoglicósidos probados fue baja en este estudio. La susceptibilidad a cloranfenicol fue igual que a los aminoglicósidos, muy buena. Ya que todos los microorganismos fueron sensibles con una CIM<sub>50</sub> de 2 µg/ml, siendo en promedio dos diluciones menores a lo encontrado por otros (12,14,21,30,39,60,78) y muy similar a lo reportado por Vanhoof (70) denotando probablemente la baja frecuencia con que estos antibióticos son utilizados para el tratamiento de infecciones entéricas en la comunidad.

Metronidazol fue moderadamente activo, encontrándose un 15% de cepas resistentes. Las quinolonas fueron el grupo de antibióticos con mayor actividad ya que no se encontraron microorganismos resistentes, y la CIM<sub>90</sub> fue de 0.25 µg/ml, este hallazgo ha estimulado a muchos autores para utilizar quinolonas, como agentes de primera línea en el tratamiento de infecciones entéricas, debido a su excelente actividad donde ciprofloxacina es uno de los antibióticos más activos (46,60,69,78).

Las CIM<sub>50</sub> para trimetopim y sulfametoxazol fueron de 64 y 8 µg/ml, mientras que el sinergismo mostró una CIM<sub>50</sub> de 5.0/25.0 µg/ml. Sulfametoxazol y la combinación de trimetopim-sulfametoxazol, tienen actividad similar en contra de *Campylobacter jejuni*. Todos los aislamientos fueron resistentes a trimetoprim, en cambio todas fueron susceptibles a sulfametoxazol la combinación de ambos antibióticos mostró un 13% de resistencia, debido a que el punto de corte en la resistencia disminuye a 4/20 µg/ml (TMP/SMX) ya que se espera un efecto

sinérgico. Sin embargo, la resistencia obtenida se encuentra dentro de un rango del 0% al 30% ya que la resistencia en Jerusalem se ha reportado en un 30% (49), en Illinois U.S.A de 0% (30), como es observable existe un amplio rango de variabilidad en cuanto a la resistencia encontrada en los diferentes países.

Al comparar la susceptibilidad de cepas provenientes de muestras diarreicas por años, la frecuencia de resistencia presenta un comportamiento creciente especialmente en eritromicina y ampicilina, ya que era del 0% en 1985 y en 1991 es de un 22.0% y 16.0% respectivamente. Cepas de *C. jejuni* de 1987 y 1988 no se recuperaron (figura 3 y 4). Las tetraciclinas presentaron una baja actividad en contra de *C. jejuni* durante todo este periodo, lo cual refleja la alta prevalencia de resistencia y el efecto "presor" de selección por el uso indiscriminado de este antibiótico en la comunidad (10,11,15).

La resistencia a tetraciclina depende principalmente de ADN extracromosómico potencialmente transmisible; mecanismo que explicaría esta alta prevalencia. En ocasiones se asocia a resistencia a otros antibióticos como eritromicina o ampicilina. En este estudio las combinaciones más frecuentes fueron, tetraciclina-cefalotina-trimetropim (53.3%), cefalotina-trimetropim (100%), tetraciclina-eritromicina (6.55%) y trimetoprim-cefalotina-tetraciclina-ampicilina (11.47%).

Aunque la resistencia a algunos antibióticos esta mediada por plásmidos y podría estar relacionada con otras características de patogenicidad como invasividad, adherencia, producción de toxinas, etc., no logramos demostrar que las cepas provenientes de infecciones sintomáticas fueran más resistentes que las provenientes de infecciones asintomáticas (tabla 8). Al comparar por la prueba t de Student las CIMs de las cepas provenientes de los diferentes tipos de muestra (normales, pre-



