

No. Adq. 78
No. Titulo _____
Clas. _____

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO

FACULTAD DE QUIMICA

CAMPYLOBACTER. S. P. P.

TESINA TEORICA

QUE PRESENTA

PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

ALMA ROSA RAZZON OLVERA

QUERETARO, QRO. AGOSTO 1991

FACULTAD DE
QUIMICA



BIBLOTECA

PROPIEDAD DE LA FACULTAD
DE QUIMICA DE LA U. A. Q.

No. Adq. 150678

No. Título _____

Clas. TS 616.931

R279c

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

A MIS PADRES,
RAMIRO Y PILAR
CON AMOR
POR EL APOYO QUE ME HAN DADO
DURANTE TODOS MIS ESTUDIOS.

A MIS HERMANOS,
VICTOR HUGO, PILAR Y SANDRA
CON AFECTO

A MIS MAESTROS,
DE MANERA ESPECIAL A
Q. M. J. MERCED ESPARZA GARCIA
M. C. GUADALUPE GARCIA ALCOCER
M. C. GUSTAVO PEDRAZA ABOYTES
CON CARINO
POR SUS CONSEJOS Y COMPRESION

CAMPYLOBACTER SPP.

INDICE

	Pág
Prólogo	i
1. Información General	1
1.1 Introducción.	1
1.2 Historia.	2
2. Características	6
2.1 Clasificación	6
2.2 Serología	12
2.3 Parámetros de Crecimiento	13
2.4 Características de desarrollo	16
2.4.1 Influencia de la Temperatura.	16
2.4.2 Influencia del Cloruro y la actividad del agua.	18
2.4.3 Influencia de la acidez y el pH	20
2.4.4 Influencia de la Atmósfera.	20
2.4.5 Influencia de los componentes de los Alimentos, Desinfectantes y Radiación.	22
3. Recolección, Transporte y Conservación de muestras.	24
3.1 Muestras de heces	24
3.2 Muestra de Biopsia Gástrica	25
4. Aislamiento e Identificación.	27
4.1 Requerimientos Microaerofílicos	27
4.2 Métodos de Enriquecimiento.	28
4.3 Medios Selectivos de Aislamiento.	30
4.3.1 Especies de <i>Campylobacter</i> entéricos	30
4.3.2 <i>Campylobacter pylori</i>	32
4.4 Identificación.	32
4.5 Pruebas Bioquímicas	36
4.5.1 Prueba de la Catalasa	36
4.5.1.1 Principio	36
4.5.1.2 Bases Bioquímicas	36
4.5.1.3 Reactivos	37
4.5.1.4 Métodos	39
4.5.1.5 Resultados.	40
4.5.1.6 Interpretación.	40
4.5.2 Prueba de la Oxidasa.	40
4.5.2.1 Principio	40
4.5.2.2 Bases Bioquímicas	40
4.5.2.3 Reactivos empleados	40
4.5.2.4 Método.	42
4.5.2.5 Resultados.	42
4.5.2.6 Interpretación.	43

4.5.3	Prueba del Nitrato.	43
4.5.3.1	Principio	43
4.5.3.2	Bases Bioquímicas	43
4.5.3.3	Medios empleados.	44
4.5.3.4	Reactivos empleados	46
4.5.3.5	Método.	47
4.5.3.6	Resultados.	48
4.5.3.7	Interpretación.	48
4.5.4	Prueba del Acido Sulfhídrico.	49
4.5.4.1	Principio	49
4.5.4.2	Bases Bioquímicas	49
4.5.4.3	Medios empleados.	50
4.5.4.4	Método.	51
4.5.4.5	Resultados.	51
4.5.4.6	Interpretaciones.	51
4.5.5	Reacción de la Ureasa	52
4.5.5.1	Principio	52
4.5.5.2	Bases Bioquímicas	52
4.5.5.3	Medios empleados.	52
4.5.5.4	Método.	53
4.5.5.5	Resultados.	53
4.5.5.6	Interpretaciones.	53
4.5.5.7	Precauciones.	54
4.5.5.8	Prueba del Hipurato	54
4.5.7	Tolerancia a los agentes antimicrobianos.	54
5.	Mecanismos de Patogenicidad Humana.	56
5.1	Determinantes de virulencia	56
5.1.1	Mecanismos de Patogenicidad	56
5.1.1.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	56
5.1.1.2	<i>Helicobacter pylori</i>	59
5.1.2	Toxinas de <i>Campylobacter spp.</i>	60
5.1.2.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	60
5.1.2.2	<i>Helicobacter pylori</i>	64
5.1.3	Utilización del Hierro.	64
5.1.4	Evación de la Fagocitosis	66
5.1.5	Endotoxinas	66
5.2	Proteínas de Superficie	67
5.3	Plásmidos	70
5.4	Respuesta inmune a la infección	71
6.	Profilaxis.	74
7.	Tratamiento	75
7.1	Especies de <i>Campylobacter</i> entéricos	75
7.2	<i>Helicobacter pylori</i>	75

APENDICES.	80
Apendice I Medios de Cultivo.	81
Apendice II Tinciones	87
Apendice III Fotografías de los Resultados.	93

TABLAS

Tabla 1: Especies y subespecies de <i>Campylobacter</i>	8
Tabla 2: Características de <i>Campylobacter</i> spp. Catalasa positivos	35

FIGURAS

Figura 1: Micrografía electrónica de <i>Campylobacter</i> spp.	7
Figura 2: Micrografía electrónica de <i>H. pylori</i> en aproximación al epitelio gástrico	11
Figura 3: Micrografía electrónica de diferentes tinciones de <i>H. pylori</i>	33
Figura 4: Rangos de sobrevivencia de <i>H. pylori</i> con y sin urea.	61
Figura 5: Biopsia del epitelio gástrico, antes y después de la administración del antibiótico	77

BIBLIOGRAFIA GENERAL	94
--------------------------------	----

P R O L O G O

Durante el curso impartido por la Universidad Autónoma de Querétaro denominado "Actualización en Bacteriología Médica" se hizo notar la importancia del género *Campylobacter* por dos motivos:

1.- Se ha visto que las especies de *Campylobacter* entéricos, principalmente *C. jejuni*, *C. coli* y *C. fetus* se encuentran con la misma frecuencia que *Salmonella* y *Shigella*, sin embargo, éste microorganismo no se busca de rutina en los laboratorios de análisis clínicos.

2.- Así mismo, para *C. pylori* que es un agente etiológico causante de gastritis.

Es por éstos motivos que se realizó una revisión bibliográfica, para conocer mejor las características culturales de éste género, y realizar su búsqueda en los laboratorios de análisis clínicos.

CAMPYLOBACTER

I. INFORMACION GENERAL

1.1 INTRODUCCION.

El reconocimiento de *Campylobacter jejuni* (y especies relacionadas) como una causa común de enteritis humana ha llegado a ser bien establecida desde los últimos 10 años, parece ser, con mucho, la especie más importante desde el punto de vista de las enfermedades humanas.¹ Varios estudios indican que *C. jejuni* es la bacteria que más comunmente causa infecciones gastrointestinales, excediendo algunos padecimientos causados por *Salmonella* y *Shigella*. Debido a que para su cultivo se requiere una tensión baja de oxígeno y una temperatura óptima de 42°C, no es muy común aislarlo en el laboratorio. Además se requiere de un cultivo selectivo antes de que el organismo pueda ser reconocido de muestras diarreicas en individuos infectados.

Campylobacter (originalmente *Vibrio fetus*), fue reconocido inicialmente en 1913 en asociación con infertilidad infecciosa y en abortos de ovejas y ganado. E. O. King fue la primera investigadora en mencionar que campylobacter, que crecía a 42°C (*Campylobacter* termofílico), causaba enteritis en humanos. Ella los llamó "vibrios relacionados" porque su morfología estructural (en forma de curva), semejaba a *Vibrio* ssp. Conforme se hizo más sofisticada la clasificación usada, el organismo fue renombrado por Veron y Chatelain *Campylobacter* (del griego, vara curva) y *jejuni* (del griego, flaco).²

-
- (1) LENNETTE, E. N. Manual de Microbiología Clínica. Editorial Medica Panamericana. Mexico. 1989. 3:72
- (2) DOYLE, MICHAEL, P. Foodborn Bacterial Pathogens. Marcel Dekker Inc. 1989:72.

Después de ver la evidencia epidemiológica se consideró a los alimentos en la transmisión del organismo a humanos. Los requerimientos óptimos del microorganismo de temperatura y niveles reducidos de oxígeno se proveen dentro del canal intestinal de las aves y en la sangre tibia de animales domésticos. Muchos estudios han sido hechos involucrando factores epidemiológicos en enteritis por campylobacter. Estos estudios han identificado alimentos como las más importantes causas de infección por *C. jejuni*. La leche cruda es uno de los vehículos que han sido reportados y aves poco cocinadas han sido implicados epidemiológicamente, como los más importantes vehículos que contribuyen a infecciones en humanos por *Campylobacter*.³

1.2 HISTORIA.

En 1938 inició una epidemia de gastroenteritis entre los habitantes de dos prisiones. En esa ocasión, 151 individuos fueron hospitalizados por síntomas de vómito, cólicos abdominales, diarrea, fiebre, dolor de cabeza y de espalda. La investigación epidemiológica indicó que la leche cruda podría, inadvertidamente estar contaminando a los enfermos. La descripción del organismo recuperado de muestras diarreicas mucoides de los pacientes, tenían las características de *C. jejuni*. Este fue el primer reporte que indicaba que *C. jejuni* era transmitido por alimentos. E.O. King en 1957 fue la primera en sugerir que la infección humana era causada por, en ese entonces, *Vibrio fetus*, al cual

(3) DOYLE, M. P. Ob. Cit. 72.

llamó "vibrio relacionado". Sus reportes sugirieron que estos vibrios podrían ser una causa importante de enteritis humana. Ella reconoció que el agente causal era difícil de recuperar de muestras fecales debido a sus características de crecimiento. King dió datos de que éste organismo recuperado de sangre de pacientes con infección sistémica no crecía a 42°C; aunque los "vibrios relacionados" aislados de muestras diarreicas si crecían a 42°C.

Las investigaciones cayeron en el olvido por 12 años, posteriormente, Bokkenheuser confirmó las observaciones de King, reportando un gran número de casos que contrastaban con los reportados en la literatura. Posteriormente, Dekeyser y col. describieron un método de aislamiento para detectar *C. jejuni* en muestras. El procedimiento, incluía pasar la muestra a través de un filtro de 0.65 μm , que después es colocado en una placa de agar selectiva. La placa es incubada en condiciones microaerofílicas. La importancia de éste trabajo no fue apreciada hasta que Skirrow reportó los resultados de un estudio en los que indicaba que *C. jejuni* era una causa importante de gastroenteritis. Usando un medio selectivo, el aisló *Campylobacter* de heces de 57 (7.1%) de 803 pacientes con diarrea. También encontró que la mitad de los pacientes tenían entre 15 y 44 años de edad, pero la incidencia era más alta en niños. En 1980 la Organización Mundial de la Salud comprendió la magnitud global del problema de infecciones entéricas por *C. jejuni*; los resultados en Rwanda, Sudafrica y Zaire sugieren que la infección por *C. jejuni* es común y que es una causa importante de infección en países en vías de desarrollo.⁴

(4) DOYLE, M. P. Ob. Cit. 73

Algunos estudios realizados en el siglo XIX identificaron una bacteria espiral, en la mucosa gástrica de algunas especies animales. En 1906 Krienitz identificó el mismo microorganismo en tejido gástrico humano.⁵ En 1913 McFadyean y Stockman, fueron los primeros en reconocer, la infección potencial de los vibrios microaerofílicos, relacionados con abortos en ganado y ovejas. Sus descubrimientos fueron posteriormente confirmados por Smith (1918), quién aisló un microorganismo similar de abortos bovinos. Smith y Taylor (1919) caracterizaron éste organismo y lo llamaron *Vibrio fetus*.⁶ En 1924, fue descrita la actividad de la ureasa gástrica endógena, por Luck y Seth.⁷ Jones y Little (1931) asociaron éste microorganismo con disenteria en ganado. Entonces, Jones y col. fueron capaces de reproducir la disenteria en ganado sano después de alimentarlo con un cultivo puro de vibrios que fueron aislados de ganado con disenteria. Ellos observaron que el yeyuno fue el primer sitio del tracto gastrointestinal en ser infectado, y consecuentemente, ellos propusieron el nombre de *Vibrio jejuni*. Doyle (1944) propuso que la disenteria era causada por vibrios microaerofílicos que aisló de la mucosa del colon de cochinos con disenteria. Más tarde, él llamó a éste microorganismo *Vibrio coli*. (Doyle 1948). Vinzent y col. (1947) fueron los primeros en reportar una infección humana causada por un vibrio microaerofílico. Ellos aislaron *Vibrio fetus*, de dos cultivos de sangre de mujeres embarazadas; que tuvieron abortos y *V. fetus* fue aislado de la placenta. En 1956, Hofstad fue el primero en asociar vibrio con hepatitis en aves, cuando aisló vibrio del hígado de gallinas muertas. En 1958, Peckman confirmó éste hallazgo,

(5) CZINN, S. J. *Campylobacter pylori*: A new Patogen. *Journal of Pediatrics*. 1989. 114(4) Part 1:670-671.

(6) CUNNINGHAM, F. E. ; COX, N. A. , *The microbiology of poultry meats products*, Academic Press, Inc. U. S. A. 1987. ,10:294.

(7) JoANN, E. O. , NICHOLAS, J. , *Helicobacter pylori: Controversies and an approach to Management.*, *Mayo Clin Proc.* 1990. 65(3):414.

reproduciendo hepatitis en gallinas sanas, después de infectar con vibrio aislado de gallinas muertas; y propuso que podía ser llamado vibrio de la hepatitis avícola.

El término "Campylobacter" fue propuesto por Sebald y Veron (1963) como un nombre genérico para el vibrio microaerofílico, porque éste microorganismo difería del vibrio cólera en ciertos aspectos. Ellos propusieron que *V. fetus* debía ser sacado del género vibrio y reclasificado como *Campylobacter*, siendo *Campylobacter fetus* la especie del género.⁸ No fue sino hasta 1975 que Steer y Colin-Jones demostraron cierta relación entre éste microorganismo y la infección gástrica. Pero éste microorganismo no fue cultivado de tejido gástrico humano sino hasta 1984, cuando Marshall y Warren fueron capaces de aislar éste microorganismo de biopsia después de un largo período de incubación. Esta bacteria espiral, *C. pylori* a sido posteriormente aislada de niños y adultos con infección gástrica y duodenal.⁹

(8) CUNNINGHAM, F. E., COX, N. A. Ob. Cit. 10:294-296.

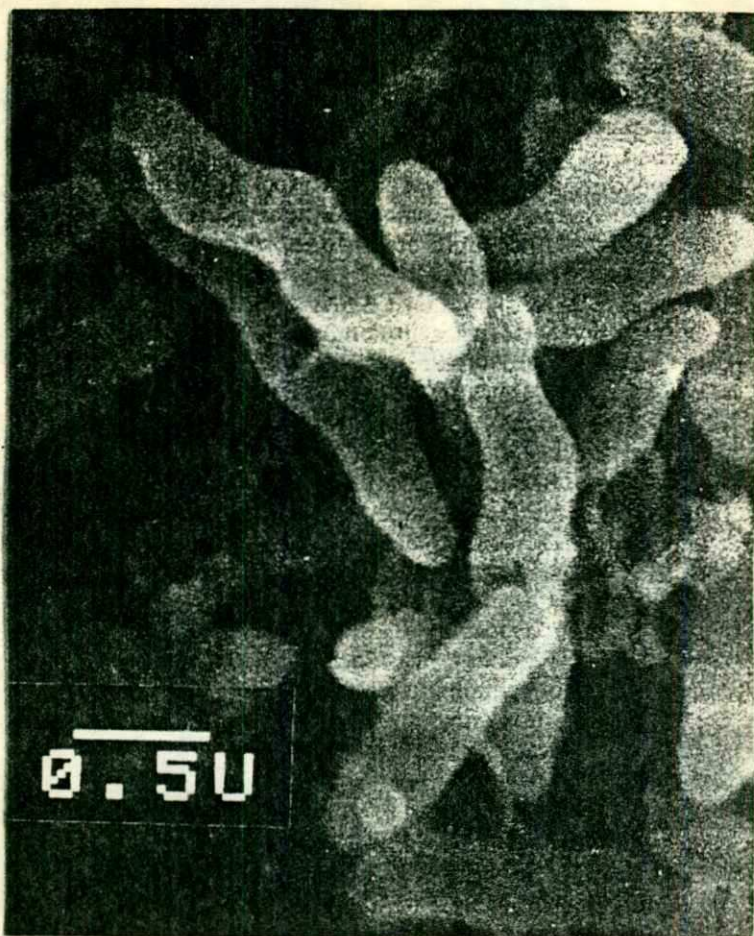
(9) CZINN, S. J. Ob. Cit. 670.

00 CARACTERÍSTICAS

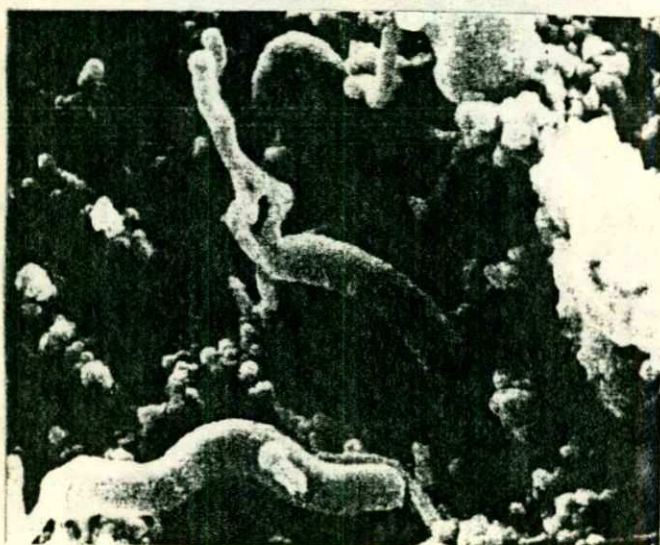
2.1 CLASIFICACION.

El género *Campylobacter* es un miembro de la familia Spirillaceae por su morfología y fisiología similares al género *Spirillum*. El género *Campylobacter* es considerado como gram-negativo,¹⁰ son bacilos finos, curvados en espiral de 0.2-0.5 μm de ancho y 0.5-5 μm de largo.¹¹ Estos microorganismos pueden tener forma de coma, de *S*, de ala de gaviota, y constituyen cadenas cortas u ocasionalmente largas. Ver Fig.1 Las células pueden volverse esféricas o cocoides, en especial, en cultivos envejecidos. Las células no son esporuladas, móviles mediante un sólo flagelo polar en uno o dos extremos y en ocasiones hay cepas inmóviles.^{12,13} Morfológica y bioquímicamente *C. pylori* muestra diferencias con respecto a otras especies de *Campylobacter*. Así éste patógeno tiene una pared celular lisa y gran cantidad de vainas flagelares unipolares; una capa única de ácidos grasos y proteínas.¹⁴ Los microorganismos de esta especie no fermentan ni oxidan carbohidratos y tienen un DNA con un G + C contenido entre 29 y 36 mol%.¹⁵ El *C. pylori* tiene un contenido de guanina y citosina de 35.8-37.1 mol %, lo cual se encuentra en el rango de especies de *Campylobacter*, pero menos que las especies

-
- (10) BECKY, M. F., FENNELL, C. L., Characterization of *Campylobacter cinaedi* y *C. fennelliae*. Antigen and Analysis of the Human Immune Response. Jour. Inf. Dis. 1989, 159(4):74
- (11) BLASER, M. J., Gastric *Campylobacter*-like organism; Gastritis, and Peptic Ulcer Disease. Gastroenterology. 1987, 93(2):371-383
- (12) LENNETTE, E. N., Ob. Cit. 27:383
- (13) BLASER, M. J., *Helicobacter pylori* and the Pathogenesis of Gastroduodenal Inflammation. Jour. Inf. Dis. 1990, 161(4):626
- (14) CZINN, S. J., Ob. Cit. 670
- (15) DOYLE, M. P., Ob. Cit.



