



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

FRECUENCIA DE CAMPYLOBACTER JEJUNI Y YERSINIA ENTEROCOLITICA COMO AGENTES ETIOPATOGENICOS DE GASTROENTERITIS AGUDA EN PACIENTES PEDIATRICOS DEL H. R 20 DE NOVIEMBRE. ISSSTE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA PRESENTA: NICOLASA HERNANDO AGUILAR

DIRECTORES DE TESIS:
O.F.B. MARTHA SANCHEZ RODRIGUEZ
DR. JORGE HILL JUAREZ

UNAM
ZARAGOZA



LO HUMANO
ES
UNA GRAN DESAFIACION

MEXICO, D. F.

NOVIEMBRE DE 1993

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	pág.
I.- INTRODUCCION	1
II.- MARCO TEORICO	3
III.- OBJETIVOS	22
IV.- HIPOTESIS	23
V.- MATERIAL Y METODO	24
VI.- RESULTADOS	44
VII.- DISCUSION DE RESULTADOS	57
VIII.- CONCLUSIONES	60
IX.- ANEXO	61
X.- BIBLIOGRAFIA	74

INTRODUCCION

La enfermedad diarreica constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad infantil en nuestro país y en el llamado, tercer mundo (1). Factores de tipo social, económicos y de educación higiénica incrementan su prevalencia en estos países, siendo la población infantil la mayormente afectada (1,25), además, la falta de atención médica oportuna y el uso indiscriminado de antibióticos que, en ocasiones no sólo no terminan con el proceso infeccioso sino que suelen agravarlo o prolongarlo hasta un estado de portador, ocasionan un grave problema de salud pública (25).

Se estima que la tasa de mortalidad por diarrea varía entre 10 y 280 por 100 mil habitantes en los países latinoamericanos. En 1988 un estudio realizado por la OMS en países subdesarrollados, señaló que niños menores de cinco años de edad padecieron 1300 millones de episodios diarreicos en ese mismo año dando como consecuencia la muerte de 4 millones de niños (20, 56).

Con el progreso de las condiciones de vida en México las tasas de mortalidad han disminuido, sin embargo, la diarrea es la segunda causa de mortalidad en los niños menores de un año, la primera entre 1 y 4 años y la segunda entre los 5 y 14 años (20).

En la República Mexicana la mayor proporción de los casos de diarrea se debe a agentes bacterianos, virales, parasitarios y en menor frecuencia a micóticos. Con el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico, actualmente pueden lograrse identificarse el agente etiológico en más del 60 % de los casos de diarrea que

permiten establecer la importancia relativa de agentes microbianos como: Rotavirus, E. histolytica, G. lamblia, Salmonella, Shigella, E. coli toxigénica, E. coli invasora, Aeromonas, Plesiomonas, C. difficile, C. jejuni y Yersinia enterocolitica (53).

En la actualidad las infecciones por Campylobacter jejuni y Yersinia enterocolitica han cobrado gran importancia como productores de infección gastrointestinal, así como de una variedad de enfermedades sistémicas (20, 51, 54, 80, 83). Su frecuencia en México no es bien conocida, debido a las dificultades técnicas que implica el crecimiento en medios sumamente selectivos, sin embargo, algunos reportes de estudios realizados en otros países mencionan que Campylobacter ha llegado a ocupar el segundo y tercer lugar como agente causal de gastroenteritis en niños menores de 2 años de edad (29, 51, 54, 83). Mientras que Y. enterocolitica sólo ha sido aislada hasta en un 3.1 % siendo el serogrupo O:3 el más comunmente asociado a la gastroenteritis (53).

Esta situación motivó a determinar la frecuencia con que se aislan estos microorganismos en pacientes con síndrome diarreico en el Servicio de Urgencias Pediatría del H.R. 20 de Noviembre. ISSSTE.

MARCO TEORICO

La diarrea es una entidad nosológica que puede ser causada por multiples factores etiológicos incluyendose bajo la denominación de Síndrome diarréico.

El Síndrome diarréico es una manifestación clínica de una patología extensa y variada cuyo origen en México se encuentra asociado en la mayor parte de los casos con agentes bacterianos, virales, parasitarios y micóticos, ya sea de manera aislada, o bien mediante una mezcla de los mismos. Cuadro 1 (25).

La edad pediátrica ha sido la más afectada, detectándose tanto en la consulta privada como en la institucional. Su control se ha basado fundamentalmente en la mejoría de las condiciones ambientales y en el tratamiento oportuno y adecuado durante el proceso agudo de la enfermedad (13). La diarrea es endémica con menor número de casos en los meses de enero a marzo, mostrando posteriormente un ascenso progresivo hasta alcanzar el máximo en los meses de mayo a agosto (78).

EPIDEMIOLOGIA

El panorama epidemiológico depende fundamentalmente de la ecología de la región y de las condiciones socioculturales de la población y menos importantemente de las características propias del individuo. Los mecanismos de transmisión dependen del agente, de las vías de transmisión y del huésped, considerándose la contaminación fecal como el principal mecanismo, ya sea

directamente de individuo a individuo, o bien, a través de vectores mecánicos o biológicos. Fig 1 (35, 78).