diarreicas, diarreicas y post-diarreicas) la diferencia fue significativa en las CIMs; para el grupo de muestras pre-diarreicas la baja susceptibilidad detectada en ampicilina podría explicarse por la presencia de la enzima  $\beta$ -lactamasa, obtenida ya sea mediante conjugación plásmidica "In vivo" o por selectividad de la población de *C. jejuni*. En la necesidad de requerir mayor concentración de TMP/SMX para inhibir el desarrollo de cepas de muestras pre y post-diarreicas probablemente sea debido al aumento de síntesis de la dehidrofolato reductasa; además las muestras post-diarreicas requieren de una concentración mayor de tetraciclina, doxiciclina y gentamicina; para los dos primeros antimicrobianos que inhiben la síntesis de proteína al impedir la unión al ribosoma RNA de transferencia con su aminoácido correspondiente, con lo que no puede haber crecimiento de la cadena polipeptídica, la resistencia es debido a una protección ribosomal que está codificado por plásmidos aunque también se ha propuesto un mecanismo de excreción del antibiótico, siendo posible un decremento en la concentración citoplásmica, reflejando esta baja concentración citoplásmica con el aumento en la CIM. El aumento en la CIM para gentamicina puede deberse a una ligera mutación, en donde se reduce la unión del antibiótico a un ribosoma ligeramente modificado o bien a la disminución en el transporte a través de la membrana. El promedio más elevado de CIM encontrado en estos cinco antibióticos fué en las cepas provenientes de muestras pre y post-diarreicas, predominando en las cepas post-diarreicas, lo cual era esperable ya que en las muestras pre-diarreicas se tienen cepas muy sensibles, poco sensibles y resistentes, debido al tratamiento empírico que las madres dan a los niños durante la diarrea, se eliminan los microorganismos sensibles, quedando únicamente las cepas con una CIM más elevadas y resistentes, por lo que la CIM de las cepas de muestras post-diarreicas es mayor.

Sin embargo la tendencia de resistencia se observó claramente en las figuras 3,4 y 5 , demostrandose que el abuso de antibióticos en la comunidad se ve reflejado en la CIM de los diferentes aislamientos de *C. jejuni* durante los años 1985 a 1991 , para el caso de ampicilina, tetraciclina y eritromicina. Los valores de P más pequeños fueron los obtenidos al compararse con el año 1991, lo que nos sugiere que la resistencia antimicrobiana no solo existe sino que se incrementa. La diferencia para la CIM promedio de ampicilina es altamente significativa en las cepas provenientes de infecciones asintomáticas entre los años 1989 y 1990, siendo nueve veces mayor en 1990. Esto debería ser una llamada de atención para controlar el uso indiscriminado de los antibióticos; educando a la población y restringiendo el uso de estos antimicrobianos.

Los resultados aquí encontrados, apoyan la necesidad de practicar estudios periódicos de susceptibilidad, en centros de referencia, ya que en laboratorios de rutina es difícil por las condiciones de desarrollo que necesita *C. jejuni*. Esto se hace necesario porque cada vez más regiones del mundo informan la presencia de cepas resistentes a diferentes antibióticos y en nuestro estudio los antibióticos de uso común serían con frecuencia ineficaces. La elevada susceptibilidad a quinolonas sugiere que en infecciones graves este grupo de antibióticos deben ser los de elección (7,24,29,42).

#### CONCLUSIONES

- \* No se observaron diferencias importantes en la resistencia para los antibióticos probados, entre aislamientos provenientes de pacientes que desarrollaron o no síntomas.
- \* Tampoco se observaron diferencias entre las concentraciones necesarias para inhibir las cepas provenientes de un mismo paciente independientemente si estas eran o no sintomáticas.
- \* El aumento en la CIM de las cepas de *C. jejuni* provenientes de infecciones sintomáticas durante los años 1985 a 1991 resultaron ser significativamente estadísticos para ampicilina, tetraciclina y eritromicina. En contraste con las infecciones asintomáticas en donde solo se encontró para ampicilina.
- \* Las cepas provenientes de muestras post-diarreicas, presentaron menor susceptibilidad para ampicilina, tetraciclina, gentamicina y doxiciclina.
- \* Con la reserva del número limitado de cepas estudiadas, se puede concluir que las CIMs<sub>50</sub> de aislamientos provenientes de la misma población en distintos años mostraron un aumento en la resistencia a ampicilina y eritromicina.
- \* La frecuencia de resistencia a tetraciclinas encontrada fue alta, y ha permanecido constante desde 1985.