Micrografía electrónica de *Campylobacter pylori*.
DOYLE



Micrografía electrónica, demostrando *C.*
pylori en forma curva y cocoide (X25000)
JoANN

FIG. 1

de *Spirillum* o *Vibrio*.¹⁶ Todos los miembros de éste género son oxidasa y catalasa positivos, reducen nitratos,¹⁷ no hidrolizan ni gelatina, ni urea, excepto *C. pylori* que si hidroliza urea; dan una reacción de rojo de metilo y Voges-Proskauer negativa. El crecimiento ocurre entre los 25°C y 43°C.¹⁸

Existen ahora aproximadamente una docena de especies y subespecies en el género *Campylobacter*. Estas deben ser separadas en dos grupos usando la prueba de la Catalasa. Ver Tabla 1.

TABLA 1

Especies y Subespecies de Campylobacter.

Catalasa positiva	Catalasa Negativa
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> .	<i>C. sputorum</i> subsp <i>Sputorum</i> .
<i>C. fetus</i> subsp <i>venerealis</i> .	<i>C. sputorum</i> Subsp <i>bubulus</i> .
<i>C. jejuni</i> .	<i>C. sputorum</i> Subsp <i>mucosalis</i> .
<i>C. coli</i> .	EMC. <i>concisus</i> .
Grupo NARTC.	
<i>C. fecalis</i> .	
<i>Campylobacter</i> sp. Aerotolerante.	
<i>Campylobacter</i> sp. Compuesto de nitrógeno.	
<i>Campylobacter</i> sp. de vida libre.	

De Karmali y Skirrow (1984).¹⁹

Las especies catalasa positivas, son responsables de abortos, infertilidad, y disenteria en animales, y son el agente que causa enteritis y bacteremia en humanos. Así mismo las subespecies de *C. fetus* (subespecies *venerealis* y subespecies *fetus*) son responsables de muerte veterinaria reproductiva e infecciones

(16) BLASER, M. J., Gastric Campylobacter. . . , Ob. Cit. 372

(17) BLASER, M. J., Helicobacter pylori. . . , Ob. Cit. 626

(18) DOYLE, M. P., Ob. Cit. 3:74

(19) CUNNINGHAM, F. E., Ob. Cit. 297

sistémicas en humanos.²⁰ Sin embargo la mayoría de los pacientes no presenta diarrea. El *C. fetus* subespecie *venerealis* probablemente no produce enfermedad en el ser humano, pero causa abortos e infertilidad en el ganado vacuno. Se transmite sexualmente.²¹ Los agentes causantes de diarrea en humanos aparecen en la "lista aprobada de nombres bacterianos" y son *C. jejuni* y *C. coli*. "*C. laridis*" es el nombre propuesto para un nuevo grupo de *C. jejuni* como *Campylobacter* termofílico que es resistente al ácido nalidíxico (NARTC).²² Las especies *C. coli* y *C. jejuni* producen enfermedades semejantes en el ser humano, pero su frecuencia no se conoce, son capaces de crecer a una temperatura óptima de 42 a 43°C. El *C. coli* se encuentra muy a menudo en cerdos sanos.²³

Las especies pueden ser diferenciadas de la siguiente manera: *C. jejuni* hidroliza el hipurato mientras que *C. coli* no, aunque es variable *C. jejuni* generalmente no crece a 30.5°C, aunque *C. coli* si, muchas cepas de *C. jejuni* son sensibles al 2,3,5, clorhidrato de trifeniltetrazolium (TTC), mientras que la mayoría de las cepas de *C. coli* son resistentes al TTC. Ya que cada una de éstas tres especies (*C. coli*, *C. fetus*, *C. laridis*) han sido implicadas en muerte por diarrea humana, la presencia de alguna de estas especies en alimentos representa un riesgo potencial en la salud humana.²⁴

El *C. concisus* se aisló de la hendidura gingival en el ser humano con enfermedad periodontal, pero su patogenicidad es desconocida.

(20) DOYLE, M. P., Ob. Cit. 75

(21) LENNETTE, E. N., Ob. Cit. 384

(22) DOYLE, M. P., Ob. Cit. 75

(23) LENNETTE, E. M., Ob. Cit. 383

(24) DOYLE, M. P. Ob. Cit. 75

El *C. hyointestinalis* ha sido asociado con ileítis proliferativa en porcinos.

El *C. cinaedi* y el *C. fennelliae* han sido aislados de hisopados rectales y se ha aislado también de la sangre de hombres homosexuales con síntomas intestinales. Sin embargo se ha visto que *C. fennelliae* no está relacionado antigénicamente con las especies *Campylobacter*.^{25,26}

El *C. pylori* es un microorganismo semejante a la especie de *Campylobacter*, que ha sido aislado de muestras de biopsia de seres humanos con gastritis y ulceraciones pépticas en el estómago y duodeno;²⁷ Ver Fig2 pero por sus características morfológicas y bioquímicas diferentes muchos autores creen que éste microorganismo representa una nueva especie y ha sido renombrado *Helicobacter pylori*; sin embargo siempre que se utilice éste nombre, debe hacerse la referencia al nombre anterior entre paréntesis.^{28,29,30.}

C. upsaliensis ha sido principalmente asociado con perros desde su descubrimiento en 1983. Ahora, sin embargo, hay evidencia que sugiere que ésta especie está muy asociada con casos de enteritis en humanos; es decir, es un patógeno potencial humano. Desde su descubrimiento se observó que éste microorganismo tenía catalasa positiva; sin embargo algunos investigadores han encontrado cepas catalasa negativa, principalmente aquellos aislados de sangre. Todo esto hace pensar que éste microorganismo es más que un oportunista o un patógeno invasivo.³¹

(25) LENNETTE, E. N., Ob. Cit. 384

(26) BECKY, M. F., Ob. Cit. 26

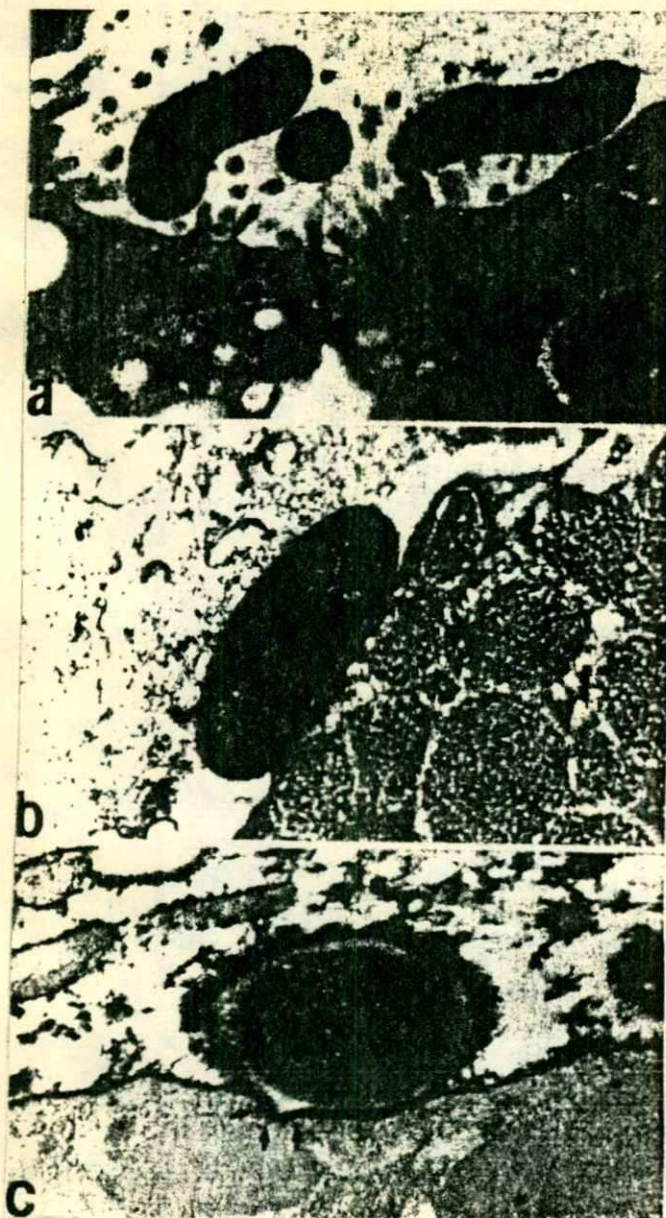
(27) LENNETTE, E. N., Ob. Cit. 384

(28) HUTH, E. J., Style Notes: *Helicobacter pylori* for *Campylobacter pylori*. *Annals Of Internal Medicine*. 1990. 112(4):245

(29) Letter to the editor. *Campylobacter pylori* becomes *Helicobacter pylori*. *Lancet*. 1989. 2:1019-20

(30) BLAZER, M. J., *Helicobacter pylori*. . . Ob. Cit. 626

(31) Letter to the editor. Another *Campylobacter* species may be a human pathogen. *ASM News*. 1989. 55(3):115-116



Micrografía electrónica, mostrando *H. pylori* en aproximación del epitelio gástrico. b y c *H. pylori* forma una adhesión a la superficie mucosa celular.

JoANN

FIG. 2

2.2 SEROLOGIA.

Esquemas serológicos para diferenciar *C. jejuni* son útiles para proveer información epidemiológica en el estudio del contagio ecosistema, transmisibilidad, y patogenia del organismo.

Hasta ahora, se han reportado gran cantidad de esquemas serotípicos, pero dos son los más usados (el Penner y el Lior). Penner y Hennessy usan extractos de antígenos estables al calor de *C. jejuni* tratan con calor al organismo en solución salina a 100°C y exponiéndolo a ác. tetracético etilendiamina. Eritrocitos de carnero son sensibilizados con éste extracto antigénico, que es usado para titular antisuero con la técnica de hemaglutinación pasiva. El protocolo usado en el esquema serotípico de Penner usa antígenos celulares somáticos para esta base inmunológica. Los antisueros específicos fueron usados para detectar los antígenos estables al calor aislados de *C. jejuni* al realizar una prueba de aglutinación en placa. Se han encontrado por lo menos 60 serotipos con éste sistema.

Lior y Col. presentaron un esquema serológico de aglutinación en placa para diferentes serotipos de *C. jejuni*. Su esquema usa antígenos flagelares, para la discriminación serológica. Ellos utilizaron el factor termolábil para producir el antisuero, que fue aplicado en pruebas de aglutinación en placa para la identificación. Actualmente hay por lo menos 90 serotipos del grupo *C. jejuni* para los cuales se pueden obtener los antisueros.³²

En los estudios que correlacionan resultados serológicos con el cultivo de *H. pylori* (*C. pylori*) e histología, los rangos de sensibilidad van de 80 a 100% y la especificidad de 75 a 100%.

(32) DOYLE, M. J., Ob. Cit. 75

Aparentemente, la especificidad se pierde cuando todo el extracto de *H. pylori* es usado como antígeno para los ensayos de enzimas inmunoabsorbidas debido a la reacción cruzada con otras bacterias, incluyendo *C. jejuni*. Estos estudios hechos con el extracto completo necesitan ser interpretados con precaución. Hasta la fecha, se han obtenido mejores resultados usando proteínas de elevado peso molecular de *H. pylori* como antígeno (sensibilidad 99%, especificidad 100%).⁹⁹

2.3 PARAMETROS DE CRECIMIENTO.

C. jejuni es un microorganismo microaerofílico y crece en una atmósfera óptima de 5 % de oxígeno. Este medio ambiente se puede proveer de las siguientes maneras: a) Dando una mezcla de gases microaerofílica, b) Evacuando parcialmente la vasija del cultivo, o c) Cultivando el microorganismo en una atmósfera normal en un medio semisólido que provee el gradiente de oxígeno requerido. Bowdre y col. sugirieron que la naturaleza puede en parte deberse a que el microorganismo no sintetiza el hierro férrico necesario para secuestrar compuestos en un nivel adecuado para soportar el crecimiento aeróbico. George y col. reportaron que la aerotolerancia de *Campylobacter spp* es incrementada cuando se adiciona al medio 0.25% de cada uno de los siguientes compuestos: sulfato ferroso, metabisulfito de sodio, y piruvato de sodio (FBP). Ellos sugieren que incorporando el suplemento FBP en el medio incrementa el crecimiento del organismo y, por consiguiente, el recobro puede ser logrado. Hoffman y col. encontraron que el FBP no produce cambios fisiológicos en *C. jejuni*

(99) JOANN, E. O., Ob. Cit. 117

y sugieren que el FBP actúa como un aceptor de oxígeno o aceptor de productos derivados de oxígeno ejemplo: peróxidos y superóxidos, que de otra manera pueden producir efectos tóxicos en el organismo.

Chou y col. reportaron que adicionando FBP al medio de cultivo disminuye la sobrevivencia de *C. jejuni* y mantiene las características morfológicas, motilidad, y viabilidad cuando permanece a 4°C ó a temperatura ambiente por arriba de 30 y 20 días respectivamente, en condiciones atmosféricas normales. En cultivos frescos el microorganismo es curvo o espiral, y es muy móvil. Con el tiempo, *C. jejuni* se transforma a forma cocoide que no es móvil ni cultivable. Bolton y col. reportaron que placas de agar guardadas a la luz y aire por 48 hrs inhiben *C. jejuni*, mientras que guardado en la obscuridad y/o en una atmósfera reducida no llega a ser inhibitorio. Suplemento de sulfato ferroso, piruvato de sodio, sangre y carbón vegetal previene la acumulación de oxígeno generado fotoquímicamente y permite el crecimiento de los microorganismos. Ellos concluyeron, finalmente como Hoffman y col., que éste suplemento actúa como un agente quelante o destoxicante y no como un factor de enriquecimiento.

Juven y Rosenthal reportaron que el efecto combinado de luz fluorescente y aire produce factores tóxicos en el medio que retarda el crecimiento de *C. jejuni*, adicionando ditionito de sodio y catalasa se impide la agresión causada por la luz y el aire; por ésta razón ellos concluyeron que guardando las placas de agar en la oscuridad y/o en la atmósfera reducida se disminuyen los factores de inhibición. Esta conclusión fué apoyada por Fricker, quien recomendó usar medios recién preparados, y si el almacenamiento era necesario, las placas deberían de mantenerse a 4°C en condiciones anaerobias.³⁴

(34) DOYLE, M. P. Ob. Cit. 76

Stern y col. estudiaron la interacción entre el suplemento de hierro y la influencia inhibitoria de cloruro de cadmio en crecimiento de *Campylobacter*. Ellos reportaron que el sulfato ferroso y el cloruro de cadmio son antagonistas en su influencia en el crecimiento del microorganismo, y estos factores presentes en los medios de sangre y tioglicolato "neutralizan" la actividad inhibitoria de la sal de cadmio. Estos resultados indican que éste suplemento sirve como agente destoxicante. Los investigadores han encontrado que la presencia de sulfato ferroso incrementa el recobro de *C. jejuni* 10,000 veces más. Baig y col. más tarde encontraron que *C. jejuni* no produce sideróforos*, pero puede usar sideróforos exógenos (dado por un microorganismo co-infectante) para obtener fierro para su actividad metabólica. La habilidad de adquirir fierro permite a la bacteria multiplicarse y por esa razón es considerada como un factor de virulencia. *C. jejuni* puede transformarse de una forma cultivable a una no cultivable rápidamente después de completar la fase log de crecimiento. Rollins y Colwell reportaron que mientras que el organismo no sea cultivable por técnica en placa, podía haber 1×10^6 UFC[Ⓢ] viables de *C. jejuni* / ml.

Estas células viables pueden ser capaces de colonizar e infectar al huésped. La presencia de éstas formas no cultivables en alimentos y agua necesitan ser más investigadas.³⁵

(*) SIDEROFOROS: Quelantes de fierro de bajo peso molecular.

(Ⓢ) UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

(35) DOYLE, M. P., Ob. Cit. 76

2.4. CARACTERISTICAS DE DESARROLLO

2.4.1. Influencia de la temperatura

Los rangos de temperatura óptima para el crecimiento de *C. jejuni* están entre 42 y 45°C, la inactivación térmica ocurre a los 48°C. Doyle y Roman reportaron el valor para éste microorganismo en leche cruda a 48°C en un rango de 7.2 a 12.8 minutos, mientras que a 55°C el rango fué de 0.74 a 1.0 min.

La sensibilidad de *C. jejuni* al calor fué fuertemente sostenida por Gill y col. quienes reportaron que 10^6 *C. jejuni*/ml. de leche cruda fueron inactivados a 60°C durante 80 seg. De la misma manera, cuando 10^6 células de *C. jejuni* fueron inoculadas en leche usada para fabricar queso cottage, Ehlers y col. no detectaron el organismo después de que el producto fué calentado por 30 min. a 55°C.

Palumbo reportó que el daño por calor ocurre en *C. jejuni* a 46°C. *C. jejuni* no sobrevivirá a la mínima pasteurización legal requerida para la leche o productos lácteos, por ésta razón se puede anticipar que el producto estará libre de *Campylobacter* usando las buenas prácticas de manufactura.³⁶

Observaciones similares han sido realizadas viendo la inactivación térmica de *Campylobacter* en productos cárnicos. Los procedimientos de elaboración son suficientes para inactivar a *Campylobacter spp.* Stern y Kotula reportaron que más de 10^6 *C. jejuni*/gr de la carne fueron reducidos a niveles no detectable en 10 min después de que fueron cocinadas a una temperatura interna de 60°C. Gill y Harris reportaron que los valores de *C. jejuni* en carne son menores en 1 min. a 60°C. Koids

(36) DOYLE, M. P., Ob. Cit. 77

y Doyle reportaron los valores para inactivar *Campylobacter* en carne de aproximadamente 6 min. a 50°C y 15 seg. a 58°C. Estas observaciones independientes indican que *C. jejuni* es muy sensible al calor y no sobrevive a los procesos de cocinado normal.

Bajo condiciones apropiadas de atmósfera y nutrición, *C. jejuni* crece a temperaturas arriba de 30 y abajo de 45°C. Sin embargo, el organismo no crece en comida cruda que ha permanecido en condiciones típicas de almacenamiento. El organismo muere más rápidamente cuando permanece a 25 que a 30°C. pero es inactivado más rápidamente en alimentos que permanecen a temperatura ambiente que a 4°C.