El avance en el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico hacen posible que se logre recuperar el microorganismo en más del 80 % de los casos (61). Diversos estudios reportan que E. coli enteropatógena suele encontrarse de 10 a 12 % (predominando en el 98 % de los casos la variedad toxigénica), Salmonella de un 7 a 9%, Shigella de un 6 a 8 %, Campylobacter de un 10 a 12 % Yersinia enterocolítica en un 3 %, los cuales suelen sumarse a padecimientos endémicos como la amibiasis u otras parasitosis (Giardiasis). Los rotavirus son los agentes etiológicos más frecuentemente aislados y tienen una variación del 17 al 26 % de aislamiento (25, 53, 61, 78).

CUADRO 1. AGENTES COMUNMENTE ASOCIADOS A DIARREA

AGENTES BACTERIANOS	AGENTES PARASITARIOS	VIRUS	AGENTES MICOTICOS
<u>Campylobacter jejuni</u>	<u>Entamoeba histolytica</u>	Rotavirus	<u>Candida albicans</u>
<u>Campylobacter coli</u>		Pararotavirus	
<u>Salmonella spp.</u> - no typhi	<u>Giardia lamblia</u>	Coronavirus	
<u>Escherichia coli</u> (grupos específicos)	Helminos :	Adenovirus tipo 3, 4, 7	
<u>Yersinia enterocolitica</u>	<u>Strongyloides stercoralis</u>	Coxsackievirus	
<u>Vibrio cholerae</u>	<u>Trichinella spiralis larvae</u>	Parvovirus	
<u>Vibrio parahaemolyticus</u>	<u>Trichuris trichuria</u>	Agentes de Norwalk	
		Agentes Hawaii	
<u>Aeromonas hydrophila</u>	<u>Cryptosporidium muris</u>		
<u>Plesiomonas shigelloides</u>			
<u>Clostridium perfringes</u> tipo A			
<u>Staphylococcus aureus</u>			
<u>Bacillus cereus</u>			
<u>Pseudomonas spp</u>			

Tomado de Gómez B.D., Gastroenteritis en Infectología Clínica Pediátrica. Año 1987 (25)

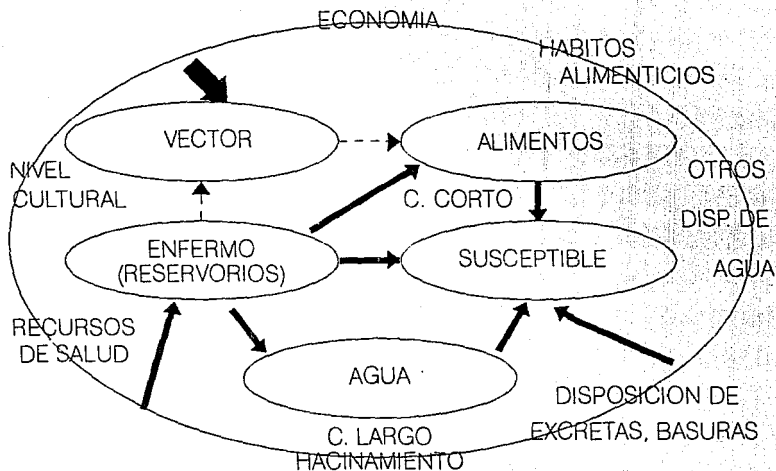


Fig. 1 Mecanismos de transmision.- Factores condicionantes tomado de Valenzuela R.H. año 1987.

ETIOLOGIA

Los agentes etiológicos de la diarrea tienen características diferentes por lo que describiremos brevemente a los microorganismos más frecuentemente encontrados como responsables de la enfermedad diarreica.

ROTAVIRUS

Desde 1943, Light y Hodes informaron un brote de diarrea en lactantes, no logrando identificar el agente que la causara. Tiempo después aislaron un agente filtrable de las heces que causó diarrea en los terneros. Siguieron realizando diversos estudios pero no lograron la confirmación de la etiología de la enfermedad.

No fué sino hasta 1973 cuando Bishop y col. observaron unas partículas virales en una biopsia duodenal de niños infectados, por microscopía electrónica, y los llamaron Rotavirus (2).

Los rotavirus constituyen un género de la familia Reoviridae. Su genoma consiste en 11 segmentos de ARN de doble cadena y poseen una envoltura doble de cápside externa e interna. Cada uno de los 11 segmentos del genoma viral pueden ser separados por electroforesis en un gel de policrilamida lo que produce un patrón de migración característico denominado electroferotipo (37).

Su clasificación serológica los divide en serogrupos, serotipos y subgrupos. Los serogrupos van de A a F, siendo los del grupo A los asociados al humano, los serotipos fueron identificados basándose en la reactividad de la proteína viral 7 (VP7), que es la de mayor potencial inmunógeno que induce los anticuerpos

neutralizantes. De los 9 diferentes serotipos; los 1, 2, 3, 4, 8 y 9 estan representados por rotavirus humanos, compartiéndose el 3 y 4 con animales. Los subgrupos, clasificados con base en la localización de epítopes específicos en la proteína VP6 de la capsida interna, son: I, II y no I /no II, siendo el II importante en el humano (37).

En la última década los rotavirus han sido hallados como agente único en niños de 6 a 24 meses de edad y parecen ser los responsables de por lo menos la mitad de los casos de diarrea infantil que requieren internamiento. La prevalencia pico de infección por rotavirus ocurre durante los meses más frios en climas templados, pero en áreas tropicales se identifican casi durante todo el año. Su mecanismo de transmisión es por contacto directo y tienen un período de incubación de 2 a 5 días (13, 29, 80).