- \* La elevada susceptibilidad a quinolonas sugiere que estos antibióticos podrían ser utilizados como de primera elección en comunidades con una elevada frecuencia de resistencia a otros antibióticos, tomando en cuenta el efecto riesgo/beneficio de estos.
- \* Existe diferencia entre cepas de muestras normales versus pre-diarreicas y versus post-diarreicas en ampicilina, tetraciclina y doxiciclina en estas últimas cepas con una CIM mayor.

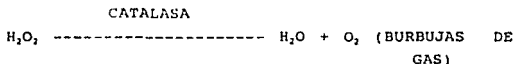
## PRUEBAS DE IDENTIFICACION.

### APENDICE I

#### PRUEBA DE CATALASA

##### PRINCIPIO.

El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo o aeróbico de los hidratos de carbono. Si se deja acumular, el peróxido de hidrógeno es letal para las células bacterianas. La catalasa transforma el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, como lo muestra la siguiente reacción:



##### REACTIVOS.

- 1.- Peróxido de hidrógeno al 30 %, conservando en refrigerador en frasco ambar.

##### TECNICA.

- 1.- Con un aplicador transferir una colonia bien aislada a la superficie de un portaobjeto.
- 2.- Añadir 1 a 2 gotas de peróxido de hidrógeno al 3 %.

##### INTERPRETACION.

La rápida aparición y producción sostenida de burbujas de gas, indica una reacción positiva.

## APENDICE 2

### HIDROLISIS DE HIPURATO

#### PRINCIPIO.

La hipuricasa es una enzima hidrolítica producida por la mayoría de cepas de *C. jejuni*, que provoca la hidrólisis de Hipurato de Sodio con la formación de benzoato de sodio y glicina.

La ninhidrina es un oxidante energético que desamina grupos alfa amino con liberación de  $\text{NH}_3$  y  $\text{CO}_2$ . El amoniaco liberado reacciona con la ninhidrina residual dando un color púrpura. La ninhidrina se utiliza para detectar glicina el único compuesto alfa amino formado por hidrólisis del hipurato. La prueba es sensible y rápida, con interpretaciones posible luego de 2 a 3 horas de incubación a 37 °C.

#### REACTIVOS.

##### 1.- Reactivo de Hipurato de Sodio:

Hipurato de Sodio	1 g.
Agua destilada	100 ml.

##### 2.- Reactivo ninhidrina:

Ninhidrina	3.5 g.
Acetona/Butanol 1:1	100 ml.

#### TECNICA.

- 1.- Inocular una asada de un cultivo de *C. jejuni* en 0.4 ml de reactivo de hipurato de sodio al 1 %.
- 2.- Incubar el tubo durante 2 horas a 37°C.
- 3.- Añadir 0.2 ml. del reactivo ninhidrina y mezclar bien.

#### INTERPRETACION.

La aparición de un color púrpura intenso luego de añadir el reactivo ninhidrina, indica la presencia de glicina y una reacción positiva de hidrólisis de hipurato.

### APENDICE 3

#### CITOCROMO OXIDASA

La prueba de citocromo oxidasa utiliza ciertos reactivos colorantes, como el diclorhidrato de p-fenilendiamina, que actúa como aceptores artificiales de electrones, sustituyendo al oxígeno. La p-fenilendiamina es incolora en estado reducido, pero en presencia de citocromo oxidasa y oxígeno atmosférico se oxida formando azul de indofenol.

#### REACTIVOS.

- 1.- Diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina, al 1%.

#### TECNICA.

- 1.- Añadir unas gotas de reactivo a una tira de papel filtro.  
En la zona donde esta el reactivo se extiende un asa de la colonia sospechosa.

#### INTERPRETACION.

Las colonias bacterianas con actividad de citocromo oxidasa desarrollan en segundos un intenso color azul en el sitio de inoculación.



#### APENDICE 4.

#### MEDIO DE CONSERVACION DE CEPAS.

#### BHI- GLICEROL.

- \* Pesar medio deshidratado para 100 ml de acuerdo a las indicaciones del medio.
- \* Disolverlo en 85 ml de agua destilada.
- \* Aforar a 100 ml con glicerol.
- \* Mezclar.
- \* Distribuir 2 ml del medio en viales
- \* Esterilizar a 15 libras por 15 minutos a 120 °C.
- \* Conservar a temperatura ambiente.