Christopher y col. reportaron que *Campylobacter* sobrevive bien en carne a una temperatura fría de 1 a 10°C. Stern y Kotula reportaron una mejor sobrevivencia de *C. jejuni* en carne que permanece a 4°C, cuando se adiciona diluyente de Cary-Blair a la muestra. En general, los reportes indican que *C. jejuni* sobrevive bien en alimentos refrigerados.⁹⁷

C. jejuni parece ser altamente susceptible a la congelación, con una reducción de $1-3 \log_{10}$ que ocurre en alimentos almacenados entre -15 y -20°C. Después de la disminución numérica inicial, el organismo puede sobrevivir por lo menos 84 días en carne congelada. Stern y col. reportaron que el aislamiento de *Campylobacter ssp* en carne fresca y tejido de ave fué 5 veces más alta para productos refrigerados (12.1%) que en muestras congeladas (2.3%). El uso de agentes crioprotectores incrementan la preservación del organismo cuando las muestras permanecen en refrigeración. También es posible que células fuertemente

(97) DOYLE, M. P., Ob. cit. 77

congeladas, pero viables de *C. jejuni* no son cultivables de alimentos congelados. Ray y Johnson reportaron que células son afectadas por polimixina B cuando se incubaba a 42°C. Polimixina B es un antibiótico común en los medios selectivos para *Campylobacter*.⁹⁸

2.4.2. Influencia de Cloruro de sodio y la actividad del agua

C. jejuni es muy sensible al cloruro de sodio.

El cloruro de sodio es mejor tolerado a elevadas temperaturas. Doyle y Roman realizaron más estudios y determinaron que ciertas cepas podían crecer en la presencia de 1.5% pero no de 2.0% NaCl a 42°C. A temperatura de refrigeración (4°C), *Campylobacter* era sensible a 1 % de NaCl, pero el rango de muerte fue substancialmente bajo que lo que ocurría a 25°C. La presencia de 1 % de NaCl disminuye el rango de crecimiento. La concentración óptima de cloruro de sodio para recobrar *C. jejuni* es 0.5 % NaCl. Estas observaciones fueron más consistentes cuando Abram y Potter extendieron sus estudios a la sobrevivencia de *Campylobacter* en alimentos que contenían diferentes concentraciones de cloruro de sodio. En condiciones de congelación, la cuenta *C. jejuni* no se ve afectada por los niveles de cloruro de sodio. La sobrevivencia del organismo en bacalao crudo que permanece a temperaturas de refrigeración disminuye tan pronto como la concentración de cloruro de sodio es incrementada de 0 a 2.0 %. Sin embargo, *C. jejuni*, muere más rápidamente en la presencia de cloruro de sodio, el organismo puede permanecer semanas en alimentos refrigerados a

(98) DOYLE, M. P., Ob. Cit. 78

4°C con 6.5 % de sal. A 25°C, el organismo muere más rápidamente que a 4°C, pero su presencia depende del número original en los alimentos y que tanto tiempo es mantenido a temperatura ambiente.

Doyle y Roman reportaron que *Campylobacter* es sensible a la sequedad y al almacenamiento a temperatura ambiente. En general, células viables de la población inicial en exceso de 10^7 no puede ser recobrado después de 24 hr en un medio ambiente anhidro a 25°C. El organismo sobrevive mejor bajo condiciones comparables a 4°C con un incremento en la supervivencia en un medio ambiente con 14 % o menos humedad relativa. El organismo puede ser recobrado por lo menos 6 semanas después bajo estas mismas condiciones. Sin embargo, *C. jejuni* es muy sensible a la resequedad, en condiciones de refrigeración, los restos de bacterias permanecen viables por varias semanas en frío y un ambiente seco.

Estas observaciones fueron incrementadas por Oosterom y col. y Bracewell y col. para aplicarse en el procesado de cerdo. Hudson y Robert reportaron originalmente un bajo recobro de *Campylobacter* de áreas seca (2 % de recobro) que en áreas húmedas (26 % de recobro) de cerdo. Oosterom y col reportaron que *Campylobacter* en cerdos en un cuarto frío con ventilación fué inactivado a niveles no detectables durante la noche. Estudios más intensos revelaron que la reducción del número de *Campylobacter* fué llevando a sequedad la superficie. Bracewell y col. reportaron que *Campylobacter* fué inactivado más rápidamente, cuando la piel de cerdo fué secada a 20°C que en refrigeración.³⁹

(39) DOYLE, M. P., Ob. Cit. 78,79

2.4.3 Influencia de la Acidez y el pH

Doyle y Roman reportaron que el rango de inactivación de *C. jejuni* a un pH 3.0-4.5 es dependiente de la temperatura. A similares rangos de pH, es más rápidamente inactivado a 42°C, con un valor intermedio de 25°C, y más lentamente a 4°C. En medios de laboratorio, todas las especies de *Campylobacter* crecen bien a un pH de 5.5-8.0. Un crecimiento óptimo se encuentra en el rango de pH de 6.5-7.5, mientras que el mínimo pH para el crecimiento está alrededor de 4.9. Gill y Harris reportaron que una cepa típica de *C. jejuni* puede crecer a 37°C en carne con elevado pH (6.4), pero no en carne con pH normal (5.8). Ellos reportaron que la rapidez de muerte a -1°C era mucho menor en carne de elevado pH que en carne de pH normal.

2.4.4. Influencia de la Atmósfera.

La naturaleza microaerofílica* y capnofílica‡ de *Campylobacter* puede ser considerada cuando se cultiva el organismo. Kiggins y Plastridge reportaron una composición atmosférica óptima para el crecimiento de *C. jejuni* (entonces *Vibrio fetus*) de 5 % de oxígeno, 10 % de bióxido de carbono, y 85 % de nitrógeno. Variaciones fueron observadas para especies específicas de *Campylobacter*, pero Bolton y Coates estuvieron en general de acuerdo con los estudios originales de Kiggins y Plastridge. Koidis y Doyle estudiaron la sobrevivencia del organismo en caldo brucella bajo varias condiciones atmosféricas.⁴⁰

*. Microorganismo que requiere oxígeno como aceptor terminal de electrones para crecer, pero no crece en la superficie del medio sólido, en un incubador aeróbico. BASUALDO, M. C. Manual para el aislamiento e identificación de bacterias anaeróbicas de interés en muestras clínicas. Primer curso de actualización. 1990. 5

‡. Microorganismo afín al bióxido de carbono.

(40) DOYLE, M. P., Ob. Cit. 3:80

Ellos monitorearon una cepa del organismo a 4°C en la presencia de 0.01% de bisulfito de sodio y encontraron que la supervivencia era mejor en una atmósfera de 100% de nitrógeno., que la inactivación era más rápida en una atmósfera de 100% de oxígeno o aire, y que la inactivación ocurría en un rango intermedio en una mezcla microaerofílica de 5 % de oxígeno, 10 % de bióxido de carbono y 85% de nitrógeno. Estos mismos investigadores realizaron más estudios para optimizar el recobro de *C. jejuni* de leche no pasteurizada. Ellos determinaron la ventaja de reducir la concentración de oxígeno para un mejor recobro de *Campylobacter*.

Muchos investigadores han estudiado el uso de atmósferas modificadas o de empaque de vacío en el desarrollo de *C. jejuni*. Hanninen y col. encontraron que la sobrevivencia de *C. jejuni* en carne refrigerada era independiente de la forma de empaque. La carne estaba empacada al vacío o permanecía en atmósfera de 20% de CO₂ 80 % de N₂ ó 5% de O₂ 10% de CO₂ 85% N₂. Igualmente Wesley y Stadelman reportaron que la supervivencia de *C. jejuni* en pollo no era influenciado por el almacenamiento bajo una atmósfera de bióxido de carbono o una atmósfera normal.⁴¹

Se realizaron mayores estudios para cuantificar la sobrevivencia de *Campylobacter* en aves y productos cárnicos mantenidos a diferentes condiciones atmosféricas y condiciones de empaque. No hubo diferencia estadística significativa en la sobrevivencia de *C. jejuni* en empaque el vacío o permeable al oxígeno ó cloruro de polivinilo. Sin embargo, el recobro de *Campylobacter ssp* endógeno, de muestras de carne roja se vió incrementado en muestras empacadas al vacío, que en muestras envueltas en una capa permeable a oxígeno, después de que las

(41) DOYLE, M. P., Ob. Cit. 3:81

muestras permanecieron refrigeradas una semana. *C. jejuni* sobrevivió mejor en carne picada en una atmósfera de 100% N₂ que en una atmósfera de 80% de CO₂ y 20% de N₂ ó 5% de O₂, 10% CO₂, 85% de N₂ ó empacado al vacío. Sin embargo los resultados indican que el organismo sobrevive a diferentes atmósferas, las diferencias fueron relativamente pequeñas y no parece tener impacto en salud pública.

2.4.5 Influencia de los Componentes de los alimentos, Desinfectantes y Radiación

El desarrollo y crecimiento de *C. jejuni* en líquidos, huevos emulsificados y los componentes del huevo, depende de los constituyentes individuales del huevo. Hanninen y col. encontraron que *C. jejuni* crece mejor a 37°C en yema de huevo que en huevo completo, y que el número de células disminuía rápidamente cuando *Campylobacter* era inoculado en clara de huevo. Clark y Bueschkens determinaron que en albumina el rango D para *Campylobacter jejuni* a 42°C era aproximadamente de 2.4 hrs. Los componentes de conalbumina de la clara de huevo era identificado como el mayor constituyente del huevo que tenía un efecto bactericida en *Campylobacter*.

Fletcher y col. determinaron que *C. jejuni* es inhibido por 0.05% de ácido ascórbico y que los productos de oxidación del ácido L-ascórbico son más inhibitorios que las formas reducidas. Deibel y Banwart reportaron que ciertas especias como el orégano, salvia y clavo, en un caldo al 0.5%, inhiben el crecimiento de *C. jejuni* a 42°C.⁴²

Wang y col. reportaron que varios agentes desinfectantes

(42) DOYLE, M. P., Ob. Cit., 3:82

destruían efectivamente *C. jejuni*. Niveles de 1.25 ppm de hipoclorito de sodio inactiva 10^4 *C. jejuni*/ml en 1 min. y 5 ppm de NaOCl mata 10^7 *C. jejuni*/ml en 15 min. Otros agentes desinfectantes (ej. 0.15 % de compuestos fenólicos .0.001 % de iodoformo. 0.00002 % (1:50,000) de compuestos cuaternarios de amonio, 70 % de alcohol etílico, y 0.125 % de glutaraldehído), matan aproximadamente 10^7 *C. jejuni*/ml en 1 min. Igualmente, Blaser y col reportaron que 1 ppm de monocloramina, inactiva 99% de *C. jejuni* presente después de 15 min. de contacto, indicando que los procedimientos de desinfección comúnmente usados para el tratamiento de agua potable es adecuado para eliminar el microorganismo del agua tratada.

Estudios recientes muestran que *C. jejuni* es muy sensible a las radiaciones gama. Lambert y Maxcy reportaron un rango D para *C. jejuni* de 32 Krad, que es aproximadamente 10 veces menor que aquellos usados para irradiar productos cárnicos procesados en Europa.⁴³

(43) DOYLE, M. P., Ob. Cit. 3:82

III. RECOLECCION, TRANSPORTE Y CONSERVACION DE MUESTRAS

3.1. MUESTRAS DE HECES.

Las heces o los hisopados rectales deben recogerse de pacientes con diarrea. Los pacientes que han tenido diarrea pueden todavía segregar especies de *Campylobacter* aún cuando tengan heces formadas en el momento de la recolección. Se debe inocular las muestras rápidamente en medios selectivos, preferiblemente dentro de las 2 hr. Si ello no es posible, los hisopados rectales o los hisopos con heces deben colocarse en medio de transporte de Cary-Blair³. El *C. jejuni* no sobrevive bien en solución salina glicerol de pH estabilizado, un medio de transporte comúnmente empleado para otros patógenos entéricos; éste medio no es recomendable para especies de *Campylobacter*. Las muestras deben de mantenerse en el medio de transporte a temperatura refrigerada. Los especímenes pueden conservarse generalmente durante 1 a 2 semanas a 4°C antes de que la recuperación de especies de *Campylobacter* se vea severamente reducida.

Para el transporte de cultivos puros de *Campylobacter*, se pueden utilizar medios de transporte de Wang o el de Cary-Blair. Los cultivos se deben de mantener o transportarse refrigerados.

A fin de conservar los cultivos de *Campylobacter* durante largos períodos, suspender el desarrollo de 24 a 48 hr de una placa de agar sangre en caldo tripteína soya con glicerol 20% o en sangre de conejo desfibrinada y conservar el cultivo a -70°C en nitrógeno líquido.⁴⁴

(44) LENNETTE, E. N.; Ob. Cit.; 27:395

3. Para tinciones y medios de cultivo ver apéndice I y II.

Para el examen directo de la muestra la técnica más efectiva es utilizar un microscopio de contraste de fases o de campo oscuro y observar los bacilos espirales con movilidad de flecha. Se recomienda como líquido de suspensión el caldo Brucella o un medio similar. Si no se dispone de microscopio de campo oscuro, es útil la observación de los bacilos curvos teñidos con cristal violeta.⁴⁵

3.2. MUESTRA DE BIOPSIA GASTRICA.

Los especímenes de biopsia gástrica deben ser rápidamente colocados en 2 o 3 ml de solución salina isotónica estéril o en glucosa al 20% y transportada al laboratorio inmediatamente, si el organismo quiere ser recobrado.

Una vez en el laboratorio, la muestra es colocado en un medio suplementado como agar chocolate o medio Skirrow y se incuba de 5 a 7 días.^{46,47.}

Palazuelos y col. recomiendan la siguiente metodología para el procesado de la muestra una vez que llega al laboratorio:

- 1) Machacamiento en mortero estéril.
- 2) Frotis y tinción de Gram.
- 3) Siembra en los medios Skirrow (modificado) y agar chocolate (modificado).

(45) LENNETTE, E. N. ; Ob. Cit. ,27:385

(46) JOANN, E. O. ; Ob. Cit. ;415

(47) GUSTAVSSON, M. D. ; MALAGELADA; ROSENBLATT, M. D. ; Assessment of Campylobacter-like organism in the Postoperative Stomach, Iatrogenic Gastritis, and Observation. Mayo Clin. Proc. 1987, 62(4):266

4) Incubación a 37°C en atmósfera microaerofílica durante 7 días con revisión cada tercer día.

5) Identificación Bioquímica.

De 26 muestras que ellos procesaron, 26 fueron positivas, la mayoría de antro y en pacientes con gastritis antral y úlcera péptica.⁴⁸

(48) ZUÑIGA, O. B, PALAZUELOS, T. C, CRUZ, L. A, ORNELAS, V. U. Aislamiento e Identificación de *G. pylori* en pacientes con enfermedad Acido-Péptica. Revista de Gastroenterología de Mex. 1988. 53(4):336

IV AISLAMIENTO E IDENTIFICACION

4.1 REQUERIMIENTOS MICROAEROFILICOS.

C. jejuni es un microaerofílico estricto, por ésta razon cualquier procedimiento de aislamiento debe incluir los medios, para reducir la tensión de oxígeno como parte de la técnica. Muchos procedimientos alternativos han sido utilizados para obtener condiciones microaerofílicas. Estas incluyen la aplicación del principio de Fortner, cambio de atmósfera, sistemas generadores de atmósfera, e incluso el uso de Alka-Seltzer para generar el sistema. Las jarras con velas han sido utilizadas, sin embargo, éste sistema no ha sido muy efectivo para proporcionar una atmósfera óptima para el crecimiento de *Campylobacter*.

Proporcionar la atmósfera microaerofílica al matraz con el caldo de enriquecimiento se puede lograr más eficientemente introduciendo una atmósfera de 5% de oxígeno; 10 % de bióxido de carbono y 85% de nitrógeno de un cilindro de gas. El gas debe ser adicionado al matraz de enriquecimiento a través del brazo del matraz. Alternativamente un hoyo puede ser oradado en un tapón de goma en el que se introduce un pequeño tubo de vidrio al cual se le adiciona el tubo Tygon con una pinza al final. El tapón que va al tornillo del matraz debe permanecer en su lugar atornillando a la ranura que permite que el tubo de vidrio pase a través de éste. Esta ranura adicional es útil debido al incremento la presión gaseosa que ocurre durante la incubación a 42°C. El gas es introducido lentamente del cilindro al matraz, el tornillo se aprieta y el matraz se gira lentamente para incorporar la

atmósfera microaerofílica en el caldo de enriquecimiento. El tornillo se suelta por un intervalo corto para igualar la presión gaseosa; el proceso completo se repite 2 veces.

Resultados equivalentes han sido obtenidos con una jarra anaeróbica introduciendo la mezcla de gases ó bolsas de plástico Ziploc (Dow Chemical Co. Indianapolis IN). Así como en el matraz de enriquecimiento la mezcla de gases microaerofílica debe ser introducida en el contenedor muchas veces para asegurar el medio ambiente óptimo para el crecimiento de *Campylobacter jejuni*. El intercambio de la mezcla gaseosa puede ser completada creando un vacío en la vasija o cuando se utilizan bolsas de plástico y despidiendo la atmósfera a través de una pequeña abertura en el zipper. El contenedor con las muestras es después colocado a una temperatura apropiada en la incubadora.

Incrementando la aerotolerancia de *Campylobacter spp.* es conveniente optimizar el recobro del organismo de los alimentos. Suplementando el medio de cultivo con concentraciones de 0.025% de sulfato ferroso, metabisulfito de sodio y piruvato de sodio (FBP) se incrementa la tolerancia de oxígeno de *C. jejuni*. Incorporando sulfato ferroso en el medio de cultivo se incrementa el número de colonias que crecen.⁴⁹

4.2. METODOS DE ENRIQUECIMIENTO.

Los métodos de enriquecimiento son necesarios, porque rayar directamente los alimentos en el medio es inadecuado para recobrar cantidades pequeñas de *C. jejuni*, que pueden contener los

(49) DOYLE, M. P. ; Ob. Cit. 3:88,89.

alimentos. Barot y Bokkenheuser formularon un medio de enriquecimiento compuesto de caldo de tioglicolato con 5% de sangre lisada de cordero, una mezcla de antibióticos, y 0.1% de lauril sulfato para aislar *C. jejuni* de hígado de pollo. Otros caldos de enriquecimiento, contienen peptona, polvos de "lab lemco", extracto de levadura, cloruro de sodio, resarsurina y antibióticos, fueron utilizados para aislar *C. jejuni* de la vesícula biliar de cerdos sacrificados. Las muestras fueron incubadas a 42°C, en una atmósfera reducida de oxígeno, y los cultivos enriquecidos son colocados en un agar selectivo después de 24 a 48 hrs de incubación. Acuff y col. describieron un procedimiento de enriquecimiento MNP utilizando un medio selectivo que contenía caldo Brucella,, suplemento FBP, y agentes antimicrobianos para recobrar *C. jejuni* de huevos y carne de pavo. Ellos reportaron, que solamente 0.3-3.3 *C. jejuni*/ml del caldo de enriquecimiento pudieron ser recobrados con este procedimiento.

Doyle y Roman crearon un medio de enriquecimiento que consistía de caldo Brucella, 7% de sangre lisada de caballo, 0.3% de succinato de sodio, 0.01% de hidrocloreuro de cisteína, vancomicina (15 mg/L), trimetoprim (5mg/L), polimixina B (20,000 UI/L), y ciclohexamina (50 mg/L). Este caldo es inoculado con 10 o 25 gr. de muestra e incubado con agitación bajo condiciones microaerofílicas. El procedimiento puede detectar 2 *C. jejuni*/gr de carne inoculada con una exactitud de 96 %.

Park y col. describieron un procedimiento de enriquecimiento para aislar *C. jejuni* de pollo. Las muestras fueron lavadas en un caldo nutritivo, después son filtradas en una gasa y centrifugadas a 16,000 x g durante 15 min. El sedimento es transferido a un matraz Erlenmeyer, que contiene 100 ml de caldo de enriquecimiento, compuesto de caldo Brucella, antibióticos, 5% de sangre lisada de caballo, y 0.025% de FBP. Ellos determinaron que las condiciones óptimas para recobrar *C. jejuni* usando su

medio y condiciones adecuadas con un pH del medio a 7.0 y una temperatura de incubación de 42°C durante 48 hrs antes de ser colocado en el agar selectivo.