ESCHERICHIA COLI

E. coli miembro de la familia Enterobacteriaceae es un bacilo gramnegativo, móvil o inmóvil, anaerobio facultativo, no esporulado que se encuentra habitualmente en el tubo digestivo del hombre y animales predominando en el colon. La mayoría de las cepas son comensales del tracto gastrointestinal y sólo algunas cepas expresan factores de virulencia que le confieren al microorganismo la capacidad de causar infección. Levine clasificó las cepas de E. coli en 5 grandes categorías basándose en su mecanismo patogénico:

- A).- E. coli enteropatógena (EPEC)
- B).- E. coli enterotoxigénica (ETEC)
- C).- E. coli enteroinvasiva (EIEC)
- D).- E. coli enterohemorrágica (EHEC)
- E).- E. coli enteroadherente (EAEC)

La identificación de estas cepas se realiza por medio de la tipificación de los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K) de la bacteria según el esquema descrito por Kauffman en 1947 (68).

Los factores de virulencia involucrados en el mecanismo de patogenicidad mediante los cuales E. coli causa daño son:

- 1).- Presencia de fimbrias que les permiten adherirse a los receptores específicos en la célula intestinal y/o.
- 2).- Elaboración de una o más enterotoxinas que influyen en la secreción intestinal de líquidos a través del incremento de la concentración celular del AMPcíclico (cAMP) ó cGMP.

La capacidad para adherirse al tejido epitelial ha sido uno de los atributos de patogenicidad importantes descritos en las bacterias ya que permiten la colonización del tejido en donde causan daño. Su control genético radica en plásmidos, (31) que codifican para la producción de una adhesina no fimbriada localizada en la parte exterior de la membrana celular de la bacteria, permitiéndole adherirse a los receptores específicos de la célula intestinal (45). En cuanto a la producción de toxina se

han estudiado ampliamente en diferentes tejidos animales; (37) pudiéndose distinguir dos tipos diferentes de enterotoxinas: Toxina termoestable (TS) y toxina termolábil (TL) (66). La más conocida es la toxina termolábil, cuyo modo de acción ha sido ampliamente estudiado por lo que se menciona que sigue un modelo similar a la de la toxina colérica (30).

SHIGELLA

El género Shigella está integrado por bacilos gramnegativos no esporulados, inmóviles, aerobios y anaerobios facultativos que crecen a 37 °C. Fermentan los carbohidratos, produciendo ácidos y no gas. Sus requerimientos nutritivos no son complejos, por lo que crecen en medios nutritivos ordinarios que contienen peptonas y extractos de carne. Pertenecen a la tribu Escherichiae, familia Enterobacteriaceae.

Dentro de su clasificación actual, se reconocen cuatro especies, separadas principalmente por múltiples reacciones bioquímicas; de éstas, las más importantes e informativas son:

ESPECIE	GRUPO	No. DE SEROTIPOS
<u>S. dysenteriae</u>	A	10
<u>S. flexneri</u>	B	8
<u>S. boydii</u>	C	15
<u>S. sonnei</u>	D	1

Serológicamente no intervienen los antígenos H puesto que las bacterias son inmóviles por lo que su diferenciación en serotipos

se basa en los antígenos polisacarídicos O, de tipo liso; debido a que las Shigellas guardan relación serológica con E. coli, tal vez por la conjugación intergenérica, que ocasiona considerable mezcla genética y deberán ser realmente identificados como Shigella antes de la aglutinación con antisueros polivalentes (65). Los miembros del género Shigella son patógenos, y producen una enfermedad grave conocida como disentería bacilar. El hombre parece ser el único huésped natural de Shigella y se infecta después de ingerir alimentos o agua contaminada. Las bacterias permanecen localizadas en las células del epitelio intestinal, y los efectos debilitantes de la enfermedad se atribuyen en gran medida a la pérdida de líquidos y electrolitos, y a las úlceras que se producen en las paredes del colon, mediante la acción de una citotoxina (42,65).

SALMONELLA

Los microorganismos de este género son bacilos gramnegativos y su morfología es similar a la de otras enterobacterias por lo que no se distinguen de ellas. La mayoría de las especies poseen flagelos peritricos (excepto S. enteritidis serotipos pollorum y gallinarum) no poseen cápsula, sin embargo, en la mayoría de las S. typhi se encuentra un antígeno superficial, que es un polisacárido denominado Vi. La temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C.

Todos los bacilos entéricos del grupo Salmonella son patógenos para el hombre en un menor o mayor grado. Son anaerobios facultativos. Se clasifican con base en sus propiedades antigénicas y bioquímicas. La manifestación clínica de la gastroenteritis

producida por la bacteria sugiere la implicación de una enterotoxina análoga a las de E. coli y Vibrio cholerae. La toxina es una proteína termolábil (PM=110000 daltons) que induce la acumulación de fluido en el asa intestinal y estímulo de la adenilato-ciclase (10).

No se conocen con certeza los factores que contribuyen a su virulencia, sin embargo, la presencia de fimbrias, así como su capacidad de penetrar la pared intestinal y la producción de enterotoxinas probablemente son factores significativos de virulencia.