RENDICION 5.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS).

- \* NaCl 9.0 g.
- \*  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (anhidro) 0.23 g.
- \*  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (anhidro) 1.15 g.
- \* Agua desionizada 900 ml.

Al disolver las cantidades antes descritas en agua desionizada, el pH obtenido es de 8.0. Ajustar el pH (7.2-7.4) usando NaOH 1 M o HCl 1M, aforando a 1000 ml. Posteriormente distribuir 10 ml en tubos de ensayo de 75 x 150 mm. para esterilizarlos a 15 lb. o 121 °C por 10 minutos.

APENDICE 6.

PREPARACION DE ANTIBIOTICOS

Sales puras de los siguientes antibióticos:

Amikacina (Bristol de México, S.A. de C.V.), Eritromicina (Bristol de México S.A. de C.V.), Cloramfenicol (Parke-Davis CIA. Medical Campana, S.A.), Tetraciclina (Bristol de México, S.A. de C.V.), Doxiciclina (Pfizer, S.A. de C.V.), Norfloxacin (Merck-México, S.A. de C.V.), Ciprofloxacina (Miles de México, S.A. de C.V.), Gentamicina (Sheramex S.A. de C.V.), Trimetropim (Lilly y CIA. de México S.A. de C.V.), Sulfametoxazol (Lilly y CIA. de México S.A. de C.V.), Trimetropim-Sulfametoxazol (Lilly y CIA. de México S.A. de C.V.), Ampicilina (Bristol de México S.A. de C.V.), Cefalotina (Lilly y CIA. de México S.A. de C.V.), Cefotaxima (Roussel Uclaf S.A. de C.V.), Metronidazol (Rhône-Poulenc Rorer, S.A. de C.V.).

DISOLUCION DE SALES ANTIMICROBIANAS.

ANTIMICROBIANO	SOLVENTE	AFORO
AMIKACINA	AGUA	AGUA
ERITROMICINA	AGUA	AGUA
CLORAMFENICOL	ETANOL	AGUA
TETRACICLINA	METANOL	AGUA
DOXICICLINA	AGUA	AGUA
NORFLOXACINA	AGUA	AGUA
CIPROFLOXACINA	AGUA	AGUA
GENTAMICINA	BUFFER DE PO, pH 8.0 0.1 N.	AGUA
TRIMETROPIM	HCl	AGUA
SULFAMETOXAZOL	NaOH 0.1 N.	AGUA
TRIMETROPIM/ SULFAMETOXAZOL	NaOH 0.1N, HCl 0.05M.	AGUA
AMPICILINA	BUFFER DE PO, pH 8.0 0.1M	BUFFER DE PO, pH 8.0 0.1M
CEFALOTINA	BUFFER DE PO, DE 8.0 0.1 N.	AGUA
CEFOTAXINA	AGUA	AGUA
METRONIDAZOL	AGUA	AGUA

Con las sales puras antes mencionadas se preparó una solución stock para el volumen necesario y tener la concentración deseada en las cajas de petri de (100 mm x 100 mm) con 25 ml en volumen total (agar Mueller-Hinton más el volumen necesario de la solución stock de antibióticos).