Wesley y col. publicaron un procedimiento de enriquecimiento selectivo para aislar *C. jejuni* de productos agrícolas. Su caldo consistía de triptosa, extracto de levadura, cloruro de sodio, suplemento FBP, bicina, 0.1% de agar, solución hemática y antibióticos. El pH es ajustado a 8 y el cultivo permanece a 42°C por 48 hrs, bajo una atmósfera microaerofílica. Este procedimiento ha sido particularmente efectivo para inhibir *Pseudomonas aeruginosa*. Rogol y col. describieron un método de enriquecimiento similar a otros reportados en la literatura pero difieren en que se incorporan 1.5 gr de sales de bilis /L.⁵⁰

4.3. MEDIOS SELECTIVOS DE AISLAMIENTO

4.3.1. Especies de *Campylobacter* spp. entéricos.

Tres factores son importantes en el aislamiento de especies termofílicas de *Campylobacter*: 1) El uso de medios selectivos, 2) La incubación de las placas en atmósfera de oxígeno reducido con CO₂ añadido y 3) La incubación de placas de aislamiento primario a 42°C. Varios medios selectivos han sido desarrollados para aislar especies de *Campylobacter*.⁵¹ Estos medios selectivos fueron desarrollados para recobrar el organismo de muestras de pacientes con gastroenteritis y fueron subsecuentemente utilizados para aislar *C. jejuni* de alimentos. Los más importantes medios selectivos son : La formulación "Butzler", la formulación "Skirrow", la formulación Campy-BAP,^{52, 53} y más recientemente el medio Preston libre de sangre. Datos de un estudio donde

(50) DOYLE, M. P. Ob. Cit. 3:89

(51) LENNETTE, E. N., Ob. Cit. 27:385

(52) DOYLE, M. P., Ob. Cit. 3:90

(53) LENNETTE, E. N., Ob. Cit. 27:385

comparan un medio selectivo indican que el medio Campy-BAP fue más efectivo para recobrar *C. jejuni* de carne, mientras que el medio Butzler fue más selectivo para el organismo.⁵⁴ Si por razones de economía se hace necesario el uso de un sólo medio y sólo una lectura, se recomienda el medio Campy-BAP y un tiempo de incubación de 48 hrs. Es preferible el uso de dos medios diferentes a un sólo medio, ya que el rendimiento aumenta en aproximadamente 10% . No recomendamos el uso de rutina de caldo de enriquecimiento selectivo para el aislamiento de especies de *Campylobacter* de muestras fecales, sin embargo, se han desarrollado numerosos caldos selectivos de enriquecimiento para mejorar la recuperación de *C. jejuni* de muestras clínicas y ambientales. Caplan obtuvo un aumento del 10% en la tasa de aislamiento de *C. jejuni* de muestras fecales con enriquecimiento en frío durante 16 a 18 hrs, en Blaser-Campy-Pio, un medio preparado con tioglicolato que contiene agar al 0.16% y los agentes antimicrobianos enumerados en el Blaser-Campy-Bap. La utilidad de un caldo de enriquecimiento puede variar con el tipo de muestra que se procesa, el enriquecimiento puede ser beneficioso con muestras fecales no muy bien manipuladas, tales como las demoradas en tránsito o mantenidas a temperatura ambiente demasiado tiempo. Otras muestras posiblemente beneficiadas con el enriquecimiento son las fecales o ambientales, en las que se piensa que hay bajo número de microorganismos de *Campylobacter*, tales como las muestras de portadores, casos postsintomáticos, pacientes que han sido tratados con antibióticos y muestras de alimentos y agua. El caldo de enriquecimiento es especialmente ventajoso para el aislamiento de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* de alimentos.⁵⁵

(54) DOYLE, M. P. Ob. Cit. 3:90

(55) LENNETTE, E. N., Ob. Cit., 27:385, 386

4.3.2. *Campylobacter pylori*.

H. pylori (anteriormente llamado *C. pylori*) es un organismo que requiere una temperatura de 35 a 37°C, un medio ambiente húmedo, y un medio ambiente microaerofílico. Una vez en el laboratorio, la muestra es colocada en un medio suplementado como agar chocolate, o un medio selectivo de Skirrow e introducirse en una jarra que contenga papel secante, a 35°C, en condiciones microaerofílicas durante 7 días.^{56,57} A estos medios de cultivo se le ha reportado una sensibilidad de 50 a 95%; pero tiene una especificidad del 100%.⁵⁸ El crecimiento de colonias pequeñas translucidas es notado después de 3 días de incubación. *C. pylori* es identificado como móvil, curvo gram negativo, oxidasa positivo, y productor de ureasa. No reduce nitratos o hidroliza el hipurato; es inhibido por la cefalotina, pero no por el ácido nalidíxico.

Este organismo puede ser identificado utilizando tinciones, como hematoxilina-eosina, Gram, Giemsa, y el método de plata de Warthin-Starry. Esta última, ha demostrado al organismo más claramente y es el procedimiento de elección.⁵⁹ Ver Fig. 3

4.4. IDENTIFICACION.

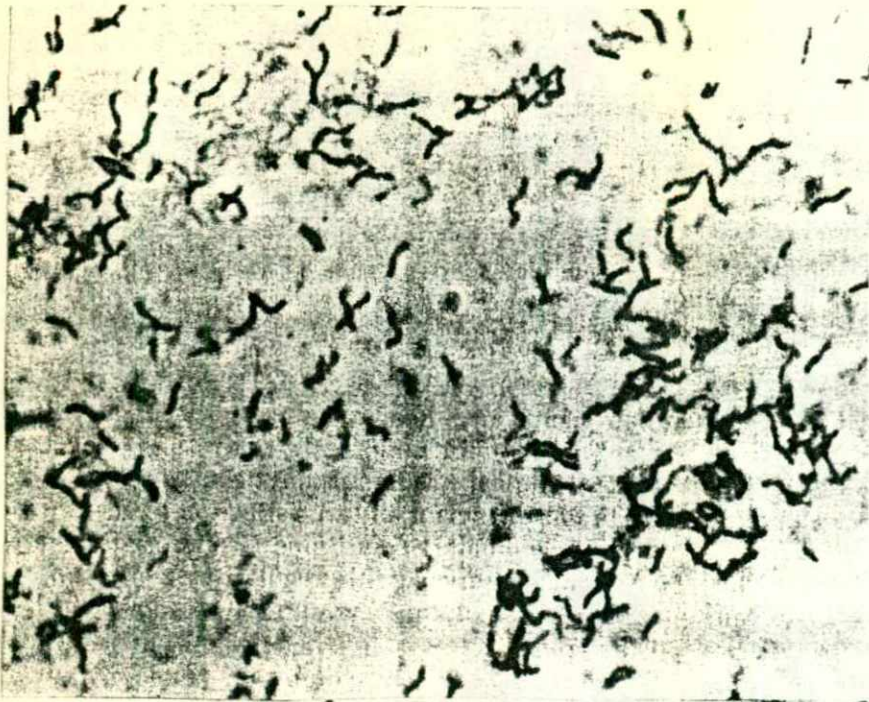
Placas de agar selectivo deben ser examinadas para observar las colonias típicas de *C. jejuni* a las 24, 48 y 72 hrs de incubación a 42°C. Si no hay colonias aparentes, deben de reestablecerse las condiciones microaerofílicas y las placas ser regresadas a la incubadora. Las colonias típicas de *C. jejuni* en agar suplementado con sangre son translucidas, no hemolíticas, planas o ligeramente elevadas, redondas o con bordes irregulares, y aparecen grises o rosas. Si las placas están húmedas o la

(56) JOANN, E. O. Ob. Cit. 415

(57) GUSTAVSSON, M. D. Ob. Cit. 266

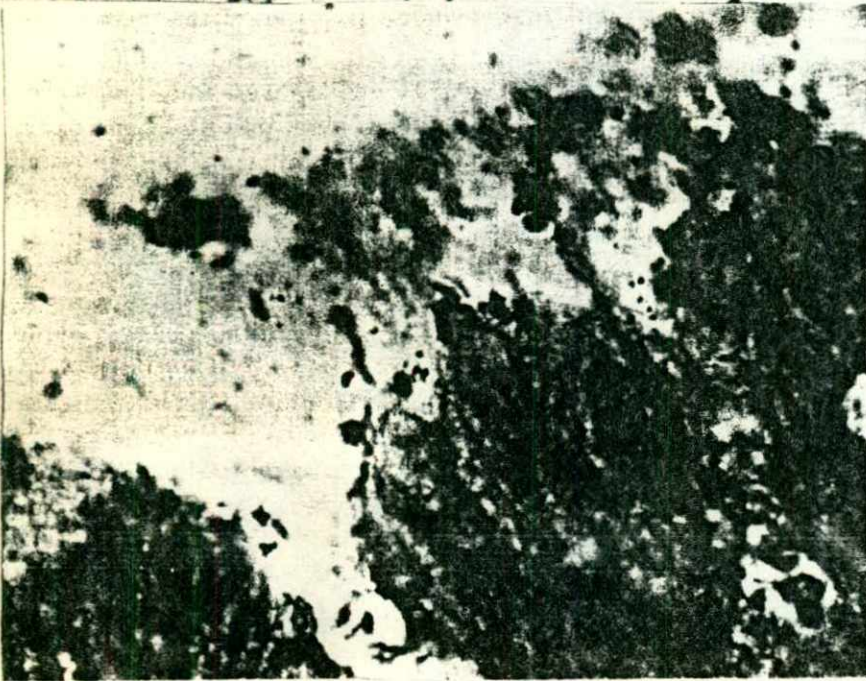
(58) JOANN, E. O. Ob. Cit. 416

(59) GUSTAVSSON, M. D. Ob. Cit. 266



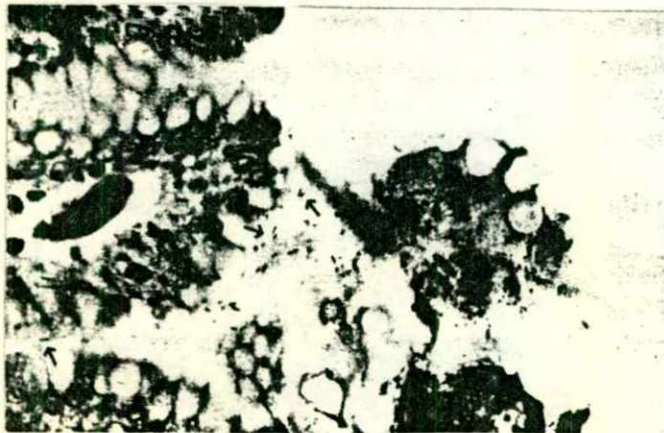
Gram de *C. pylori* en cultivo puro después de 96 h de incubación en agar chocolate. (X1000)

BLASER



Gram contrastado con Carbol fuchsin de biopsia gástrica de un paciente con gastritis aguda (X100)

BLASER



Fotomicrografía de la tinción de plata de Warthin-Starry de biopsia gástrica mostrando numerosos *H. pylori*.

JoANN

FIG. 3

humedad es muy elevada en la incubadora, la colonia tiende a alargarse y normalmente tiene una consistencia acuosa. Por este motivo, después de 48 hrs de incubación, las colonias son normalmente pequeñas: aproximadamente de 1-4 mm de diámetro.

Las colonias características deben ser transferidas a un portaobjetos húmedo y observados en un microscopio de contraste de fases. El criterio más importante a considerar cuando se identifica *C. jejuni* es que es muy angosto en comparación con su longitud, su movimiento en espiral, y su forma de coma, *s*, de gaviota o espiral. Un mejor criterio taxonómico debe ser probado cuando el microorganismo aislado tiene estas características. La prueba para confirmar Catalasa positiva en *Campylobacter spp* se muestra en la tabla 2. Una diferenciación entre *C. jejuni*, *C. coli*, y *C. laridis* no es crítico para un microbiólogo en alimentos porque cada uno de estos microorganismos es responsable de infecciones humanas. Pruebas serológicas se obtienen comercialmente, y proveen información en estudios epidemiológicos en donde los microorganismos aislados involucran una infección humana.⁶⁰

(60) DOYLE, M. P. Ob. Cit. 3:90

CARACTERISTICAS DE CAMPYLOBACTER SPP.^a CATALASA POSITIVOS.

TOLERANCIA

Especies de Campylobacter	Oxidasa	Catalasa	Fermentación del Azúcar.	Reducción de NO ₃	Reducción de NO ₂	H ₂ S ^b	Hidrólisis de Urea	Hidrólisis de Hipurato	1% de Glicina	3.5% NaCl	25°C	30.5°C	37°C	42°C	Placa Aeróbica	Placa 5% O ₂	Cloruro de Cadmio	Acido Nalidixico ^d	Cefalotina ^e	TTC ^f
Jejuni	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	V	+	+	-	+	S	S	R	V
coli	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	S	S	R	V
fetus subesp fetus	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	V	-	+	S	R	S	S
fetus subesp. venerealis	+	+	-	+	-	V	-	-	-	-	+	+	+	V	-	+	S	R	S	S
pylori	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	S	R	-

S, sensible; R, resistente; +, crecimiento o respuesta positiva; -, no crecimiento, respuesta negativa; V, variable
b Medio base (Medio semisólido Brucella) con cisteína. Detecta H₂S con tiras de acetato o papel filtro colocado sobre el tubo de cultivo.

c Zona de inhibición en agar alrededor de un disco que contiene 20 µg de CdCl₂

d Zona de inhibición en agar alrededor de un disco que contiene 30 µg de Ac. Nalidixico.

e Zona de inhibición en agar alrededor de un disco que contiene 30 µg de Cefalotina.

f TTC, 2,3,5 cloruro de trifenilmetetrazolium; una zona de inhibición de más de 6 mm. indica una cepa sensible.

4.5 PRUEBAS BIOQUIMICAS.

4.5.1 PRUEBA DE LA CATALASA

4.5.1.1 PRINCIPIO.

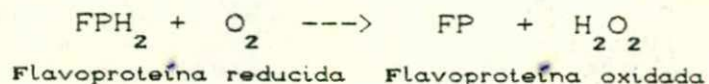
Comprobar la presencia de la enzima catalasa.

4.5.1.2 BASES BIOQUIMICAS.

La enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. La catalasa es una hemoproteína; el grupo prostético está formado por cuatro átomos de hierro trivalente (Fe^{+++} -férico) por molécula que retiene su estado oxidado durante la actividad enzimática.

Whittenbury observó la presencia de dos tipos de catalasa entre las bacterias que producen ácido láctico: 1) la clásica catalasa que descompone el peróxido de hidrógeno y que no es sensible a las condiciones ácidas, y 2) una pseudocatalasa que carece del grupo prostético hem y es sensible a un pH ácido.⁶¹

El peróxido de hidrógeno se forma como un producto terminal oxidativo de la descomposición terminal oxidativo de la descomposición aeróbica de los azúcares. La flavoproteína reducida reacciona directamente con el oxígeno gaseoso por medio de la reducción de electrones, para formar peróxido de hidrógeno, y no por acción directa entre el hidrógeno y el oxígeno molecular.



(61) MAC. FADDIN, J. T., Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana. México. 1984. 5:39

2. Mantener continuamente refrigerado cuando no se use.

B) Buffer de fosfato (M/15), pH: 7

1. Ingredientes.

- a) Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) anhidro..... 1.361 g.
- b) Fosfato disódico (Na_2HPO_3) anhidro..... 1.420 g.
- c) Agua destilada 1 000 ml.

2. Método de preparación.

- a) Agregar las sales a un pequeño volumen de agua destilada (chervida y enfriada antes de su uso) en un matraz volumétrico de un litro.
- b) Disolver por agitación y agregar agua destilada cbp 1000 ml.

C) Tween 80, 10 %

1. Se obtiene el producto en el comercio:

BBL-Tween 80 (polisorbato 80).

2. Método de preparación.

- a) Agregar 1 ml de Tween 80 concentrado a un pequeño volumen de agua destilada en un frasco volumétrico de 10 ml.
- b) Disolver por agitación y agregar agua destilada cbp 10 ml.

El Tween 80 es un polioxietileno derivado del monoleato de sorbitán, compuesto de actividad en superficie.

D) Control de Calidad:

El peróxido de hidrógeno debe ser controlado con cultivos positivos y negativos conocidos, antes de su uso general. El *Staphilococcus aureus* y cualquier especie de *Streptococcus* son buenos controles. *S. aureus*: prueba fuertemente positiva; especies de *Streptococcus*, prueba negativa. También puede usarse una placa de agar sangre como control positivo (debido a la catalasa de los eritrocitos), y una placa de agar chocolate como control negativo.

E) Conservación:

Guardar todos los reactivos en un refrigerador (4°C) mientras no se usan. La estabilidad del buffer fosfato es variable; por lo tanto, deberá hacerse un control de calidad periódico y descartarlo cuando muestre una reacción negativa o débil con un organismo positivo conocido.

4.5.1.4 METODOS:

A) Pruebas de la catalasa de rutina, a temperatura ambiente. (25°C)

1. Método en portaobjetos, procedimiento recomendado.

a) Con una aguja de inoculación recoger una colonia pura de 18 a 24 hrs y colocar sobre un portaobjetos de vidrio limpio.

b) Se debe tener cuidado de no introducir el asa en el agar sangre, ya que ésto invalida la prueba.

c) Agregar una gota de H_2O_2 al 30% sobre el organismo del portaobjetos. Usar un gotero o una pipeta Pasteur.

1. No invertir el orden del método porque pueden producirse resultados falsos positivos.

2. No mezclar con el asa de inoculación. No es necesaria la mezcla del microorganismo y el H_2O_2 .

d) Observar la formación de burbujas (liberación de gas) y registrar el resultado.

2. Método en tubo de ensayo.

a) Agregar directamente 1 ml de H_2O_2 al 3% a un cultivo puro en agar en pico de flauta, densamente inoculado.

b) No utilizar un medio de cultivo de agar sangre.

c) Observar la formación de burbujas y anotar.⁶³

(63) MAC. FADDIN, J. T., Ob. Cit. 5:41

4.5.1.5 RESULTADOS.

Los resultados se pueden observar en el apéndice.

4.5.1.6 INTERPRETACION

- A). Prueba positiva: formación inmediata de burbujas bien visibles (formación de O_2). Prueba positiva para *Campylobacter spp.*
- B). Prueba Negativa: no hay formación de burbujas, no se forma O_2 .⁶⁴

4.5.2 PRUEBA DE LA OXIDASA

4.5.2.1 PRINCIPIO.

Determinar la presencia de la enzima oxidasa.

4.5.2.2 BASES BIOQUIMICAS.

La prueba de la oxidasa está basada en la producción bacteriana de una enzima oxidasa. Esta enzima citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones.⁶⁵

4.5.2.3 REACTIVOS EMPLEADOS.

A) Reactivo para la oxidasa.

1. Reactivo de Kovacs: Diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%

(64) MAC FADDIN, J. T., Ob. Cit. 5:42

(65) MAC. FADDIN, J. T. Ob. Cit. 23:155

B) Método de preparación:

1. Disolver 1 gr del reactivo en menos de 100 ml de agua destilada.
2. Calentar suavemente hasta su disolución.
3. Pasar a un matraz volumétrico y agregar un diluyente adecuado (agua o alcohol etílico) cbp 100 ml.
4. Dejar reposar 15 min. / antes de su empleo.
5. Guardar en frasco de vidrio de color ambar, tapado. Evitar innecesaria exposición a la luz.

El reactivo de Kovacs, solución acuosa al 1% de tetrametil-p-fe nilendiamina, es poco tóxico y sumamente sensible. Este reactivo imparte un color lavanda a las colonias oxidasa positivo que gradualmente vira a un púrpura negruzco intenso, pero también puede impartir color al medio que las rodea.

C. Control de calidad:

Cualquiera de los reactivos empleados, deben ser controlados con cultivos positivos y negativos conocidos antes de su empleo general.