La estructura antigénica de Salmonella es similar a la de otras enterobacterias, con dos clases principales de antígenos presentes O y H. En algunas cepas (S. typhi y S. enteritidis) se encuentra un tercer tipo, que aparece como antígeno de superficie y es análogo funcionalmente a los antígenos K de otros géneros se denomina antígeno Vi. Este antígeno se compone de polisacáridos y es termolábil y bloquea la aglutinación llevada a cabo por antisueros del grupo O, la capacidad de aglutinación puede ser restablecida en el antisuero del grupo O cuando este antígeno Vi es destruido por el calor (81).

CAMPYLOBACTER

Durante más de 70 años las bacterias del género Campylobacter han sido reconocidas como los agentes etiológicos de varias enfermedades de animales domésticos, incluyendo enteritis en ganado vacuno, carneros, cerdos y aves (32, 65, 73). Sólo en la

última década se ha establecido que ciertos miembros son patógenos importantes para el hombre, provocando brotes de enteritis así como algunas infecciones sistémicas (27, 32, 49, 59, 60, 71, 73, 75)

Cuadro 2.

C U A D R O 2

BACTERIAS DEL GENERO CAMPYLOBACTER

N O M B R E	SINONIMOS PUBLICADOS	ENFERMEDADES Y CONDICIONES CAUSADAS EN HUMANOS Y ANIMALES
<u>Campylobacter jejuni</u>	<u>Campylobacter fetus subesp. jejuni</u> , <u>Vibrios afines</u> , <u>Vibrio jejuni</u>	Diarrea y a veces septicemia en el ser humano; aborto en ovinos enteritis en vacunos.
<u>Campylobacter coli</u>	<u>Vibrio coli</u>	Diarrea en el ser humano.
<u>Campylobacter laridis</u>	Grupo de <u>Campylobacter termófilo resistente al ácido naldixico</u>	Asociado con diarrea en el ser humano.
<u>Campylobacter fetus subesp. fetus</u>	<u>Campylobacter fetus subesp. intestinalis</u> , <u>Vibrio fetus var. intestinalis</u>	Aborto en ovinos y vacunos, septicemia en humanos, usualmente en huéspedes comprometidos.
<u>Campylobacter fetus subesp. venerealis</u>	<u>Campylobacter fetus subesp. fetus</u> , <u>Vibrio fetus</u> , var. <u>venerealis</u>	Aborto e infertilidad en vacunos.
<u>Campylobacter sputorum subesp. sputorum</u>	<u>Campylobacter sputorum</u> , <u>Vibrio sputorum</u>	Ninguna.
<u>Campylobacter sputorum subesp. bubulus</u>	<u>Campylobacter bubulus</u> , <u>Vibrio sputorum var. bubulum</u> , <u>Vibrio bubulus</u>	Ninguna.

CONTINUA...

C U A D R O 2

BACTERIAS DEL GENERO CAMPYLOBACTER

N O M B R E *	SINONIMOS PUBLICADOS	ENFERMEDADES Y CONDICIONES CAUSADAS EN HUMANOS Y ANIMALES
<u>Campylobacter sputorum</u> subesp. <u>mucosalis</u>		Tumores intestinales en porcinos
<u>Campylobacter concisus</u>		Ninguna
<u>Campylobacter nitrofigilis</u>		Ninguna (fijador de nitrógeno origen marino)
"Campylobacter fecalis"	<u>Vibrio fecalis</u>	Diarrea en vacunos.
"Campylobacter hyoIntestinalis"		Iletis proliferativa en porcinos.
"Campylobacter cinaedj"	CLO-1	Asociado con diarrea en hombres homosexuales.
"Campylobacter fennelliae"	CLO-2	Asociado con diarrea en hombres homosexuales.
"Campylobacter pilórico"		Asociado con gastritis y úlceras pilóricas en humanos.
"Campylobacter aerotolerante"		Asociado con aborto en vacunos y porcinos; mastitis en vacas.

* Nombres propuestos no aprobados oficialmente por la Comisión Internacional de Bacteriología Sistemática, se indican entre comillas. Tomado de Lennete H.E., 1987.

C. fetus ss fetus es la especie tipo de este género y se considera de mayor importancia en enfermedades humanas y animales. Actualmente las especies de C. jejuni, C. coli, C. laridis, C. hyointestinalis y Helicobacter pylori (C. pylori) han cobrado gran interés en las infecciones humanas. Las otras especies y subespecies son comensales o causantes de enfermedad solo en animales (5, 44, 62, 64).

Las bacterias del género *Campylobacter* son bacilos gramnegativos, móviles, con forma curva o espiral. Su tamaño varía de 0.2 a 0.8 micrómetros de diámetro y de 0.5 a 5 micrómetros o más de longitud. Son características las formas de coma, "S" o como alas de gaviota. Las formas cocoides suelen aparecer en los cultivos viejos considerándoseles como formas degenerativas no viables (14, 15). Fisiológicamente son oxidasa y catalasa positiva, reducen los nitratos a nitritos y son esencialmente inertes desde el punto de vista bioquímico, no utilizan hidratos de carbono por la vía fermentativa ni oxidativa. La fuente primaria de energía la obtienen a partir de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (22). Son microaerófilos y requieren de una mezcla de gases de 5 % de O_2 , 8-10 % de CO_2 y 85 % de nitrógeno (15, 24, 48, 82).