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ABBOTT J.D., DALE BAS, ELDRIDGE J., et al. Serotyping of *Campylobacter jejuni/coli*. J. Clin. Pathol. 1980;33:762-6.
- 2.- AHONKHAL V.I., CHERUBIN C.E., SIERRA M.F. et al. In Vitro Susceptibility of *Campylobacter fetus* Subs. *jejuni* to N-Formidoyl Thienamycin, Rosaramicin, cefoperazone, and other Antimicrobial Agents. Antimicrob. Agents Chemother. 1981;20(6):850-1.
- 3.- ALVARADO-ALEMAN F.J., GUARDO-BUSTILLO C., GALINDO EMMA, COL. Frecuencia de Microorganismos enteropatógenos aislados en niños con y sin diarrea aguda. Bol. Hosp. Infant. Méx. 1985;42(6):354-9.
- 4.- ANDERS B. J., PAISLEY J.W., LAUER B. A., RELLER B.L. Double-Blind placebo controlled trial of erythromycin for treatment of *Campylobacter* enteritis. Lancet. 1982;ii:131-2.
- 5.- ANHALT P. JOHN and WASHINTONG II A. JOHN. Preparation and storage of antimicrobial solutions (appendix 1) : In Manual of Clinical Microbiology, BALOWS ALBERT, HAUSLER JR. WILLIAM, HERRMANN KENNETH, et al. ed. American Society for Microbiology, 5th. ed. Washington. D.C. 1991:1199-200.
- 6.- ASHKENAZI S., DANZIGER Y., VARSANO Y., et al. Treatment of *Campylobacter* gastroenteritis. Arch. Dis. Child. 1987;62:84-5.
- 7.- ASHKENAZI S., CLEARY T.G. Antibiotic treatment of bacterial gastroenteritis. Pediatr. Infect. Dis. J. 1991;10(2):140-8.
- 8.- BLASER MJ., TAYLOR D.N., FELDMAN R.A. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections. Epidemiol. Rev. 1983; 5:157.
- 9.- BLASER, MJ. Extraintestinal *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections: Host factors and strain characteristics. J. Infectious Diseases. 1986;153:552.
- 10.- BOJAILIL R., RUIZ-PALACIOS G., CALVA J. J. Antibiotic misuse in diarrhea: A household survey in Mexican community (Enviado a revisión). J. Clin. Epidemiol.
- 11.- BOJAILIL R., CALVA J. J., RUIZ-PALACIOS G., ORTEGA H. Uso de Antibióticos en una comunidad de la ciudad de México: I. Encuesta domiciliaria. (Enviado a revisión). Bol. Of. Panam. Salud.

- 12.- BOPP C.A. In Vitro Antimicrobial Susceptibility, Plasmid Analysis, and Serotyping of Epidemic-Associated *Campylobacter jejuni*. J. Clin. Microbiol. 1985;21(1):4-7.
- 13.- BRUTON W.A.T., A.M.M. WILSON and R.M. MAIRAE. Erythromycin-resistant *Campylobacter*s. Lancet. 1978;ii:1385.
- 14.- BUCK G E, KELLY MT. Susceptibility Testing *Campylobacter fetus subsp. jejuni*, Using Broth Microdilution Panels, Antimicrob. Agents Chemother. 1982; 21(2):274-7.
- 15.- CALVA J. J. CERON E., BOJAIL R., COLS. Uso de Antibióticos en una comunidad de la Ciudad de México: II. Encuesta de compras en farmacias (Enviado a revisión). Bol. Of. Panam. Salud.
- 16.- CALVA J.J., *Campylobacter jejuni*: Reflexiones sobre la infección entérica en los niños mexicanos. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 1991;48(7):455-7.
- 17.- CALVA J.J., RUIZ-PALACIOS G.M., LOPEZ-VIDAL A.B. et. al. Cohort Study of intestinal Infection with *Campylobacter* in Mexican Children. Lancet. 1988;5:503-6.
- 18.- CARLO J., PETERSON R. MOHN M. L., et. al. MCB, for *Staphylococcus aureus* as Determined by Macrodilution and Microdilution Technique. Antimicrob. Agents Chemother. 1984; 26(2):214-9.
- 19.- CERVANTES L.E., CALVA J.J. and RUIZ-PALACIOS G.M., The assesment of virulence Factors for the Definition of Pathogenic Strains in *Campylobacter* Diarrhea. The Vth. International Workshop on *Campylobacter* Infections. (program and Abstracts). 1989:159.
- 20.- CHAN F.T.H., MACKENZIE A.M.R., PENNER J. L., HENNESSY J. N. Usefulness of serotyping in the Epidemiology of Family outbreaks of *Campylobacter jejuni*. J. Infect. Dis. 1984;150(5);790.
- 21.- CHOW W. ANTHONY, PATTON VALERIE and BEDNORZ DOMINICK. Susceptibility of *Campylobacter fetus* to Twenty Two Antimicrobial Agents. Antimicrob. Agents Chemother. 1978; 13(3):416-8.
- 22.- COLIGAN JOHN E., KREUISBEER ADA M., MAKGULIES H. DAVID, SHEVACH ETHAN M., STROBER WARREN. Common Media, Buffers and Stock Solutions: Incurrent Protocols in Immunology (Supplement 1), ed. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. 1991:A.2.5.