La *E. coli*, cualquier especie de *Neisseria* o de *Pseudomonas aeruginosa* constituyen un buen control, dado que se obtienen fácilmente y no ofrecen problemas para su conservación en cultivos madre: *E. coli*, reacción oxidasa negativa; *Neisseria spp.*, *P. aeruginosa*, reacción oxidasa positiva. ⁶⁶

D) Conservación

Guardar todos los reactivos en un refrigerador (4°C) mientras no se use; calentar los reactivos antes de su empleo. Barry y Bernshon recomiendan congelar los reactivos en volúmenes de 1 a 2

(66) MAC. FADDIN, J. T. ob. Cit. 23:156,157

ml. para reducir la autooxidación y prolongar su actividad. Todos los reactivos deben ser recién preparados antes de su empleo, puesto que en solución se desactivan rápidamente. Si están refrigerados, pueden mantenerse estables desde 5 días a 2 semanas.

4.5.2.4 METODO.

A) Método en placa directa.

1. Agregar directamente 2 o 3 gotas de reactivo a algunas colonias sospechosas que se desarrollan en un medio en placa, por ejemplo, agar sangre o agar chocolatado.
2. No inundar toda la placa con el reactivo.
3. Observar los cambios de color.

Reactivo de Kovacs: reacción de color dentro de los 10 a 15 seg.

B) Método indirecto de Kovacs sobre papel,

1. Colocar en un trozo de 6 cm² de papel filtro Whatman #1 en una caja de petri.
2. Agregar de 2 a 3 gotas de reactivo de Kovacs en el centro del papel.
3. Hacer un extendido con el asa de inoculación de una colonia sospechosa, en el papel impregnado con reactivo siguiendo una línea de 3 a 6 cm de longitud.
4. La reacción de color positiva se produce de los 5 a 10 segundos.

4.5.2.5 RESULTADOS.

Los resultados se pueden ver en el apéndice.

4.5.2.6 INTERPRETACION.

- A). Colonias oxidasa positivas: la colonia toma un color rosado, después marrón y finalmente negro. *Campylobacter spp.*
- B). Colonias oxidasa negativas: No se produce cambio de color en las colonias, o sólo adquieren un color rosado pálido por el reactivo. Puede producirse una coloración negra del medio circundante.

Si se emplea el reactivo de Kovacs, la reacción oxidasa positiva está indicada por un color negro purpúreo que se desarrolla en el término de 10 seg; la reacción positiva dentro de los 10 a 60 seg. se considera un resultado retardado. Steel asegura que el desarrollo tardío de color, pasado un periodo de 60 seg. indica una prueba oxidasa negativa.⁶⁷

4.5.3 PRUEBA DEL NITRATO

4.5.3.1 PRINCIPIO.

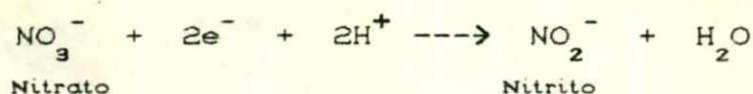
Determinar la capacidad de un organismo de reducir el nitrato en nitritos o en nitrógeno libre.

4.5.3.2 BASES BIOQUIMICAS.

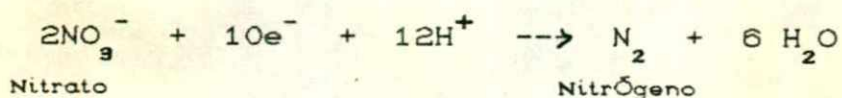
La reducción del nitrato (NO_3^-) en nitrito (NO_2^-) y en gas nitrógeno (N_2) tiene lugar generalmente en condiciones anaeróbicas, en las cuales un organismo obtiene su oxígeno del nitrato. El oxígeno sirve como un aceptor final de protones y electrones. La mayoría de las bacterias aeróbicas son anaerobios facultativos y sólo pueden reducir el nitrato en ausencia de oxígeno. Esta respiración anaeróbica es un proceso de oxidación

(67) MAC. FADDIN, J. T. Ob. Cit. 23:158

por el cual las sustancias inorgánicas, especialmente nitrato y sulfato, o raramente hidratos de carbono proporcionan oxígeno para que sirva como aceptor de electrones para suministrar energía. En la reducción por nitrato, los citocromos bacterianos transportan electrones a moléculasceptoras específicas. Gunsalus y Stanier aseguran que hay pruebas de que el nitrato actúa como el oxidante final en los sistemas citocromo.



Sin embargo, las posibilidades del producto final de reducción del nitrato son muchas: nitrito (NO_2^-), amoníaco (NH_3), nitrógeno molecular (N_2), óxido nítrico (NO), óxido nítrico (N_2O). El producto final de la reducción que se forme depende de la especie bacteriana. El más común es nitrógeno molecular (un gas) por medio de la reducción de nitrito.⁶⁸



La reducción, por lo tanto, en la prueba de reducción del nitrato, se manifiesta por la presencia de un producto final catabólico o la ausencia de nitrato en el medio.

4.5.3.3 MEDIOS EMPLEADOS.

A) Caldo con nitrato pH=7

B) Agar con nitrato pH=7

Para la elaboración de los medios ver el apéndice

(68) MAC FADDIN, J. T., Ob. Cit. 21:142

correspondiente.

C) Método de preparación:

1. Pesar las cantidades indicadas.
2. Rehidratar con agua destilada.
3. Calentar suavemente hasta disolución.
4. Distribuir en tubos o en placa.

a) Agar con nitrato: 5 ml por tubo.

b) Caldo con nitrato: 1 ml por tubo.

D) Método de esterilización.

1. Autoclave.
2. 121°C, 15 lbs, 15 min.

E) Dejar que solidifique el medio de agar en pico de flauta.

F) Dejar enfriar cualquiera de los medios antes de su empleo y refrigerar para su conservación (4-10°C)

G) Inoculación.

1. Crecimiento de un cultivo puro de 18 a 24 hrs.
2. Medio de caldo inóculo denso.
3. Medio de agar en pico de flauta: cola de pescado en el pico de flauta y punción en la capa profunda.
4. Deben hacerse simultáneamente dos controles.

a) Tubo de control 1: Inoculado con un organismo nitrato positivo conocido.

b) Tubo de control 2: no inoculado, pero tratado en las mismas condiciones que el inoculado. Controlar para determinar si hay nitrito en el medio.

H) Incubación.

1. 35°C.
2. De 12 a 24 Hrs.
3. Agregar reactivos de nitrato antes de hacer la interpretación.

El medio con nitrato puede utilizarse como caldo o como agar en pico de flauta. Sin embargo, ZoBell y Hitchens recomiendan el uso de un medio semisólido que contenga 0.2 a 0.4 % de agar. ZoBell asegura que un medio semisólido favorece la reproducción, permite el movimiento de los organismos, difunde rápidamente los nutrientes y productos de desecho y aumenta las actividades reductoras de un organismo.⁶⁹

4.5.3.4 REACTIVOS EMPLEADOS.

A) Reactivo A: dos elecciones.

1. α -naftilamina, 0.5%.
2. Dimetil- α -naftilamina, 0.6%.

a) Ingredientes.

1. α -naftilamina 5 gr.
(o dimetil- α -naftilamina) 5 gr.
2. Acido acético (5N) 30% 1000 ml

b) Método de preparación.

1. Disolver cualquiera de ambas sustancias en menos de 1000 ml de ácido acético 5N, por medio de un suave calentamiento.

a) Acido acético 30 ml

b) Agua destilada cbp 1000 ml.

2. Pasar la solución a un frasco volumétrico de 1 litro y agregar ácido acético 5 N cbp 1000 ml.

3. Filtrar la solución con un algodón absorbente.

4. Guardar en frasco ambar, tapado.

5. Rotular correctamente.

B) Reactivo B: ácido sulfanílico, 0.8 %.

1. Ingredientes.

a) Acido sulfanílico (ácido paraaminobenzen-sulfónico) 8gr.

b) Acido acético (5 N) 30 % 1000 ml

(69) MAC FADDIN, J. T., Ob. Cit. 21:143

2. Método de preparación.

a) Disolver el ácido sulfanílico en menos de 1000 ml de ácido acético 5 N.

b) Pasar la solución a un frasco volumétrico de 1 lt. y agregar ácido acético 5 N cbp 1000 ml.

c) Guardar en un frasco de vidrio de color ambar, tapado.

d) Rotular correctamente.

C) Control de Calidad.

Ambos reactivos A y B deben ser controlados con cultivos positivos y negativos conocidos antes de su uso general. Son buenos controles la *E. coli* y el *Acinetobacter calcoaceticus* porque se obtienen fácilmente y su conservación en forma de cultivos madre no ofrece inconvenientes. *E. coli*: reduce los nitratos (+). *Acinetobacter calcoaceticus*: no reduce los nitratos (-).

D) Conservación.

Guardar ambos reactivos en el refrigerador (4°C) mientras no se les usa. Por lo general éstos reactivos se mantienen estables por lo menos 3 meses.

4.5.3.5 METODO.

1. Fase 1.

a) Agregar directamente a un cultivo de nitrato incubado:

1. Reactivo A: 1 ml

2. Reactivo B: 1 ml

b) Un resultado positivo (color rojo) dentro de los 30 seg. indica una prueba completa; desechar el tubo.

c) Si es negativo (no aparece color) continuar con la fase 2.

2. Fase 2. Método de reducción del Zn.

a) Agregar directamente el tubo que contiene los reactivos A

- y B, una pizca (aprox, 20 mg) de polvo de Zn.
- b) El polvo de Zn debe estar exento de nitratos o nitritos.
 - c) Observar la interpretación final. El color se produce en el término de 30 seg.

4.5.3.6 RESULTADOS.

Los resultados pueden verse en el apéndice.

4.5.3.7 INTERPRETACION.

- a) Fase 1.
 - 1. Prueba positiva.
 - a) Color rosado o rojo intenso.
 - b) Nitrato reducido a nitrito por el organismo.
 - c) Prueba completa. Se trata de *Campylobacter spp.*
 - 2. Prueba negativa.
 - a) No se ha desarrollado color.
 - b) Seguir con la fase 2.
- b) Fase 2. Prueba de la reducción del Zn.
 - 1. Prueba positiva
 - a) No se desarrolla color.
 - b) Ausencia de nitrito en el medio.
 - c) El organismo redujo el nitrato en nitrito y luego redujo nuevamente el nitrito. Es *Campylobacter spp.*
 - 2. Prueba negativa.
 - a) Color rosado o rojo intenso.
 - b) Nitrato presente; no ha sido reducido por el organismo.
 - c) El Zn redujo el nitrato en nitrito.⁷⁰

(70) MAC. FADDIN, J. T. Ob. Cit. 21:146

4.5.4 PRUEBA DEL ACIDO SULFHIDRICO

4.5.4.1 PRINCIPIO

Determinar si se ha liberado ácido sulfhídrico (H_2S) por acción enzimática, de los aminoácidos que contienen azufre produciendo una reacción visible de color negro.

4.5.4.2 BASES BIOQUIMICAS.

La proteólisis de las proteínas da aminoácidos individuales; algunas especies bacterianas heterotróficas son capaces de liberar azufre enzimáticamente de los diferentes aminoácidos que las contienen, produciendo un gas H_2S . La peptona, la cisteína, la cistina y el tiosulfato, todos son fuentes de azufre, pero las diferentes especies utilizan distintos compuestos o aminoácidos que contienen azufre para producir H_2S . La enzima responsable de ésta actividad es la cisteinasa.

Un organismo que produzca H_2S cultivado en un medio orgánico como la peptona, reduce el azufre por hidrogenación, produciendo el gas H_2S .

La capacidad de un organismo de producir H_2S es una característica constante y el que lo hace, por lo genral, produce gas ($CO_2 + H_2$) en medios con hidratos de carbono.

Para determinar la producción de ácido sulfhídrico deben tenerse en cuenta cuatro factores: 1) El tipo y la disponibilidad de la fuente de azufre; 2) La sensibilidad de la prueba para la detección de H_2S .; 3) El crecimiento de un organismo en un medio básico; 4) La presencia de la enzima reductora de H_2S en el organismo que se estudia.⁷¹

(71) MAC FADDIN, J. T. Ob. Cit. 13:94,96

4.5.4.3 MEDIOS EMPLEADOS.

Prueba de la tira de acetato de plomo.

1. Tiras de reactivo.

a) Reactivo: solución acuosa de acetato de plomo, saturado caliente.

b) Producto comercial disponible: Tiras para la prueba de H_2S de Difco.

c) Preparación de las tiras de papel de acetato de plomo.

1. Cortar el papel filtro en tiras de aproximadamente 1.2 cm y 2.4 cm de largo.

2. Sumergir las tiras en solución de acetato de plomo caliente y colocar (tomándolas con unas pinzas) en un frasco de boca ancha con tapa de rosca.

3. Dejar secar al aire o colocar en estufa a 50 - 60°C.

4. Cerrar el frasco con cinta de autoclave; tapar sin apretar.

d) Método de esterilización.

1. Autoclave

2. 121°C, 15 lbs, 15 min.

e) Enfriar y secar.

f) Rotular el recipiente con la fecha del proceso de autoclave. Volver a esterilizar después de 3 semanas.

2. Medios empleados.

Caldo nutritivo pH=6.0. Ver los medios en el apéndice I.

3. Método de preparación.

a) Pesar la cantidad exactamente como se indica.

b) Rehidratar con agua destilada.

c) Calentar suavemente hasta disolución.

d) Distribuir de 4 a 5 ml por tubo.

4 Método de esterilización

a) Autoclave.

b) 121°C, 15 lbs, 15 min.

5. Enfriar a 45°C en un baño de agua.

4.5.4.4 METODO.

A) Método de ZoBell y Feltham.

B) Medio: Caldo nutritivo.

C) Inoculación.

a) Crecimiento de un cultivo puro de 18 a 24 hrs.

b) Inóculo espeso.

D) Asépticamente, suspender una tira de acetato de plomo estéril por sobre el nivel del caldo.

a) Colocar la tira en el tubo, sobre un costado, a unos 10 mm por encima del nivel del caldo. No sumergir la tira en el caldo.

b) Asegurar la tira. Doblar un extremo de la tira sobre el borde del tubo. Poner la tapa para mantener la tira en su lugar.

E) Incubación.

De 30 (óptima) a 35°C. Leer al cabo de 12 a 24 hrs. Esperar 6 días antes de hacer el informe negativo.

4.5.4.5 RESULTADOS.

Los resultados pueden verse en el apéndice.

4.5.4.6 INTERPRETACIONES.

A) Positivo: coloración negro pardusca de la tira de papel; puede tener cierto brillo.

B) Negativo: no hay alteración ni coloración de la tira.⁷²

(72) MAC FADDIN, J. T., Ob. Cit. 13:99,101

4.5.5 REACCION DE LA UREASA

4.5.5.1 PRINCIPIO.

Determinar la capacidad de un organismo de desdoblar la urea, formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa.

4.5.5.2 BASES BIOQUIMICAS.

El sustrato urea es una diamida del ácido carbónico, a la que frecuentemente se menciona como carbamida. Todas las amidas (RCO-NH_2) son rápidamente hidrolizadas. La hidrólisis de la ureasa es catalizada por una enzima específica, la ureasa, para dar dos moléculas de amoníaco. En solución, la urea se hidroliza, dando carbonato de amonio como producto final.

En el caso de la urea, el nitrógeno es disociado en amoníaco. La ureasa actúa sobre los enlaces C-N del compuesto, con excepción de los que contienen enlaces peptídicos.

El pH óptimo para la actividad de la ureasa es 7.

4.5.5.3 MEDIOS EMPLEADOS.

Caldo de Urea pH:6.8. Ver apéndice I para su preparación.

1. Indicador del pH: rojo de fenol.

a)Acido: color amarillo, pH:6.8

b)Alcalino: color rojo rosado, pH 8.4

c)Medio no inoculado:

1. pH:6.8

2. color amarillo anaranjado.

2. Productos comerciales.

BBL: caldo para la reacción de la ureasa.

3. Método de preparación:

a)Pesar las cantidades exactas.

b)Rehidratar con agua destilada.

c)No calentar para disolver. La urea se descompone con el calentamiento.

4. Método de esterilización.

a)Filtración

1.Método de filtro de membrana millipore.

2.Membranas: 0.45 μ de diámetro del poro.

b)Si el medio es preparado e inoculado inmediatamente, no es necesaria la filtración; pueden obtenerse resultados confiables.

5. Dejar enfriar antes de su uso y refrigerar para su conservación (4-10°C).

4.5.5.4 METODO.

a)Crecimiento de un cultivo puro de 18 a 24 hrs.

b)Inóculo denso: la cantidad recogida con el asa de inoculación (de 2 mm) 3 veces.

c)Agitar suavemente el tubo para lograr la suspensión de bacterias.

d)Incubar a 35°C.

e)Observar la reacción después de 8, 12, 24, 48 hrs de incubación.

f)Con el cambio de la temperatura se producen cambios en la velocidad de producción de urea.

4.5.5.5 RESULTADOS.

Los resultados pueden verse en el apéndice.

4.5.5.6 INTERPRETACION

1)Reacción positiva.

Color rojo rosado intenso en todo el caldo.

Positivo para *Campylobacter spp.*

2) Reacción negativa: no se produce cambio de color (amarillo-anaranjado).

4.5.5.7 PRECAUCIONES.

El elevado sistema buffer oculta la actividad ureasa en organismo que son positivos retardados.⁷³

4.5.6 PRUEBA DEL HIPURATO

Un asa llena de un cultivo de 18 hrs de agar infusión de corazón con 5% de sangre de conejo desfibrinada, se emulsiona en 0.4 ml de solución acuosa de hipurato de sodio al 1% y la suspensión densa se incuba en un baño de agua a 37°C durante 2 hrs. Tras la incubación, utilizar una pipeta para añadir lentamente 0.2 ml de solución de ninhidrina (ninhidrina al 3.5% en una mezcla 1:1 de acetona y butanol) por las paredes del tubo hasta formar una capa superior. Incubar 10 min. en un baño de agua a 37°C y examinar la suspensión para ver si hay color. Un púrpura intenso (cristal violeta) se considera reacción positiva. Las reacciones débiles se consideran negativas. Prueba positiva para *Campylobacter jejuni*.

4.5.7 TOLERANCIA A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

Inocular la superficie de un agar sangre con un inóculo de caldo infusión de corazón a fin de conseguir un desarrollo confluyente. Colocar un disco de 30 µg de ácido nalidíxico y 30 µg

(73) MAC FADDIN, J. T., Ob. Cit. 28:185,187

de cefalotina en la superficie del agar. Incubar a 36°C durante 18 hrs y leer. Si no se observa desarrollo en la placa, incubar y leer a las 48 hrs. Una zona de inhibición se considera una reacción susceptible.⁷⁴

(74) LENNETTE, E. N. Ob. Cit. 27:387

V. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD HUMANA

5.1. DETERMINANTES DE LA VIRULENCIA

Todos los *Campylobacter jejuni* aislados no tienen la misma virulencia y no todos los individuos son igualmente susceptibles a las infecciones por *Campylobacter*, por esta razón, no todos los individuos expuestos al microorganismo desarrollan gastroenteritis. Los reportes indican que tan sólo 500 *C. jejuni* viables podrían iniciar enteritis en humanos.

5.1.1. Mecanismos de Patogenicidad.

5.1.1.1. *Campylobacter jejuni*.

Aunque los mecanismo de patogenicidad de *C. jejuni* no son claros. Progresos considerables han sido realizados en los últimos 5 años, para comprender el factor de virulencia. Los mecanismos por los cuales *C. jejuni* causa infección han sido postulados en estudios de varios síndromes clínicos. Las características clínicas de las infecciones por *Campylobacter* parecen ser causadas por muchos enteropatógenos. El aislamiento de *C. jejuni* de muestras de sangre y otros sitios extraintestinales, indican que el organismo no es un simple patógeno oportunista. Como otros agentes patógenos, las infecciones por *C. jejuni* producen altos títulos de anticuerpos de IgG e IgM, indicando que los constituyentes celulares bacterianos entran en contacto con los componentes del sistema inmune extraintestinal para producir una respuesta inmunológica humoral en el huésped.⁷⁵

Los enteropatógenos producen infección por diferentes

(75) DOYLE, M. P., Ob. Cit. 3:92

mecanismos. Un ejemplo es la enterotoxigenicidad, por la cual, la bacteria coloniza el intestino, se multiplica en la superficie del intestino, y elabora enterotoxinas que estimulan el flujo de líquidos y electrolitos resultando en diarrea acuosa. La diarrea acuosa que se produce en algunas infecciones por *C. jejuni* pueden deberse a la elaboración de una enterotoxina que ha sido reportada por varios investigadores.