Los medios de cultivo altamente selectivos que más se utilizan son el de Butzler, Skirrow y Campy-BAP puesto que contienen diversas combinaciones de antibióticos que inhiben el crecimiento excesivo de flora rectal competitiva, además, se enriquecen con sangre de carnero al 5 ó 7 %. Las colonias de *Campylobacter*

aparecen de un tamaño aproximado de 0.5 a 1.0 mm de diámetro, planas o ligeramente elevadas, lisas, convexas de color gris a café claro y ligeramente translúcidas no hemolíticas (24, 26, 71).

El mecanismo de patogenicidad mediante el cual Campylobacter causa daño aun no esta bien establecido (18). Experimentos realizados "in vivo" en animales y voluntarios humanos sugieren que para la colonización en el tracto intestinal la motilidad variada por el flagelo es muy importante (76); también la presencia de enterotoxinas (LT) y citotoxina aunque su contribución a la patogenicidad no han sido formalmente demostradas (6, 18, 63, 69,83). Actualmente la capacidad patogénica de la bacteria a adquirir hierro en el huésped, se ha descrito de importancia crítica en el establecimiento de la infección puesto que se cree que el hierro estimula su crecimiento (63).

Los adelantos obtenidos en los últimos años con las técnicas de Biotipificación, Serotipificación, Fagotipificación, Patrones de resistencia a antibióticos y Perfiles de plásmidos de ADN se tiene una herramienta útil para la diferenciación de las especies de Campylobacter y otros enteropatógenos, permitiéndose el mejor entendimiento de la epidemiología por estos patógenos intestinales.

Los esquemas de Biotipificación propuestos por Skirrow-Benjamin, Hebert y col. y Lior para la diferenciación de las Campylobacterias, se basan principalmente en su capacidad de hidrolizar el hipurato y el ADN, producción rápida de H_2S , resistencia a antibióticos y diferentes temperaturas de crecimiento (23, 33, 43, 46, 47, 55, 58, 72).

Clinicamente la enteritis causada por C. jejuni es indiferenciable de la producida por otros enteropatógenos, la presencia de deposiciones líquidas y abundantes, algunas veces acompañadas de sangre, moco o pus, fiebre discreta e irritabilidad del pequeño, son comunes (1, 16, 41, 80).

Un examen directo de las heces pueden proporcionar un diagnóstico rápido y presuntivo de la Campylobacteriosis ya sea por microscopía directa en contraste de fases observando la motilidad y formas características del microorganismo (40) o bien un frotis de las heces teñidas a Gram y contrastado con fuscina de Kinyoun al 0.3 % (14), suelen hacer posible el diagnóstico de Campylobacter hasta de un 60 % en los casos que son positivos por cultivo en los medios especiales que confirman el diagnóstico.

El tratamiento de la infección producida por Campylobacter sp. puede responder a la terapia hidroelectrolítica recuperándose el paciente en un lapso de tres a cinco días y si la diarrea producida persiste la terapia a base de antibióticos es recomendable (7, 9, 74) actualmente el antibiótico de elección es la eritromicina (17, 34, 38).

YERSINIA ENTEROCOLITICA

En los últimos diez años, Yersinia enterocolitica, se ha reconocido como causa significativa de gastroenteritis en el humano. Con mayor frecuencia se ha aislado en la parte Norte que en el Sur del Hemisferio norte y es causa importante de enfermedad entérica en Europa, Canadá y el norte de E.E.U.U. (4,8,9,74,77).

El género comprende 11 especies actualmente reconocidas tres de las cuales Y. pestis, Y. pseudotuberculosis y Y. enterocolitica se consideran de importancia clínica en el humano (3).

Los microorganismos del género *Yersinia* comprende elementos cocoides o bacilares con extremos redondeados que miden de 0.8 a 2 micras de largo por 0.2 a 0.4 micras de ancho, sin cápsula ni espora, son móviles a temperatura inferior de 30 °C mediado por flagelos peritricos, aerobios y anareobios facultativos con crecimiento óptimo a 28-30 °C, pleomórficos y no toman la coloración de Gram presentando coloración bipolar con esta técnica o más evidente aún, con tiónina fenicada y azul de toluidina (3,74).

Una característica importante del género es su dependencia de la temperatura para la expresión de varios rasgos fenotípicos como son la movilidad, propiedades bioquímicas y grado de virulencia (28) fisiológicamente las especies se caracterizan por sus reacciones negativas o variablemente positivas para la mayoría de las pruebas comunmente utilizadas (11, 74).

Y. enterocolitica crece en los medios de Mac-Conkey, SS, XLD y en todos los que contengan sales biliares. Actualmente se han desarrollado medios de cultivo altamente selectivos como el agar VYE (36) y el agar CIN (39, 70) ambos se suplementan con antibióticos que inhiben la demas flora microbiana y permiten el desarrollo de Yersinia (39).

El enriquecimiento en frío a 4 °C en solución salina buffer de fosfato aumenta la recuperación de Y. enterocolitica de las

muestras de heces. Las colonias en el agar de CIN aparecen como pequeñas colonias de 0.5 a 1 mm de diámetro, ligeramente elevadas y de bordes irregulares, presentan un centro rojo y se rodean por un halo transparente (36).