- 23.- DAVIES JS., PENFOLS JB. *Campylobacter* urinary infection. *Lancet*.1979; 1:1091.
- 24.- DIJOHN D., LEVINE M. M. Treatment diarrhea. *Infect. Dis. Clin. Nort. Amer.*1988;2(3):719-39.
- 25.- DULAR SHU PANG, CHOU R. and KASATIYA SHANTI. Effect Ferrous Sulfate, Sodium Metabisulfite, and SodioPyruvate on Survival of *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.*1983;18(4):986-7.
- 26.- ELHARRIF ZOUBIDA and MEGRAUD FRANCIS. Characterization of thermophilic *Campylobacter* II. Enzymatic profiles. *Current Microbiol.* 1986;13:317-22.
- 27.- ELHARRIF ZOUBIDA, MEGRAUD FRANCIS and MARCHAND ANNE-MARIE. Susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* to macrolides and related Compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.*1985;28(5):695-7.
- 28.- FERGURSON D. A. and LAMBE D. W. Differentiation of *Campylobacter* Species by Protein Banding Patterns in Polyacrylamide Slab Gels. *J. Clin. Microbiol.* 1984;20(3):453-60.
- 29.- FONTAINE O. Antibiotics in the Management of Shigellosis in Children: What Role for the Quinolones?. *Rev. Infect. Dis.* 1989;II(Suppl.5):S1145-50.
- 30.- FLIEGELMAN R. M., PETRAK R. M., GOODMAN L. J., et. al. Comparative In Vitro Activies of Twelve Antimicrobial Agents Against *Campylobacter* Species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985;27(3):429-30.
- 31.- FLORES-SALORIO S.G., VAZQUEZ-ALVARADO V., MORENO-ALTAMIRANO L. *Campylobacter* como agente etiológico de diarrea en niños. *Bol. Med. Hosp. Infant. Méx.*1983;40(6):315-9.
32. FREYDIERE A. M. In vitro susceptibilities of 40 *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* strains to nitidazole and metronidazole. *Antimicrob. Agents Chemother.*1984; 25(1):145-6.
- 33.- GEORGES M. C., WACHSMUTH K., MEUNIER D.M.V., et. al. Parasitic, Bacterial, and Viral Enteric Pathogens Associated with Diarrhea in the Central African Republic. *J. Clin. Microbiol.*1984; 19(5):571-5.
- 34.- GLASS RI., STOLL BJ, Huq M.I., et. al. Epidemiologic and Clinical features of endemic *Campylobacter jejuni* infection in Bangladesh. *J. Infect. Dis.*1983;148:292.

- 35.- GOOSSENS H., Henocque G., Kreme L., et. al. Nosocomial outbreak of *Campylobacter jejuni* meningitis in newborn infants. *Lancet*.1986;2:146-9.
- 36.- HEBERT G. A., EDMONS P., BRENNER Don. J. DNA Relatedness Among Strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* with Divergent Serogrup and Hippurate Reactions. *J. Clin. Microbiol.* 1984;20(1):338-40.
- 37.- HOF H., V. STICH-GROB and K.M. MUELLER. Comparative In Vitro activities of niridazole and metronidazole against anaerobis and microaerophilic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*1982; 22:332-3.
- 38.- HOPKINS S. R. and SCOTT S. A. Handling Raw Chiken as a Source for Sporadic *Campylobacter jejuni* Infections. *J. Infec. Dis.*1983; 148(4):770.
- 39.- KARMALI M. A., S. De. GRANDIS and P.C. FLEMING. Antimicrobia Susceptibility of *Campylobacter jejuni* with Special Reference to Resistan Patterns of Canadian Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*1981;19(4):593-7.
- 40.- KARMALI M.A., S. De. GRANDIS and P.C. FLEMING. Antimicrobial Susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter fetus* Subsp. *fetus* to eight Cefalosporins to species differentattation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1980; 18:948-51.
- 41.- KONEMAN W. ELMER, ALLEN D. STEPHE, DOWEL R.W., SOMMERS M. HERBERT. Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. 1a. ed. ARGENTINA, 1983:292,302,380-402,415-16.
- 42.- KEUSCH G. T. Antimicrobial Therapy for Enteric Infections and Typhoid Fever: State of the Art. *Rev. Infect. Dis.* 1988; 10(Sppl 1):S199-205.
- 43.- LAI-KING N.G., STILES E. MICHAEL and TAYLOR E. DIANNE. Comparison of Basal Media for Culturing *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Clin. Microb.* 1985;21(2):226-30.
- 44.- LARIVIERE L. A., GANDREAU C. L. TURGEON F. F. Susceptibility of Clinical Isolates of *Campylobacter jejuni* to twenty-five antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents. Chomother.* 1986;18:681-5.
- 45.- LAUWERS S., *Campylobacter* serotyping and epidemiology. *Lancet*.1981; i:158-9