Un segundo mecanismo por el cual los enteropatógenos producen enfermedad es por medio de un proceso invasivo, en el cual, el organismo penetra el intestino o el colon. Después de la penetración, el organismo se multiplica intracelularmente y se disemina en/y a través de la mucosa, quedando una lesión superficial. El ileón terminal y el colon son primeramente involucrados, y las muestras en ocasiones contienen sangre y leucocitos. Blaser y col. reportaron muestras diarreicas sanguinolentas en pacientes con enteritis por *Campylobacter*; el ileón terminal y el colon son las áreas principalmente afectadas.

La variación en los síntomas de pacientes con enteritis por *Campylobacter* pueden ser el resultado de diferentes mecanismos por los cuales diferentes cepas de *C. jejuni* producen enfermedad. El establecimiento de una infección entérica es con frecuencia dependiente de la habilidad del enteropatógeno de colonizar la mucosa intestinal. Algunos enteropatógenos colonizan la superficie mucosa sobreviviendo y multiplicándose en las áreas externas de la capa mucosa cubriendo la superficie del intestino. Otros son capaces de colonizar las cavidades mucosas profundas de Lieberkuhn y las cavidades del colon por un mecanismo de agregación como quimiotaxis. *C. jejuni* es exitoso al colonizar y multiplicarse en el intestino humano, como fue demostrado por una gran cantidad de organismos en muestras diarreicas.

La mucosa intestinal, que es muy viscosa, combinado con la flora intestinal, sirve como una mejor barrera a la penetración para la mayoría de los enteropatógenos. Debido a que las especies de *Campylobacter* son altamente móviles y tienen forma de espiral, son capaces de penetrar esta matriz viscosa y colonizarla. Un estímulo quimiotáctico puede incluso facilitar la colonización incrementando la movilidad del organismo. La mucina gástrica de cochino, que ha sido utilizada para incrementar la virulencia de *Neisseria*, *Y. enterocolitica*, y *C. jejuni*, ha sido reportada como un quimioatrayente de *C. jejuni*. Esta respuesta quimiotáctica es parecida a la de L-fucosa, y L-serina que son componentes de la mucina. Hugdahl y Doyle estudiaron la quimiotaxis entre *C. jejuni* y encontraron que el organismo era atraído a L-fucosa, (solamente uno de 20 carbohidratos probados), y L-aspartato, L-cisteína, L-glutamato y L-serina, (de 15 aminoácidos probados). Lee y col. reportaron que *C. jejuni* tenía afinidad por la mucosa. *C. jejuni* difícilmente coloniza la mucosa de los folículos cuando es inoculado oralmente en ratones. La habilidad de *C. jejuni* de colonizar la mucosa intestinal exitosamente a través del moco fue propuesto como un determinante importante de patogenicidad.⁷⁶

(76) DOYLE, M. P., Ob. Cit. 3:92,93

Algunos investigadores han sugerido que la presencia de adhesión en los flagelos ayuda a *C. jejuni* a atacar las células epiteliales y a alterar los bordes. Varios medicamentos y la presencia de ciertas sustancias interfieren con la adherencia in vitro de *C. jejuni* a las células epiteliales. McBride y Newell demostraron una inhibición parcial de la adherencia por carbohidratos como glucosa, galactosa, N-acetil glucosamina, N-acetil galactosamina, y sorbitol. Tratando las células con 2.5 % de glutaraldehído, enzimas proteolíticas, y D-manosa, resultando una reducción del 50% de la adherencia de *C. jejuni* a las células.⁷⁷

5.1.1.2. *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*).

Es importante considerar varios mecanismos por los cuales *H. pylori* (*C. pylori*) causa enfermedad. Este organismo vive en el moco que cubre la mucosa gástrica y parece ser que no invade el tejido. La virulencia debe ser dividida en 2: Mantenimiento y Patogenicidad.

a) Funciones de mantenimiento: *H. pylori* es móvil, aún en un medio muy viscoso similar a la mucosa en la que vive. La movilidad le permite al organismo evadir la acidez gástrica y la peristálsis. La adherencia es otro mecanismo para el mantenimiento de la infección. Aunque *H. pylori* vive en la superficie de la mucosa, algunos se adhieren al epitelio. Se han descrito dos diferentes adhesinas.

La actividad de la ureasa a través de la producción de amoníaco, neutraliza la acidez gástrica en el microambiente de la bacteria. La constante de Michaelis de la ureasa de *H. pylori* a 0.4 mM es uno de los más bajos de las ureasas conocidas, permitiendo a la enzima operar a máxima eficacia, con una menor concentración de urea en el lumen gástrico⁷⁸.

(77) DOYLE, M. P., Ob. Cit. 3:92

(78) BLASER, M. J., *Helicobacter pylori*. . . . Ob. Cit. 629,630

H. pylori como especie *Campylobacter*, es muy susceptible a morir por condiciones ácidas, sin embargo, en presencia de urea, el organismo sobrevive porque la producción relacionada ureasa-amoniaco neutraliza la acidez. La actividad de la ureasa provee de nitrógeno al organismo.^{79,80} Ver figura 4.

b) Mecanismos de Patogenicidad: Leunk y col describieron una proteína citotóxica que causa vacuolización de cultivos de tejidos celulares, similar al observado en las células epiteliales de la mucosa en humanos infectados. El suero de personas infectadas neutraliza la actividad citotóxica y contiene anticuerpos para un marcador de la citotoxina. Cultivos filtrados de *H. pylori* producen además una proteínasa que degrada la mucina "in vitro". También se ha descrito una proteína de superficie que causa hipoproducción de ácido por las células parietales.⁸¹

5.1.2 Toxinas de *Campylobacter* spp.

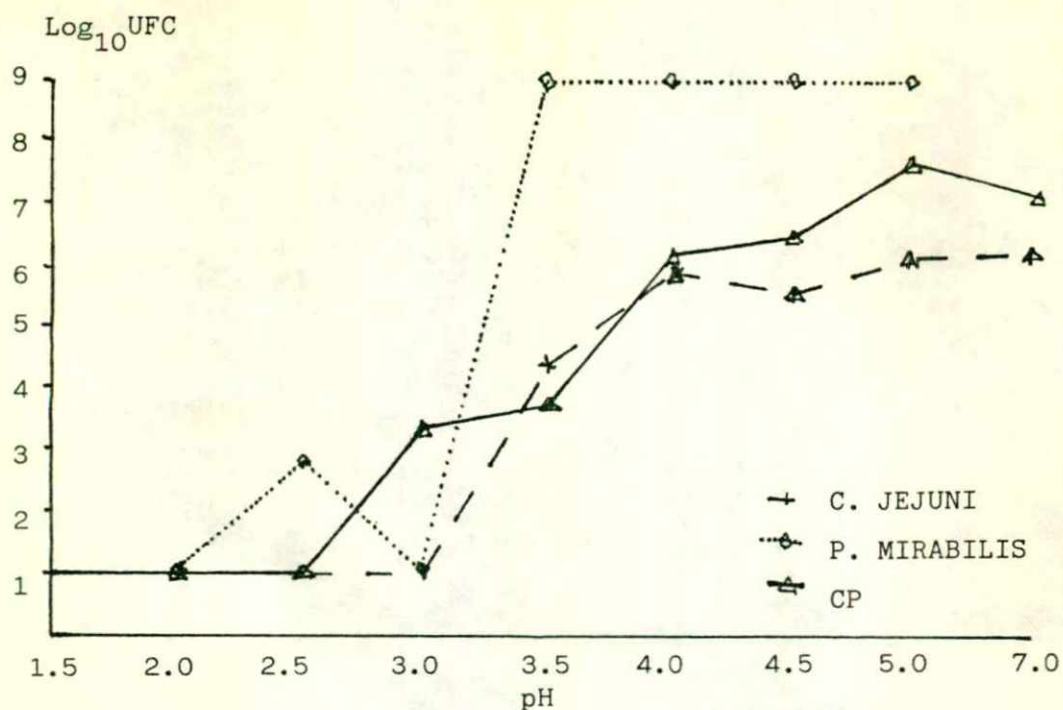
5.1.2.1. *Campylobacter jejuni*.

Los diferentes tipos de toxinas, que son producidas por diferentes cepas de *C. jejuni* pueden ser la razón de las diferencias de los síntomas clínicos de los pacientes con enteritis por *Campylobacter*: Ruiz-Palacios y col. fueron los primeros en describir una enterotoxina semejante a la del cólera producida por *C. jejuni*. Recientemente, Klipstein y col. reportaron una correlación entre los estados clínicos de individuos infectados y las propiedades patogénicas de los microorganismos aislados. Los aislamientos de individuos asintomáticos no producen

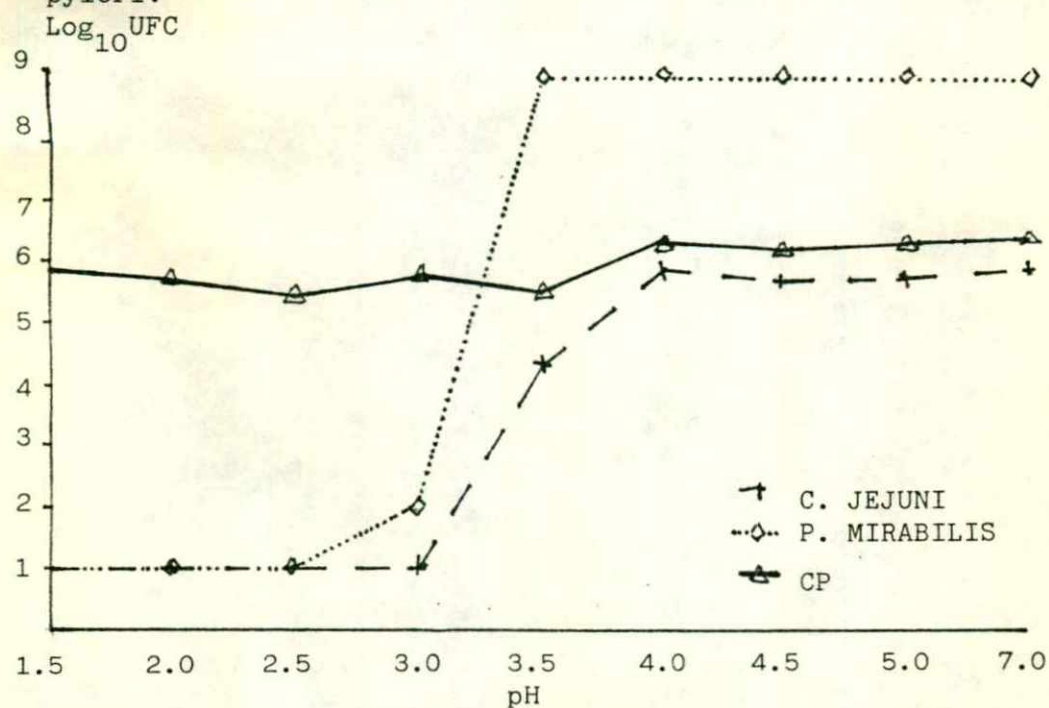
(79) BLASER, M. J., *Helicobacter pylori*. . . Ob. Cit. 630

(80) MARSHALL, B. J., BARRETT, L. J., PRAKASH, C., MAC CALLUM, R. W. Urea
protects *Helicobacter* (*Campylobacter*) *pylori* from the
bactericidal Effect of Acid. *Gastroenterology*. 1990. 99(3):697-
702

(81) BLASER, M. J., *Helicobacter pylori*. . . Ob. Cit. 630



Rango de sobrevivencia de las bacterias en ácido. *C. jejuni* y *P. mirabilis* similares a *H. pylori*, muestran poca sobrevivencia en ácido a $\text{pH} < 3.0$. La línea continua representa las cepas de *C. pylori*.



Rango de sobrevivencia de las bacterias en ácido con urea. En contraste con *H. pylori* (línea continua), *P. mirabilis* y *C. jejuni* no sobreviven en adición de una cantidad fisiológica de urea.

MARSHALL

toxinas; aislamientos de pacientes con diarrea secretora producen una enterotoxina que causa acumulación de líquido en el ileón de las ratas; y 6 muestras de pacientes con diarrea sanguinolenta, produjeron una citotoxina celular Vero o HeLa. Es interesante que los filtrados de pacientes con diarrea sanguinolenta no producen la acumulación de líquidos en ratas con el ileón ligado.

McCardell y col. aislaron una enterotoxina semejante a la del cólera que era citotóxica a células adrenales de ratón Y-1 y podían ser neutralizadas por antisueros de conejos contra la toxina del cólera. Kazmi y col. observaron una relación entre el incremento de la virulencia in vitro de las cepas de *Campylobacter jejuni* y la producción de enterotoxina soluble. El cultivo de filtrados de cepas pasadas por ratón de *C. jejuni* fueron fuertemente citotóxicas a las células Vero, mientras que cultivos filtrados del original fueron solamente un poco tóxicas, estos resultados sugieren un incremento en la expresión genética de las toxinas o una selección de los genes productores de toxinas durante su paso por el animal. Klipstein y col. usaron células ováricas de Hamsters chinos y enzimas ligadas inmunoabsorbidas (ELISA), para estudiar una enterotoxina de *C. jejuni*. Ellos encontraron que la toxina era similar a las toxinas termolábiles de *E. coli* (LT) y toxinas del cólera (CT). La respuesta secretora a la enterotoxina de *C. jejuni* en ratas con el ileón ligado fue neutralizada pasivamente con la administración de antisuero a LT o activado por inmunización con la toxina. Mientras que esta enterotoxina de *C. jejuni* no sea bien caracterizada, será reportada como una proteína larga con un peso molecular entre 60,000 y 70,000. La toxina es termolábil, es desnaturalizada en una hora a 56°C. Esta toxina es completamente destruida a un pH

de 2 y 8, y parcialmente inactivada a un pH de 4. La actividad tóxica se pierde progresivamente después de almacenamiento por un mes a 4°C.

Klipstein y col. encontraron que las toxinas de *C. jejuni* poseen una subunidad B semejante a CT que liga receptores específicos en la membrana celular permitiendo la internalización de adenilato gangliósido de la misma manera como la subunidad B de LT y CT es medido utilizando un gangliósido ligado GM₁ por el método de ELISA. Esta prueba indica una relación inmunológica entre las toxinas de *C. jejuni* y las subunidades LT y CT.

La observación común de muestras diarreicas sanguinolentas de pacientes con enteritis por *C. jejuni* sugiere una invasión de la mucosa directa del intestino por *C. jejuni*. Manninen y col. mostraron la asociación del organismo a las células HeLa que es seguido por penetración y proliferación celular.

Otros factores tóxicos producidos por *C. jejuni* causan citotoxicidad que afectan el riñón de ganado, ovarios de Hamsters chinos, células Vero y HeLa. Este factor citotóxico está presente en células libres por sonificación, y su liberación es incrementada tratando las células con Polimixina B antes de la centrifugación y filtración. Esta toxina es sensible a tripsina, y es más tolerante al calor (estable a 60°C por 30 min.) que las enterotoxinas de *C. jejuni*. Esta citotoxina no puede ser neutralizada por antisuero de conejo a la toxina Shiga o a las toxinas de *Clostridium difficile*. El significado de éste factor de citotoxicidad en la patogénesis de *C. jejuni* requiere mayor investigación.

La citotoxina y la enterotoxina producida por *C. jejuni* son aparentemente unidades separadas porque una o ambas pueden estar presentes en aislamientos clínicos. El antisuero a LT no

neutraliza la actividad citotóxica en las células Vero o HeLa.⁸²

5.1.2.2. *Campylobacter pylori*.

H. pylori (*C. pylori*) produce muchas enzimas y toxinas de desconocido significado clínico. Dos de éstas enzimas podrían ser de particular importancia. *H. pylori* produce grandes cantidades de urea amidohidrolasa (ureasa) una enzima postulada para alcalinizar y de ahí, optimizar el medio ambiente adyacente al microorganismo. *H. pylori* produce además una proteasa mucinolítica que amenaza la barrera mucosa, lo que teóricamente lo coloca en la mucosa inferior; con el riesgo de un mayor daño por el ácido y la pepsina. Estas enzimas han sido postuladas por su papel en la interacción entre el huésped y el organismo, y en algunos casos en su patología.⁸³

5.1.3 Utilización del Hierro.

La producción de toxinas por *C. jejuni* aumenta bajo condiciones de un exceso de hierro. Las cepas que no producen niveles detectables de toxina, pueden llegar a ser productores de toxina cuando se le adiciona al medio un suplemento con hierro. Esta observación está de acuerdo con un reporte de Kazmi y col. que indicaron que el hierro es un componente clave en la patogenicidad de *C. jejuni*. El hierro es un elemento esencial para el crecimiento de los microorganismos por su papel en el transporte de electrones. En sistemas biológicos por su papel como patógeno, el organismo debe adquirir hierro del huésped y aún competir con las proteínas que ligan y almacenan el hierro del huésped (transferrina y lactoferrina). Para adquirir el hierro

(82) DOYLE, M. P. Ob. Cit. 3:95

(83) JOANN, E. O., Ob. Cit. 415

necesario, el microorganismo produce compuestos proteicos de alta afinidad que pueden ligar y solubilizar el fierro para transportarlo a través de la membrana celular.

Los compuestos ligadores del fierro producidos por la bacteria, son colectivamente llamados sideróforos. Estas proteínas tienen capacidad de ligar el fierro como las proteínas del huésped. Sin embargo, poco se sabe acerca de la adquisición del fierro por *Campylobacter spp.* o el papel del fierro acerca de la patogenicidad de éste organismo. Aunque el fierro parece ser un factor importante en el crecimiento y en el establecimiento de la infección por *C. jejuni*, el mecanismo exacto involucrado en éste proceso aún no es bien conocido.

Campylobacter spp. no parece producir niveles detectables de sideróforos, aunque la presencia de fierro exógeno debe ser importante en la expresión de la virulencia. Cuando se pasa *C. jejuni* en animales con fierro en el inóculo resulta un incremento de la letalidad de esta cepa para el ratón. Esta susceptibilidad incrementada puede deberse a la saturación de la transferrina del huésped, una proteína secuestrante de fierro provee el exceso de fierro que puede soportar el crecimiento y por esta razón, incrementar la virulencia. Un incremento marcado en el crecimiento de ciertas cepas de *C. jejuni* ha sido reportado cuando se adiciona sulfato ferroso en el agar de Muller Hinton.

El pretratamiento de los ratones con hierro dextran reduce el LD_{50} de *C. jejuni* de 10^{11} a 10^5 UFC. Esto refleja una disminución del fierro en el ratón debido a la formación de complejos de sideróforo y fierro que la bacteria no puede metabolizar. Baig y col. mostraron que las cepas de *C. jejuni* probablemente tienen receptores de membrana para los sideróforos, como la enterobactina y ferricromo producidos por la *Salmonella spp.* Por esta razón, *C. jejuni* debe recoger los sideróforos producidos por otros

organismos en el intestino, y de ahí obtener su suplemento de fierro.