El potencial patogénico de Y. enterocolitica, ha sido ampliamente ensayado utilizando diferentes modelos animales (12,57). Se ha observado que la lesión primaria, se caracteriza por una infiltración neutrofílica masiva hacia las placas de Peyer; esta lesión que se aumenta con el tiempo llega a causar la ulceración del lumen intestinal, y en algunos casos, la perforación de la capa serosa de la cavidad peritoneal, provocando la invasión del sistema porta con compromiso hepático y septicemia generalizada con colonización en otras partes del cuerpo (12, 52).

En la actualidad se han reportado 50 serogrupos de Yersinia enterocolitica, sólo 5 se consideran patógenos humanos y son : O:1, 2a3, O:3, O:5.27, O:8 y O:9 (3, 11).

Las manifestaciones clínicas en infantes son similares a otros enteropatógenos y en adultos pueden llegar a desarrollar Ileitis terminal y linfadenitis mesentérica que pueden simular apendicitis aguda y la septicemia puede desarrollarse hasta con un 50 % del grado de mortalidad (50, 57, 67, 74).

El diagnóstico de la bacteria implica una combinación inmunológica y de cultivo ya que puede haber reacción cruzada con otros enteropatógenos y los resultados pueden confundirse (74).

La enfermedad diarreica producida por Y. enterocolitica es autolimitada y el tratamiento antimicrobiano, así como el

equilibrio líquido y electrolítico son esenciales en el manejo de pacientes severamente enfermos; los antibióticos de elección son la estreptomycin y tetraciclina (21, 79).

OBJETIVOS

- 1).- Evaluar la frecuencia de Campylobacter jejuni y Yersinia enterocolitica como parte de los agentes causales de la diarrea infantil.
- 2).- Comparación epidemiológica de C. jejuni y Y. enterocolitica como agentes etiopatogénicos del síndrome diarréico infeccioso bacteriano.
- 3).- Determinar la utilidad de la observación microscópica de Campylobacter a partir de heces diarréicas.

HIPOTESIS

Si Campylobacter jejuni y Yersinia enterocolitica se asocian frecuentemente con la diarrea infecciosa de la población infantil en los países subdesarrollados y México esta considerado dentro de este grupo, entonces, también aquí los podríamos encontrar con una alta frecuencia en el síndrome diarreico agudo

MATERIAL Y METODO

MATERIAL BIOLÓGICO

116 muestras de heces (hisopado rectal) de pacientes pediátricos con síndrome diarreico agudo

102 muestras de heces (hisopado rectal) de niños clínicamente sanos (controles)

MEDIOS DE CULTIVO PREPARADOS EN EL LABORATORIO

Medio de transporte Cary-Blair

Medio de transporte PBS pH=7.4 (Solución Buffer de Fosfatos)

Agar yema de huevo

MEDIOS DE CULTIVO COMERCIALES

Medio de transporte Carbón-Stuart (Bioxon)

Caldo tetrionato (Bioxon)

Caldo selenito y cistina (Bioxon)

Caldo de Muller-Hinton (Bioxon)

Agar base Bacto para Campylobacter (Medio de Skirrow (Difco))

Agar base selectivo para Yersinia CIN (Difco)

Agar MacConkey (Merck)

Agar Salmonella-Shigella (Dibico)

Agar XLD (Xilosa-Lisina-Desoxicolato (Merck))

Agar tergitol-7 (Bioxon)

CONTINUA...

Agar verde brillante (Bioxon)
Agar Muller-Hinton (BBL)
Agar nutritivo (Bioxon)
Agar bacteriológico (Bioxon)
Agar de hierro de kligler (Bioxon)
Agar de hierro y lisina (LIA (Bioxon))
Medio indol nitrito (Bioxo)
Medio MR-VP (bioxon)
Medio MIO (Bioxon)

SUPLEMENTOS

Suplemento S antimicrobiano Bacto para Campylobacter (Difco)
Bacto suplemento antimicrobiano para Yersinia CN (Difco)
Sangre de carnero (Distribuidor Bioexport)

REACTIVOS

Acido hipúrico RA (Merck)
Ninhidrina GR (Merck)
Butanol RA (Merck)
Acetona RA (Merck)
Peróxido de hidrógeno
Dimetilparafenilendiamina (Merck)
Fuscina básica (Merck)
Fuscina ácida (Merck)

CONTINUA...

Fenol RA (Merck)
Etanol absoluto (Merck)
Acriflavina (Merck)
Cristal violeta (Merck)
Oxalato de amonio (Merck)
Iodo RA (Técnica química S.A)
Ioduro de potasio neutro RA (Merck)
Safranina O (Sigma de México)
 α -Naftol (Merck)
Hidróxido de potasio RA (Merck)
Hidróxido de sodio RA (Merck)
Alcohol amílico o isoamílico (Merck)
P-dimetilaminobenzaldehido (Merck)
Acido clorhídrico conc. (J. T. Baker)
Lactosa (Sigma)
Xilosa (Sigma)
Trehalosa (Sigma)

SOLUCIONES

Acido hipúrico al 1%
Ninidrina al 3.5%
Butanol-acetona al 50%
Peróxido de hidrógeno al 3%
Reactivo de kovacs

CONTINUA...