- 46.- LINDBLOM G. B., CERVANTES L. E., SJOGREN E., et al. Adherence, Enterotoxigenicity, Invasiveness and Serogroup Characteristics of *Campylobacter jejuni* and *coli* Strains from Adult patients with Acute Enterocolitis. The Vth International Workshop on *Campylobacter* Infections (program and abstracts). 1989;160.
- 47.- LIND LENA, KAIJSER BERTIL. Comparison of antibiotic sensitivity patten of *Campylobacter jejuni* and *coli* three different countries; Microbial Ecology in Health and Disease, The Vith International Workshop on *Campylobacter Helicobacter* and Related organims. 4 (Special Issue). 1991:570.
- 48.- LIOR H., WOODWARD D. L., EDGAR J. A., et al. Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide Agglutination Based On Heat Labile Antigenic Factors. J. Clin. Microb. 1982;15(5):761-8.
- 49.- LORIAN VICTOR. Antibiotics in Laboratory Medicine, ed. Williams & Wilkins. 3a. ed. Washington D.C. 1991:75-99.
- 50.- MICHAEL S., ROGOL M., DICKMAN D. Susceptibility of Clinical Isolates of *Campylobacter jejuni* to Sixteen Antimicrobial Agents. Antimicrob. Agents. Chemother. 1983;23(5):796-7.
- 51.- MICHALAK DM., PERRAULT J., GILCHRIST M. J., et al. *Campylobacter fetus* and *C. jejuni*: A cause of massive lower gastrointestinal hemorrhage. Gastroenterol. 1980;79:742.
- 52.- MORALES CASTILLO M., GARCIA-PEREZ M., PEDROZA J.L., COL. Frecuencia de *Campylobacter fetus* ss. *jejuni* y *Yersinia enterocolitica* en niños con diarrea agua. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 1984;41(2):86-9.
- 53.- PAI C. H., Sorger S., Lackman L., et. al. *Campylobacter* gastroenteritis in chgildren. J. Pediat. 1979; 94(4):589-91.
- 54.- PAI C.H., GILLIS F., TUOMANEN E., MARKS M. I. Eritromycin in Treatment of *Campylobacter Enteritis* in children. Am. J. Dis. Child. 1983;137:286-91.
- 55.- PENNER JOHN L. *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Spiral bacteria (cap.39) : in Manual of Clinical Microbiology BALOWS ALBERT, HAUSLER JR. WILLIAM, HERRMANN KENNETH, et al. ed. American Society for Microbiology, 5th. ed. Washington. D.C. 1991:402-9.