5.1.4. Evacuación de la Fagocitosis.

La respuesta fagocítica de los macrófagos a *C. jejuni* ha sido recientemente reportada por Kiehlbauch y col. y Hyde y col. y debe explicar otros factores en la patogenicidad del organismo. La sobrevivencia dentro de los macrófagos es un determinante importante de la virulencia de *Salmonella typhimurium*. Kiehlbauch y col. reportaron que *C. jejuni* sobrevive largos períodos en monocitos de sangre periférica, comparados con el grupo control crecidos en ausencia de fagocitos. La fagocitosis y la sobrevivencia intracelular por 6-7 días podría contribuir a la sobrevivencia de *C. jejuni*. Además, ellos encontraron que microorganismos aislados en humanos, causaron gran respuesta fagocitaria, en comparación con los *C. jejuni* aislados de animales. Esto puede deberse a cambios en las proteínas de membrana del organismo o de otras transformaciones fisiológicas que ocurren durante la infección por *C. jejuni*.

5.1.5. Endotoxinas.

El lipopolisacárido (LPS) de la pared celular de las bacterias gram negativas es un factor endotóxico importante que contribuye a la virulencia de éste organismo.⁸⁴ Este es el antígeno "O" o somático.⁸⁵ Además, los componentes de bajo peso molecular de la pared celular de *C. jejuni* contribuye al serotipo específico del esquema serotípico de antígenos estables al calor de Peneer. El material LPS de *C. jejuni* ha

(84) DOYLE, M. P. Ob. Cit. 3:95,96

(85) PUMAROLA. Microbiología y Parasitología médica. Ed. Salvat. España. 1984. 41:444

sido caracterizado que contiene glucosa, galactosa, L-glicero-D-manosa-heptosa, glucosamina, galactosamina, ácido graso 3-hidroxi-tetradecanoico, y ácido 2-ceto-3-deoxioctónico. Los LPS de ciertas cepas de *C. jejuni* contienen los mismos determinantes antigénicos del lípido A como la LPS de la región core de otras bacterias gram negativas. La porción del lípido A es la parte tóxica de la endotoxina de las bacterias gram-negativas.

La patogenicidad de *C. jejuni* puede, al menos en parte, depender de la estructura de la superficie celular, es decir, el LPS y los componentes proteicos de la membrana externa (OMP). Estos componentes celulares sirven como una interface entre el patógeno y el huésped y puede ayudar al patógeno a vencer el mecanismo de defensa del huésped. Los LPS y OMP expresados por el patógeno están íntimamente relacionados con la adherencia/invasión de las células del huésped. Como factores de patogenicidad en *C. jejuni* no han sido identificados, aunque la presencia de una microcápsula en la superficie celular de *C. fetus* ha sido identificada inmunológicamente y ultraestructuralmente. Esta microcápsula ha demostrado ser antifagocítica y podría jugar un papel en la patogénesis de la infección por *C. fetus*.⁸⁶

También existe un antígeno "H" o flagelar.⁸⁷

5.2. PROTEINAS DE SUPERFICIE.

Las proteínas de la membrana y los componentes polipeptídicos (OMP) de *C. jejuni* han sido caracterizados por muchos investigadores. Una banda de OMP con un peso molecular de 62,000-66,000 y flagelar se encontró presente en *C. jejuni* analizados. Las proteínas flagelares son el principal componente antigénico del esquema serotípico de Lior, y es un inmunógeno

(86) DOYLE, M. P. Ob. Cit. 3:96,97

(87) PUMAROLA. Ob. Cit. 41:444

dominante reconocido durante las infecciones de *C. jejuni* en humanos.

La estructura de superficie de *C. jejuni* difiere marcadamente de *C. fetus*. Reportes recientes indican el número y el peso molecular de muchos de las OMP de *C. jejuni* y *C. coli*. El perfil de SDS-PAGE de OMP de *C. jejuni* está dominado por una banda proteica simple con un peso molecular entre 43,000 y 45,000 dependiendo de la cepa examinada. Logan y Trust sugirieron que el OMP es una molécula porosa por su asociación con la transmembrana y el peptidoglucano inferior. Esta banda polipeptídica simple diferencia entre *C. jejuni* y *C. coli* de *E. coli* y *S. typhimurium*. *C. jejuni* puede ser diferenciado de *C. fetus* subsp. *fetus*, que tiene dos o mas bandas de OMP. Ninguna de los OMP reportados es responsable de la especificidad serotípica, mientras que en una cepa un OMP con un peso molecular de 95,000 mostró contribuir a su identidad seroespecífica. El papel de la banda de 45,000 MW OMP en la patogénesis de *C. jejuni* comienza a ser entendido, pero Walker y col. propusieron que esta proteína podría ser importante en el crecimiento y metabolismo del microorganismo.

Otra estructura de superficie de *C. jejuni* que podría tener un papel importante en la patogénesis del organismo es el flagelo. El suero de humanos convalcientes mostró contener anticuerpos a las proteínas flagelares. El flagelo tiene subunidades proteicas de 57,000 a 66,000 MW, dependiendo de la cepa estudiada. Porque los anticuerpos pueden ser dirigidos contra aptopos flagelares de la superficie, el flagelo debe ser considerado en nuestro entendimiento como parte de la patogénesis de *Campylobacter*.

Los investigadores han comparado la virulencia de tipos silvestres, *C. jejuni* móvil, con mutantes flagelares no móviles, para estudiar el fenómeno de la variación. Newell y col.

alimentaron mezclas de una cepa flagelar y una aflagelada de *C. jejuni* (#8116) y encontraron que solamente las células flageladas podían ser recuperadas de las heces de los animales. Cuando Cadwell y col. inyectaron conejos por el procedimiento RITARD con mutantes no flagelados de la cepa 8116 y A3249, ellos pudieron aislar solamente las cepas móviles de *C. jejuni* 96 Hrs después de la infección, sugiriendo que la carencia de movilidad es una característica inestable.⁸⁸

La membrana externa de *C. pylori* contiene LPS y proteínas. Newell identificó 3 proteínas en la membrana externa de 61, 54 y 31 KDa que se encontraba presente en varios *C. pylori* aislados, Se sin embargo también se encontró una de 14 KDa posteriormente. Se encontraron de manera variable proteínas de bajo peso molecular en la membrana externa.

La observación de que todos los pacientes con cultivos positivos tenían IgG en suero para las proteínas de 61 y 54 KDa y que la mitad de ellos tenían anticuerpos para la proteína de 31 KDa sugiere que:

1. Las 3 proteínas más importantes de *C. pylori* se encuentran presentes en la mayoría de las cepas gastrointestinales aisladas, y
2. Estas proteínas se expresan "in vivo".

Las proteínas del exterior de la membrana de *C. pylori* es un mejor determinante antigénico en niños. De ahí, que la detección de IgG en suero contra las proteínas del exterior de la membrana de *C. pylori* sea útil en el diagnóstico de esta infección en niños.⁸⁹

(88) DOYLE, M. P., Ob. Cit. 3:27, 28
 (89) CZINN, S., CARR, H., SHEFFLER, L., ARONOFF, S. Serum IgG Antibody to the outer membrane proteins of *Campylobacter pylori* in Children with Gastrointestinal Disease. Jour. Inf. Dis. 1989, 159 (3):588

tipo monomérico, mientras los pacientes infectados tenían IgA anti-*Campylobacter* de individuos sanos fue principalmente de *Campylobacter* se incrementan significativamente con la edad. La aguda, se encontró que los anticuerpos de IgA para las especies de *jejuni*. En 400 individuos sanos y 60 pacientes con enteritis inmunoen ensayo usando una fase sólida, para detectar IgA contra *C. Mascart-Lemone* y col. realizaron un estudio utilizando un *Campylobacter*.

de la IgA y la inmunidad humoral contra las infecciones en pacientes con deficiencia de IgA, sugieren un papel importante conforme se incrementa la edad. La excreción crónica del organismo observado que las infecciones por *Campylobacter* disminuyen a *C. jejuni* podría resultar en la adquisición de inmunidad. Se ha primera vez. Estos resultados sugieren que exposiciones repetidas *jejuni* comparada con individuos que bebieron leche cruda por tomaron leche cruda o que había sido previamente expuesta a *C. inmunoglobulina G (IgG) anti-Campylobacter* en individuos que Además los investigadores han observado niveles elevados de niños sanos de Bangladesh comparados con los de Estados Unidos. Blaser y col. encontraron niveles elevados de anticuerpos en

5.4. RESPUESTA INMUNE A LA INFECCION.

de *C. jejuni* y *E. coli*. plásmidos de *C. jejuni* no pueden ser cambiados entre los plásmidos tetraciclina encontrados en la familia *Enterobacteriaceae*. Los plásmidos de *C. jejuni* y los plásmidos de la resistencia a la *Campylobacter spp.*, pero no se encontró homología entre los grado de homología DNA-DNA fue observado en los plásmidos de como 1.6 megadaltos y un rango arriba de 100 kilobases. Un alto que codifica para la resistencia a la tetraciclina es tan pequeño

polimérica, que es el tipo normalmente sintetizado en la lámina propia del intestino. Se encontró que la respuesta inmune en pacientes fue de corta duración.

En voluntarios humanos estudiados por Black y col., ninguno de los pacientes infectados con *C. jejuni* desarrolló la infección, indicando una protección debida a inmunidad. Una protección similar ha sido reportada por Cadwell y col. y Ruiz-palacios y col. Pacientes con diarrea tuvieron título elevados de anticuerpos (IGA, IGM e IGG) en el suero durante la segunda semana de infección,⁹⁰ (con capacidad opsonizante, inmovilizante y aglutinante)⁹¹ comparados con pacientes control en los cuales los título permanecieron constantes. Los niveles de IGA llegaron a ser normales más rápidamente comparados con los título de IGG e IGM, los cuales llegaron a ser normales 90 días después de la infección. Un patrón similar fue observado en pacientes expuestos a *C. jejuni* pero no infectados, mientras los título de sus anticuerpos fueron bajos. Kaldor y col. reportaron resultados similares en pacientes con infección aguda, pero ellos notaron una pobre respuesta de anticuerpos en pacientes con diarrea prolongada o recurrente.⁹²

Debido a la dificultad de recobrar *C. pylori* de material de biopsia, se ha puesto atención especial en técnicas de diagnóstico inmunológico.⁹³ Se han desarrollado estudios semejantes a los anteriores para *C. pylori*, usando una gran variedad de antígenos. Sin embargo, los resultados de estos estudios no son muy satisfactorios, los mejores son:

A) Los pacientes con gastritis o úlcera peptica infectada o con síntomas dispeptidicos tienen elevado título de anticuerpos

(90) DOYLE, M. P. Ob. Cit. 3:98,99
(91) PUMAROLA. Ob. Cit. 41:444
(92) DOYLE, M. P. Ob. Cit. 3:99
(93) CZINN, S. Ob. Cit. 586

contra *C. pylori* en suero comparados con los controles.

B) Niveles específicos de IgA e IgG parecen correlacionar mejor con la infección.⁹⁴ Según Vaira-Holton la determinación de IgG en suero es más útil para evaluar la respuesta al tratamiento y una posible reincidencia después de la terapia, por ser más fácil y económica; que la prueba de caldo C-urea, que no se puede aplicar en niños. Pero Doyle considera que los niveles de IgG anti-*C. pylori* disminuyen lentamente hasta la erradicación y se incrementan con la infección.⁹⁵

C) Anticuerpos específicos son encontrados en la secreción.⁹⁶ Joan y col. reportaron título de IgM tanto en suero como en jugo gástrico.⁹⁷

D) La severidad de la gastritis y los niveles de anticuerpos no se encuentran correlacionados.

E) En pacientes con gastritis y en pacientes control, el porcentaje de personas con anticuerpos presentes se incrementa con la edad.

F) Una vez presentes, los anticuerpos específicos persisten por años.⁹⁸

- (94) BLASER, M. J. Gastric Campylobacter. . . Ob. Cit. 376
- (95) VAIRA, D., HOLTON, J. Serum Immunoglobulin G Antibody Level for Campylobacter pylori Diagnosis. Gastroenterology. 1989. 97(4): 1069-70.
- (96) BLASER, M. J. Gastric Campylobacter. . . Ob. Cit. 376
- (97) JOAN, E. O. Ob. Cit. 416
- (98) BLASER, M. J. Gastric Campylobacter. . . Ob. Cit. 376

C. jejuni es un organismo frágil que es inactivado por la mayoría de los métodos comúnmente utilizados para eliminar enteropatógenos de los alimentos. Aún, como lo indica la literatura, el organismo es el agente causal de un gran número de casos de gastroenteritis. Esta discrepancia puede ser explicada por la inevitable contaminación cruzada de los productos crudos con utensilios o los alimentos preparados. Aun cuando se utiliza los más escrupulosos métodos para inactivarlo, la transmisión eventual de la transmisión de la infección resultará si entran productos crudos al área de preparación.

El único mecanismo para proteger la salud con los procesos de preparación de los alimentos es a través de la educación del consumidor y reforzando las prácticas higiénicas. Se debe tener cuidado con los alimentos crudos y los utensilios para procesarlos, de algún alimento o material que este directamente, o indirectamente, en contacto con el consumidor. Este es un proceso largo para disminuir o prevenir casos de gastroenteritis; sin embargo, estos métodos no han sido muy adecuados para prevenir la *Campylobacteriosis* humana.

Una alternativa, que no ha sido muy considerada, es intervenir la relación comensal entre *C. jejuni* y el nicho intestinal ocupado en los animales de vida libre. Previendo la colonización del organismo del alimento animal, la contaminación de los productos cárnicos será reducida grandemente, y el peligro de contaminación de los alimentos procesados disminuye. Como la colonización requiere intervenir la relación entre el animal y el organismo. Esta intervención no parece ser fácil, pero es un objetivo que vale la pena.⁹⁹

(99) DOYLE, M. P. Op. Cit. 3:101

7.1 Especies de *Campylobacter* entericos.

En un estudio hecho por Bernard y col. en pacientes con agammaglobulinemia y algunos con SIDA se encontró la siguiente distribución de *Campylobacter*: 4 pacientes con *C. jejuni*, 4 pacientes con *C. coli* y 1 paciente con *C. fetus*. Se trató con eritromicina, para 2 pacientes los síntomas desaparecieron, para otros 3 se realizó *Campylobacter* y se asoció con síntomas digestivos persistentes. Dos de los pacientes con cultivos positivos en sangre, se trataron con una combinación de ampicilina y aminoglicósido eficazmente. Se observó que la actividad antibacteriana de la Zidovudina (medicamento empleado para pacientes con SIDA), no se relaciona con *Campylobacter spp* porque ninguno de los pacientes la recibió antes del diagnóstico.¹⁰⁰

En un estudio realizado por Yagupsky, se recomienda la combinación de cotrimoxazole y eritromicina para el tratamiento de disentería en niños menores de un año.¹⁰¹ De la misma manera Brum recomienda un tratamiento con subsalicilato de bismuto y ampicilina.¹⁰²

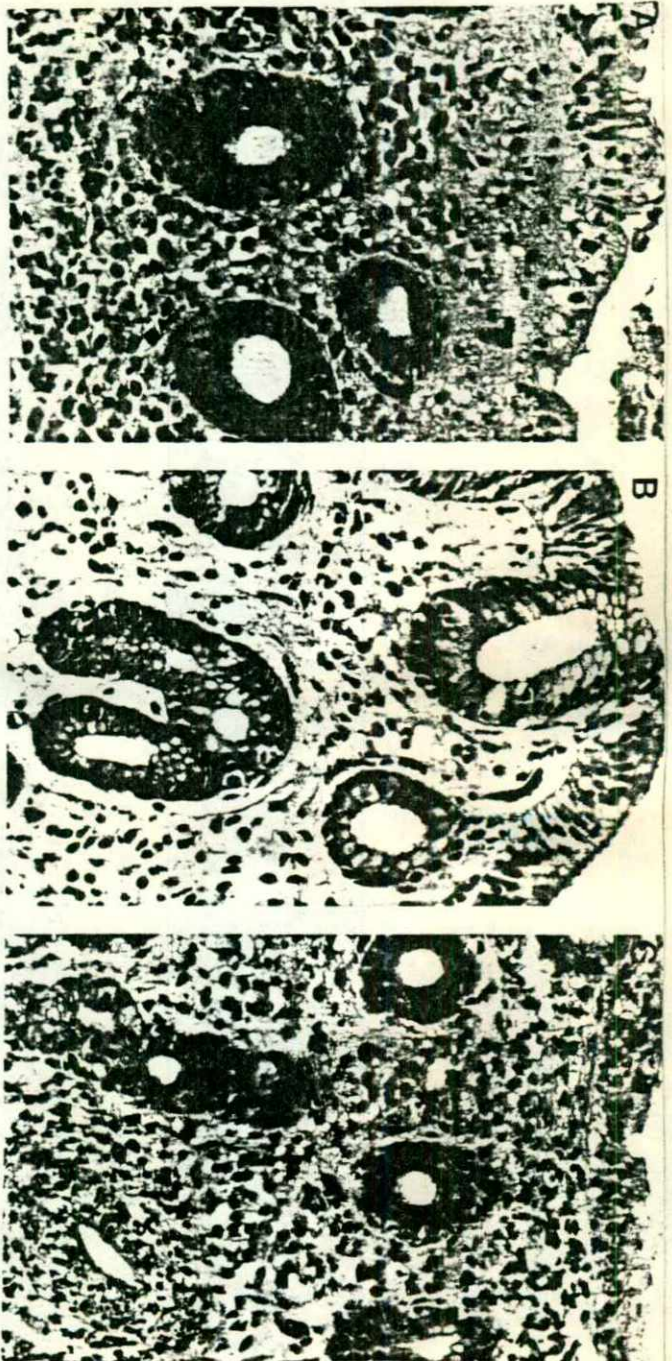
7.2 *Campylobacter pylori*.

Desde que *H. pylori* fue descubierto, se han invertido muchas

(100) BERNARD, E.; ROGER, P. M.; VERNALDI, V. C.; Diarrhea and Campylobacter infection in patients infected with the Human Immunodeficiency virus. (Letter). Jour. Inf. Dis. 1989, 150(1): 143

(101) YAGUPSKY, P.; Erythromycin for Campylobacter jejuni-associated dysentery. (Letter). Jour. of Pediatrics. 1987, 111(4):101

(102) BRUM, S.; Treatment of Campylobacter pylori-associated antral gastritis in children with bismuth subsalicylate and ampicillin. Jour. of Pediatrics. 1988, 133(5):908-12



Biopsia de mucosa antral de un paciente con gastritis e infección por *H. pylori* que había sido tratado con Nitrofurantoina. A: Biopsia inmediatamente antes de la terapia. B: El mismo paciente el día 15, un día después de que la terapia terminó. *H. pylori* no se aisló del cultivo. C: El mismo paciente 56.6 semanas después de que la terapia terminó. La infección de *H. pylori* reinició. Todas las biopsias se tiñeron con hematoxilina y eosina. (X400).

BLASER

FIG. 5

semejante al metronidazol, que se obtiene en los Estados Unidos. El rango de erradicación durante un año, en 27 pacientes con *H. pylori*, tratados de esta manera fue del 70%. Resultados menos impresionantes fueron notados con bismuto-nitrofurantoina y bismuto-amoxicilina; que mostraron una erradicación del 17% después de 2 semanas, y 42% después de 4 semanas de terapia, respectivamente.

Börsch y col. encontraron un 90% de erradicación después de un tratamiento de bismuto, amoxicilina y metronidazol en 10 pacientes. De la misma manera, Borody y col. reportaron una erradicación del 94% después de la administración de bismuto, tetraciclina, y metronidazol en 100 pacientes. Sin embargo, al tratar de confirmar esos datos, McNulty y col. encontraron solamente un 65% de erradicación de *H. pylori* en 30 pacientes.¹⁰⁸

Se ha visto que *C. pylori*, también es susceptible a la eritromicina, tetraciclina,^{109, 110} penicilina, ampicilina, cefaloxina, siprofloxacina, gentamicina, cefalotina, clindamicina, y kanamicina, la furazolidona, nitrofuranos y nitrofurantoina que son derivados del furano, que tiene un espectro de actividad antibacteriano que incluye las especies *Campylobacter* y especialmente *C. pylori*;^{111, 112} pero resistente al ácido nalidixico, fluorquinolonas que están relacionadas con el ác.