Acriflavina

Voges-Proskauer solución A

Voges-Proskauer solución B

**ANTISUEROS PARA LA TIPIFICACION BACTERIANA (BIGAUX
DIAGNOSTICA)**

Antisuero E-1

Antisuero polivalente de Escherichia coli grupo A (Serogrupos O111:K58, O55:K59, O26:K60, O127:K63).

Antisuero E-2

Antisuero polivalente de Escherichia coli grupo B (Serogrupos O86:K61, O112:K66, O128:K67, O119:K69, O125:K70, O126:K71 y O124:K72).

Antisuero E-3

Antisuero polivalente de Escherichia coli grupo C (Serogrupos O18:K77, O20:K61, O20:K84, O28:K73, y O44:K74).

Antisuero S-1

Antisuero polivalente de Salmonella de los grupos A hasta el I más Vi.

Antisuero S-2

Antisuero polivalente de Salmonella de los grupos A hasta el E más Vi.

Antisuero S-3

Antisuero de Salmonella grupo A (antígeno somático 2).

CONTINUA...

Antisuero S-4

Antisuero de Salmonella grupo B (antígeno somático 4).

Antisuero S-5

Antisuero de Salmonella grupo C (antígeno somático 7).

Antisuero S-6

Antisuero de Salmonella grupo C (antígeno somático 8).

Antisuero S-7

Antisuero de Salmonella grupo D (antígeno somático 9).

Antisuero S-8

Antisuero de Salmonella grupo E (antígeno somático 3,10 y 15)

Antisuero S-12

Antisuero Salmonella antígeno Vi

Antisuero Sh-1

Antisuero polivalente de Shigella dysenteriae (grupo A). (tipos del 1 al 7).

Antisuero Sh-2

Antisuero polivalente de Shigella flexneri (grupo B). (tipos del 1 al 6)

Antisuero Sh-3

Antisuero polivalente de Shigella boydii (grupo C). (tipos del 1 al 7).

Antisuero Sh-4

Antisuero polivalente de Shigella sonnei (grupo D). (formas I y II)

CONTINUA...

Antisuero Sh-5

Antisuero polivalente de Shigella grupo Alkaescens dispar.

SENSIDISCOS DE :

Acido nalidixico 30 microg./ml (Bigaux)

Cefalotina 30 microg./ml (Bigaux)

MATERIAL DE VIDRIO

Tubos de ensaye de 13x100 mm con tapón de rosca (Pyrex)

Tubos de ensaye de 12x150 mm con tapón de rosca (Pyrex)

Tubos de ensaye de 10x75 mm (Pyrex)

Portaobjetos

Termómetro de -20 °C a 150°C

Pipetas graduadas de 1.0 ml

Pipetas pasteur

MATERIAL DIVERSO

Asas bacteriológicas

Mechero bunsen

Gradillas

Jarras bacteriológicas

Hisópos estériles

Aceite de inmersión (Sigma de México)

Sobres de Anaerocult C Microbiologic (Merck)

EQUIPOS COMERCIALES

Incubadora bacteriológica a 42 °C (Mod. 200-A, Mca. GS Blue M)

Incubadora bacteriológica a 37 °C (Mod. 3158, Mca. Forma Scientific)

Microscopio óptico (Mod. K-4, Mca. Carl Zeiss)

Estereoscopio (Stemi SV6, Mca. Carl Zeiss)

Termo-baño a 37 °C (Mod. FE-372, Mca. Felisa)

Sistema API-20E (Analitab Products)

METODO

Selección de las muestras.

Se estudiaron 116 niños que comprendían una edad de 0 a 15 años con diarrea aguda, y que asistieron al Servicio de Urgencias Pediatría del H.R. 20 de Noviembre durante el periodo comprendido entre los meses de octubre de 1991 al mes de abril de 1992. Los pacientes fueron seleccionados con ayuda del médico en turno. Ninguno de estos pacientes había recibido antibióticos durante los 15 días previos al estudio.

Se formó también un grupo testigo con 102 niños de igual edad a los enfermos con diarrea y que no habían recibido antibióticos durante el periodo señalado previamente y que fueron interceptados cuando asistían por vacunación o por otra causa por ejemplo acompañando a sus padres durante la visita.

Colección de las muestras.

Se colectaron muestras de las heces de todos los pacientes y testigos, ya sea directamente del pañal o por hisopado rectal. En el caso de que el paciente evacuara ahí mismo, se buscó tomar la muestra de donde había la presencia de moco o de sangre. Estas muestras se colocaron en los medios de transporte Cary-Blair, Amortiguador Fosfato Salino (PBS) y en Carbón-Stuart. También se realizó un frotis directo para la búsqueda de formas características de Campylobacter por tinción de Gram contrastada con fuscina básica al 0.3 % para tener un diagnóstico más rápido.

Procesamiento de las muestras.