- 56.- PENNIE A. ROSS, ZUNINO N. JOAO, ROSE EDWARD, et al. Economical, Simple Methal for production of the Gaseous Enviroment Required for Cultivation of *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 1984;20(3):320-2.
- 57.- RETTING P. J. *Campylobacter* infections in human beings. *J. Pediatr.* 1979;94:855-64.
- 58.- RICHARDSON N. J., KOORHOF S. J. and BOKKENHEUSER. Long-Term Infections with *Campylobacter fetus subsp. jejuni*, *J. Clin. Microbiol.* 1981;13(5):846-9.
- 59.- ROOP II, R. M., SMIBERT M. R. and KRIEG R. NOEL. Improved Biotyping Schemes for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Clin. Microbiol.* 1984;20(5):990-2.
- 60.- RUIZ-PALACIOS G. M. Norfloxacin in the Treatment of Bacterial Enteric Infections. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 1986;48:55-63.
- 61.- SAGARA H., MOCHIZUKI AKIHIKO, OKAMURA NOBORU, and NAKAYA RINTARO. Antimicrobial Resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* with Special Reference to Plasmid Profiles of Japanese Clinical Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1987;31(5):713-9.
- 62.- SEVAL and VERON. Citado en Smibert R. M. 1978. The genus *Campylobacter*. *Ann. Rev. Microbiol.* 32:673-709.
- 63.- SOTO L. E., CERVANTES L. E., LOPEZ-VIDAL Y., RUIZ-PALACIOS G. M. Role of outer membrane Proteins (OMPS) and Lipopolysaccharides (LPS) on Adherence and Invasion by *C. jejuni*. The Vth International Workshoop on *Campylobacter* Infections (program and abstracts). 1989:158.
- 64.- ROBBINS, STANLEY L., CONTRAN RAMZI S., KUMAR VINAY. *Patologia estructural y Funcional*, 3ra. ed. Edit. Panamericana, Méx., D.F. 1988, pág. 322.
- 65.- TAYLOR D. E., A. STEPHANIE, DE GRANDE, M. A. KARALI and P. C. FLEMING. Transmissible Plasmids from *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1981;19(5):831-5.
- 66.- TAYLOR D. E. and COURUALIN PATRICE. Mechanisms of antibiotic Resistance in *Campylobacter* Species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988;32(8):1107-12.
- 67.- TAYLOR D. E., GERNER S. R. and ALLAN J. B. Characterization of tetracycline Resistance plasmids from *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicro. Agents Chemother.* 1983; 24(5):930-5.

- 68.- TENOVER F. C., WILLIAMS SUE, GORDON P.K., et. al., Survey of Plasmids and Resistance Factors in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985;27(1):37-41.
- 69.- VAN DER AUWERA and SCORNEAUX B. In Vitro Susceptibility of *Campylobacter jejuni* to 27 Antimicrobial Agents and Various Combinations of  $\beta$ -Lactams with Clavulanic Acid or Sulbactam. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985;28(1):37-40.
- 70.- VANHOOF R., B. GORDTS, R. DIERICKS, H. COIGNAU and J. P. BUTZLER. Bacteriostatic and bactericidal activities of 24 antimicrobial agents *Campylobacter fetus subsp. jejuni*. *Antimicrob. Agents chemother.* 1980;18:118-21.
- 71.- VANHOOF R., B. GORDTS, R. DIERICKS, H. COIGNAU and J. P. BUTZLER. Susceptibility Pattern of *Campylobacter jejuni* from Human and Animal Origins to Different Antimicrobial Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1982;21(6):990-2.
- 72.- VERON M. and R. CHATELAIN. Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Véron and designation of the neotyp strain for the type species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. *Int. J. Syst. bacteriol.* 1973;23:122-34.
- 73.- WALDER M. and FORSGREN. Erythromycin-resistant *Campylobacters* to twenty antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1980;16:37-9.
- 74.- WALDER M. and A. FORSGREN. Erythromycin-resistant *Campylobacters*. *Lancet.* 1978;II:1201.
- 75.- WALDER M. Susceptibility of *Campylobacter fetus subsp. jejuni* to twenty antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1979;18:30-39.
- 76.- WANG L. WENG-LAN, RELLERR, BARTH L. and BLASER J. M. Comparison of Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1984;26(3):351-3.
- 77.- WOKER R., CALDWELL M. B., LEE EILEEN C., et. al. Pathophysiology of *Campylobacter* Enteritis. *Microbial. Rev.* 1986;50(1):81-94.
- 78.- PAGE J. WILLIAM, HUYER GREGORY, HUYER MARIANNE and WOROBEC A. E. Characterization of the Porins of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and Implications for Antibiotic Susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989;33(3):297-303.

79.- ZAMORA-CHAVEZ A., GALINDO-HERNANDEZ E., MEJIA-ALBARRAN  
M.E.COL. Infeccion por *Campylobacter jejuni*. Bol. Med.  
Hosp. Infant. M6x.1987;44(3):155-60.