(108) JOANNÉ, O. Ob. Cit. 420

(109) STUART, B. L.; Tetraciclina resistance determinants are

Widespread. ASM news. 1989. 54(8):419

(110) WILSON, G.; Tetracyclines, Choramphenicol, Erythromycin and

Clindamycin. Mayo Clin Proc. 1987. 62:907

(111) BLASER, M. J.; Helicobacter pylori. Ob. Cit. 628

(112) BLASER, M. J.; Gastric Campylobacter Ob. Cit. 378

- (113) WALKEL, W.: The quinolones. Mayo Clin Proc. 1989. 62:1008
 (114) BLASER, M. J.: Gastric. Campylobacter. . . Ob. Cit. 378
 (115) BLASER, M. J.: Helicobacter pylori. Ob. Cit. 627
-

nalidixico; sulfonamida y trimetoprim; algunas cepas son
 susceptibles al metronidazol.¹¹⁴ Algunos de los antibióticos
 anteriormente mencionados, son inefectivos in vivo, por ejemplo la
 eritromicina.¹¹⁵

A P E N D I C E S

CALDO O AGAR CON NITRATO:

Fórmula:

Extracto de sangre.	3 gr
Peptona.	5 gr
Nitrato de potasio.	1 gr
Agar (para el medio de agar con nitrato solamente).	12 gr
Agua destilada.	1000 ml

Pesar las cantidades indicadas. Rehidratar con agua destilada o desmineralizada. Calentar suavemente hasta disolución. Distribuir en tubos aproximadamente: Agar con nitrato 5 ml; Caldo con nitrato 1 ml por tubo.

Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 libras por 15 minutos. Dejar que solidifique el medio de agar con nitrato en poco de flauta. Dejar enfriar antes de su empleo y refrigerar.¹¹⁷

AGAR BRUCELA:

Fórmula: (gramos por litro de agua destilada)

Tripticasa.	10.0 gr
Tiotone.	10.0 gr
Dextrosa.	1.0 gr
Extracto de levadura.	2.0 gr
Cloruro de sodio.	5.0 gr
Bisulfito de sodio.	0.1 gr
Agar.	15.0 gr

pH final : 7.0

(117) MAC FADDIN. Ob. Cit. 21:143

Suspender 43 gr del material seco en un litro de agua destilada. Mezclar. Calentar con agitación frecuente y hierva por un minuto. Esterilizar por autoclaveado a 121°C por 15 minutos.¹¹⁸

CALDO NUTRITIVO:

Fórmula:

Peptona o proteosa peptona.	5 gr
Extracto de carne.	3 gr
Agua destilada.	1000 ml

Pesar las cantidades indicadas. Rehidratar con agua destilada o desmineralizada. Calentar suavemente hasta su disolución. Distribuir en tubos aproximadamente de 4 a 5 ml por tubo. Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 libras, 15 min.¹¹⁹

CALDO TIOGLICOLATO:

Fórmula: (gramos por litro de agua destilada)

Tripticasa peptona.	17.00 gr
Fitona peptona.	3.00 gr
Dextrosa.	6.00 gr
Cloruro de sodio.	2.50 gr
Tioglicolato de sodio.	0.50 gr
L-cystina.	0.25 gr
Sulfito de sodio.	0.10 gr
pH final	7.0

(118) BBL. Ob. Cit. 96

(119) MAC. FADDIN. Ob. Cit. 13:98

Suspender 30 gr del material deshidratado en un litro de agua destilada. Mezclar hasta que la suspensión sea uniforme Caliente con agitación frecuente y hierva por 1 min. Coloque de 15 a 18 ml por tubo. Esterilizar en autoclave de 118° a 121°C (no más de 15 lb de presión). por 15 min. Debe ser guardado en la oscuridad a temperatura ambiente.¹²⁰

MEDIO CAMPY-BAP:

Fórmula:

Agar Base Brucela.	1000 ml
Sangre Ovina.	100 ml
Vancomicina.	10 mg
Trimetoprim.	5 mg
Polimixina B.	2500 UI
Anfotericina B	2 mg
Cefalotina.	15 mg

Esterilizar a 121°C el Agar Base Brucela y enfriar a 50°C. Añadir la sangre y los otros componentes al agar fundido estéril. Distribuir en cajas Petri.^{121, 122}

(120) BBL. Ob. Cit. 146

(121) DEELAT, A. N. ; Microbiología. Tercera Edición. México D. F. 1987.

(122) JOKLIK, K. W. ; Microbiología de Zinsser. Editorial Médica Panamericana. Primera reimpresión. 1987.

CALDO UREA:

Fórmula:

Fosfato monopotásico.	9.1 gr
Fosfato de sodio.	9.5 gr
Extracto de levadura	0.1 gr
Urea (máxima pureza 20%).	20.0 gr
Rojo de fenol.	0.01 gr
Agua destilada.	1000.0 ml
pH final: 6.8	

Pesar las cantidades exactas. Rehidratar con agua destilada o desmineralizada. No calentar para disolver. La urea se descompone con el calentamiento.

Se recomienda esterilizar por filtración: Método del filtro de membrana Millipore. Membranas de 0.45 μ de poro.

Si el medio es preparado e inoculado inmediatamente, no es necesaria la filtración.¹²⁹

CARY-BLAIR:

Fórmula: (gramos por 991 ml de agua destilada)

Tioglicolato de sodio.	1.5 gr
Fosfato disodio.	1.1 gr
Cloruro de sodio.	5.0 gr
Agar.	5.0 gr
pH final: 8.4	

Suspender 12.6 gr del material seco en 991 ml de agua destilada. Calentar con agitación hasta que la disolución ocurra.

(129) MAC. FADDIN. Ob. Cit. 29:184

Enfriar a 50°C y adicione 9 ml de cloruro al 1% en solución acuosa. Ajustar el pH a 8.4 si es necesario. Pongase al vapor por 15 min. Enfrie a temperatura ambiente. ¹²⁴

(124) BBL. Ob. Cit. 98

APENDICE II

T I N C I O N E S

TINCIÓN SIMPLE:

Se pone el colorante que se va a utilizar durante 30 a 60 segundos, se enjuaga y se seca. Para ésta tinción puede utilizarse safranina, cristal violeta, yodo, etc.

METODO DE GIEMSA:

- A) Preparar una extensión homogénea sobre un portaobjetos limpio. Dejar secar al aire.
- B) Bañar en alcohol metílico durante 1 minuto.
- C) Escurrir el alcohol y deja secar.
- D) Cubrir la película con colorante de Giemsa (aproximadamente 15 gotas y dejar 1 minuto.
- E) Agregar agua destilada (aproximadamente 30 gotas) y continuar la coloración 5 minutos. Escurrir.
- F) Lavar con agua destilada.
- G) Secar al aire.
- H) Examinar con aceite de inmersión.
- I) El género *Campylobacter* se tiñe de color púrpura azulado. ¹²⁵

(125) BAILEY, SCOTT. Diagnóstico Microbiológico. Editorial panamericana. Argentina. 1973. 37:482.

APENDICE II

T I N C I O N E S

TINCIÓN SIMPLE:

Se pone el colorante que se va a utilizar durante 30 a 60 segundos, se enjuaga y se seca. Para ésta tinción puede utilizarse safranina, cristal violeta, yodo, etc.

METODO DE GIEMSA:

- A) Preparar una extensión homogénea sobre un portaobjetos limpio. Dejar secar al aire.
- B) Bañar en alcohol metílico durante 1 minuto.
- C) Escurrir el alcohol y dejar secar.
- D) Cubrir la película con colorante de Giemsa (aproximadamente 15 gotas y dejar 1 minuto.
- E) Agregar agua destilada (aproximadamente 30 gotas) y continuar la coloración 5 minutos. Escurrir.
- F) Lavar con agua destilada.
- G) Secar al aire.
- H) Examinar con aceite de inmersión.
- I) El género *Campylobacter* se tiñe de color púrpura azulado.¹²⁵

(125) BAILEY, SCOTT. Diagnóstico Microbiológico. Editorial panamericana. Argentina. 1973. 37:482.

TINCIÓN MODIFICADA DE GRAM

SOLUCIÓN A:

Cristal Violeta (Certificado) 2 gr.
Alcohol etílico 95% 20 ml.

SOLUCIÓN B:

Oxalato de amonio 0.8 gr
Agua destilada 80.0 ml

Mezclar las soluciones A y B. Guardar por 24 horas antes de usar; luego filtrar.

YODO DE GRAM:

Yodo 1 gr.
Yoduro de potasio 2 gr.
Agua destilada 300 ml.

Moler el yodo seco y el yoduro de potasio en mortero. Añadir agua poco a poco y moliendo en cada adición hasta obtener una solución. Enjuagar la solución en un frasco de vidrio ambar con el resto de agua destilada.

DECOLORANTES:

Alcohol etílico al 95%: Agente lento.

Acetona: Agente muy rápido.

Alcohol-cetona (proporción 1:1): Acción intermedia.

CONTRACOLORANTE:

Se debe utilizar como contracolor carbolfucsina al 0.3% porque las especies de *Campylobacter* se tiñen deficientemente con safraninas. La solución de carbolfucsina se prepara del siguiente modo:

SOLUCION A:		SOLUCION B:	
Fucsina básica	0.3 gr.	Fenol (cristal fundido)	5 ml.
Etanol	10.0 ml.	Agua destilada	95 ml.

Finalmente se mezclan las soluciones A y B.

METODO

1. Cubrir el frotis con cristal violeta y dejar 1 minuto.
2. Lavar con agua corriente y quitar el exceso de agua.
3. Cubrir con solución de yodo y dejar 1 minuto.
4. Lavar con agua.
5. Decolorar hasta que no aparezca color en el portaobjetos.
6. Lavar brevemente con agua corriente.
7. Aplicar el contracolorante, por 10 segundos.
8. Lavar con agua y dejar secar.
9. *Campylobacter* spp. se tiñen Gram negativo.¹²⁶

(126) LENNETTE, E. N. Ob. Cit. 27:387

TINCIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA:

METODO

1. Los cortes se disponen en un soporte especial de vidrio sin fondo, con una preparación en cada ranura. Se sumergen en el primer baño de xileno durante 3 minutos.
2. Se pasan al segundo baño de xileno por 2 o 3 minutos. Siempre debe dejar escurrir el exceso de solución inclinando el soporte y dejándolo en contacto con el borde del recipiente.
3. Se llevan al primer baño de alcohol etílico absoluto durante 2 minutos. De pasarse a un segundo baño, la maniobra puede ser muy rápida; también se pueden suprimir cuando se traten los cortes con agua.
4. Se sumergen en un baño de alcohol etílico del 95% durante 1 a 2 minutos. (Si se emplea un fijador mercurico, el mercurio debe eliminarse en esta etapa por inmersión durante 5 a 10 min. en una solución al 0.5% de yodo en alcohol de 80 a 95%. Luego, el corte debe enjuagarse en agua y se elimina el yodo dejando las preparaciones durante 1 a 5 min. en una solución al 3% de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$); finalmente se lavan cuidadosamente en agua corriente durante 3 a 5 min. Si se prefiere, los precipitados de mercurio se pueden quitar después de hidratar los cortes por sumerción en yodo de Gram o de Lugol durante 5 min. seguida de la aplicación de tiosulfato sódico y de lavado. En este momento los cortes de tejido fijados con agentes mercuriales ya están listos para la tinción.
5. Se lava con agua corriente durante 1 min. aproximadamente, y luego brevemente con agua destilada.

6. Se tiñe durante 4 a 8 min. con hematoxilina de alumbre (por ejemplo la de Harris).
7. Se aclara (después de un paso rápido por agua) sumergiendo 3 o 4 veces la preparación (de 3 a 10 segundos cada vez) en alcohol ácido al 1% (1 ml de HCl conc. con 99 ml de alcohol etílico al 80%).
8. Se enjuaga con agua.
9. Se azulea poniendo la preparación en el substituto de Scott para agua corriente, o en carbonato de litio al 1% en agua, o alcohol amoniaco al 1% (1 ml de amoniaco concentrado para 99 ml de alcohol al 80%), hasta que los cortes tienen aspecto azulado (alrededor de 30 seg. para el litio y el amoniaco; 1 min. para la solución de Scott).
10. Se enjuaga con agua.
11. Se tiñe con eosina Y acidificada al 1% en agua durante 15 segundos a 2 min. según la intensidad deseada; o se enjuaga rápidamente con alcohol al 80% y se tiñe de 30 seg. a 3 min. con eosina Y acidificada al 0.5% o 1% en alcohol etílico al 80%.
12. Si se emplea eosina acuosa, se enjuaga brevemente con agua. Si se trabaja con eosina alcohólica, en lavado en agua corriente durante 30 seg. a dos minutos permite diferenciar la tinción eosínica.
13. Se deshidrata por paso sucesivo en 3 o 4 baños de alcohol etílico absoluto, con agitación; bastan de 10 a 20 seg. cada vez..
14. Se pasa por 2 a 3 baños de xileno, de 15 a 20 segundos cada uno.
15. Se monta en Permount, Clarita, Malinol o cualquier otro medio de montaje satisfactorio.

RESULTADOS:

Con hematoxilina de Harris; núcleos, de pardo negruzco a azul negro. Hueso y calcio, semejante al núcleo pero más pardo y menos intenso. Eritrocitos, músculo, gránulos eosinófilos, rojo brillante. Citoplasma, proteínas del líquido de edema, etc., rosa pálido.¹²⁷

(127) LYNCH, M. J. Métodos de Laboratorio. V2. Segunda Edición. Editorial Interamericana. México D. F. 1977. 38:482

RESULTADOS:

Con hematoxilina de Harris; núcleos, de pardo negruzco a azul negro. Hueso y calcio, semejante al núcleo pero más pardo y menos intenso. Eritrocitos, músculo, gránulos eosinófilos, rojo brillante. Citoplasma, proteínas del líquido de edema, etc., rosa pálido.¹²⁷

BIBLIOGRAFIA GENERAL

Another *Campylobacter* species May be a Human Patogen. Letter to the editor. ASM NEWS. 1989. 55(3):115-16.

BAILEY, S. Diagnóstico Microbiológico. Ed. Panamericana. Argentina. 1973. 37:482.

BASUALDO, S. M. C.; LOPEZ, A. M. R. Manual para Aislamiento e Identificación de Bacterias Anaerobias de Interes en Muestras Clínicas. Primer Curso de Actualización en Bacteriología Médica. 29 Oct. -9 Nov. 1990. 6.

BECKY, M. F.; FENNELL, C. L.; STAMM, W. E.; Characterization of *Campylobacter cinaedi* y *Campylobacter fennelliae*. Antigenes and Analysis of the Human Immune Response. Jour. Inf. Dis. 1989. 159(4):635-40.

BERNARD, E.; ROGER, P. M.; BONALDI, V. C.; CHARLES, D. Letter to the Editor: Diarrhea and *Campylobacter* Infections in Patients Infected with the Human Immunodeficiency Virus. Jour. Inf. Dis. 1989. 159(1): 143.

BLASER, M. J. Gastric *Campylobacter*-like Organism; Gastritis, and Peptic Ulcer Disease. Gastroenterology. 1987. 93(2):371-83

BLASER, M. J. *Helicobacter pylori* and the Pathogenesis of Gastroduodenal Inflammation. Jour. Inf. Dis. 1990. 161(4):626-33.

BRUMM, S. Treatment of *Campylobacter pylori*-associated antral gastritis in Children with bismuth subsalicylate and ampicillin. J. Pediatrics. 1988. 113(5):908-12.

Campylobacter pylori becomes *Helicobacter pylori*. Letter to the editor. Lancet. 1989. 2:1019-20.

CUNNINGHAM, F. E.; COX, N. A. The Microbiology of Poultry Meats Products. Academic Press Inc., USA. 1987. 3:34; 4:44-46, 65, 124, 125; 10:294-96.

CZINN, S. J.; *Campylobacter pylori*: A new Patogen. J. Pediatrics. 1989. 114(4). Part 1:670-71.

CZINN, S. J.; CARR, R.; SHEFFLER, L.; ARONOFF, S.; Serum IgG Antibody to the Outer Membrane Proteins of *Campylobacter pylori* in Children with Gastrointestinal Disease. *Jour. Inf. Dis.* 1989. 159(3):586-88.

DEELAT, A. N. *Microbiología*. Tercera Edición. 1987. México, D.F.

DOYLE, M. P.; *Foodborne Bacterial Pathogens*. Ed. Marcel Dekker, Inc. USA. 1989. 3:71-102.

GUSTAVSSON, M. D.; MALAGELADA; ROSENBLATT, M. D. Assessment of *Campylobacter*-like Organism in the Postoperative Stomach, Iatrogenic Gastritis, and Chronic Gastrointestinal Diseases: Preliminary Observations. *Mayo Clin Proc.* 1987. 62(4):265-68.

HUMPHRIES, D.; Why Duodenal Ulcers Recur. *Gastroenterology*. 1988. 94(6):1508-09.

HUTH, E. J. Style Notes: *Helicobacter pylori* for *Campylobacter pylori*. *Annals of Internal Medicine*. 1990. 112(4):245.

JOANN, E. O.; NICHOLAS, J.; TALLEY, M. B.; *Helicobacter pylori*: Controversies and an Approach to Management. *Mayo Clin Proc.* 1990. 65(3):414-26.

JOKLIK, K. W. *Microbiología de Zinsser*. Editorial Médica Panamericana. Primera reimpresión. 1987.

KOHLER, P. *BBL Manual of Products and Laboratory Procedures*. Division of Becton. Fifth Edition. USA. 1970. 94,96,98,146,154.

LENNETTE, E. N. *Manual de Microbiología Clínica*. Editorial Médica Panamericana. México. 1989. 27:383-84,389.

LYNCH, M. J. *Métodos de Laboratorio V2*. Editorial Interamericana. Segunda Edición. México, D.F. 1977. 38:1153.

MAC FADDIN, J. T. *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. Editorial Médica Panamericana. México. 1984. 5:39-43, 13:94-103, 21:142-147, 28:183-188.

MARSHALL, B. J.; BARRETT, L. J.; PRAKASH, C.; MAC CALLUM, R. W. Urea Protects *Helicobacter (Campylobacter) pylori* from the Bactericidal Effect of Acid. *Gastroenterology*. 1990. 99(3):697-702.

PUMAROLA. Microbiología y Parasitología Médica. Editorial Salvat. España. 1984. 41:444.

STUARD, B.L. Tetracycline Resistance Determinants are Widespread. ASM News. 1989. 54(8):419.

VAIRA, D.; HOLTON, J.; Serum Immunoglobulin G Antibody Level for *Campylobacter pylori* Diagnosis. Gastroenterology. 1989. 97(4):1069-70.

WALKEL, W. The Quinolones. Mayo Clin. Proc. 62:1007-12.

WILSON, C. Tetracyclines, Choramphenicol, Erythromycin, and Clindamycin. Mayo Clin. Proc. 1987. 62:906-15.

YAGUPSKY, P. Letter to the Editor: Erythromycin for *Campylobacter jejuni*-associated Dysentery. J. Pediatrics. 1987. 111(1):161.

ZUNIGA, O. B.; PALAZUELOS, T. C.; CRUZ, L. A.; ORNELAS, V. U. Aislamiento e Identificación de *Campylobacter pylori* en pacientes con enfermedad Acido-Péptica. Revista de Gastroenterología de México. 1988. 53(4):336.