Cada una de las muestras obtenidas se procesaron antes de la hora de su colección de la siguiente forma: del medio de transportede Cary-Blair se saco el hisopo en condiciones estériles y se descargo la muestra en el agar selectivo de Skirrow para la busqueda de Campylobacter, del medio de transporte PBS se realizó una siembra directa en el agar selectivo de CIN (Cefsulodina, Irgasan, Novobiocina) y un enriquecimiento en frío a 4 °C durante 48 horas con subsecuente resiembra en el agar de CIN para aislar Yersinia enterocolitica y del medio Carbón-Stuart se realizó siembra directa en agar MacConkey, Tergitol 7, XLD y enriquecimiento en caldo selenito y caldo de tetrionato para la subsecuente resiembra en MacConkey, SS, XLD y Verde brillante, para la búsqueda de enterobacterias como Salmonella, Shigella y E. coli enteropatógena. Fig. 2

DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGIA GENERAL

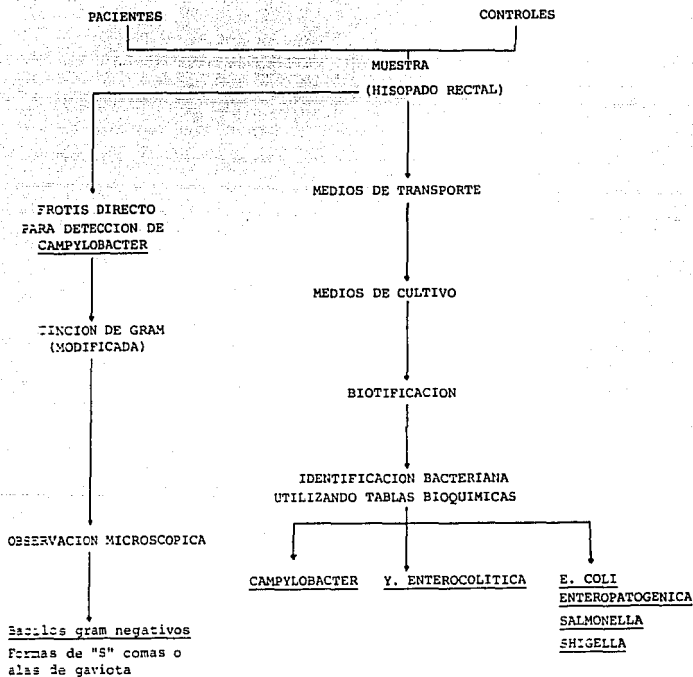


Figura 2

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE CAMPYLOBACTER (Fig. 3)

Todos los frotis recolectados durante la toma de muestra se fijaron al calor. Una vez fijados los extendidos, se llevó a cabo inmediatamente la coloración de Gram, de la siguiente manera:

- 1).- Se cubrió el extendido con cristal violeta durante un minuto y luego se lavó con agua corriente, de modo que quedara nada de colorante.
- 2).- Se cubrió el extendido con lugol durante un minuto y se lavó con agua corriente.
- 3).- Se decoloró el extendido con alcohol-acetona de modo que en los enjuages ya no escurriera nada de colorante.
- 4).- Se cubrió el extendido con fuscina básica al 0.3% (colorante de contraste) durante 3 min. y se lavó con agua corriente.

Por último, se dejó secar el frotis y se observó al microscopio con aceite de inmersión a una amplificación de 100x para la confirmación de la morfología bacteriana; bacilos curvos, Gram negativos en forma de "S" o alas de gaviota. En todos aquellos que se encontraban formas características de Campylobacter se anotaron como positivas por frotis y después se compararon con los resultados obtenidos por cultivo.

Las muestras obtenidas en el medio de transporte Cary-Blair (Anexo); fueron procesadas antes de los 30 min. de su colección debido a que las bacterias del género Campylobacter son muy sensibles a las condiciones atmosféricas del medio ambiente, lo que

puede dificultar su recuperación de las heces y proporcionar resultados falsos negativos.

Cada muestra se inoculó en dos placas que contenían medio de Skirrow (anexo), aislándolos inmediatamente por estria cruzada.

Se procedió a separar cada placa y se metieron en jarras de Brewer con tapa hermética, se les colocó además un sobre de Anaerocult C humedecido con 6 ml de agua corriente para proporcionar las condiciones atmosféricas con tensión reducida de H_2O e incremento de $C O_2$ necesarias para el desarrollo de los microorganismos. Ambas jarras se cerraron hermeticamente y una de ellas se dejó incubando a temperatura ambiente (25°C) y la otra se metió a incubar a una temperatura de 42°C dejándolos a ambas durante 48 hrs.

Después de transcurrido el periodo de incubación ya mencionado se abrieron las jarras y se compararon las placas para observar crecimiento, si en ambas temperaturas no había crecimiento se reportaron como negativas para *Campylobacter* por cultivo; pero si existía crecimiento se observaba morfología colonial y a las colonias sospechosas se les realizó un frotis para tinción de Gram modificado así como las pruebas químicas de oxidasa y catalasa (anexo). A los casos positivos y en caso de contaminación se procedió a purificar en agar Skirrow, posteriormente, se identificó la especie del *Campylobacter* aislado en los pacientes y controles por temperatura de crecimiento, sensibilidad a antibióticos y a la capacidad de hidrolizar el hipurato. Tabla 1.

Técnica de hidrólisis del hipurato

Tomar una asada del cultivo de *Campylobacter* purificado e inocular en tubos de 10x75 mm que contienen 0.4 ml de hipurato de sodio al 1% (anexo), mezclar bien e incubar en baño maría a 37°C durante 2 horas. Después se agrega lentamente por la pared del tubo 0.2 ml de ninhidrina al 3.5% (anexo) disuelta en butanol-acetona al 50%, reincubar durante otros 5 ó 10 min. sin mezclar y leer inmediatamente.

Un color purpura intenso representa una reacción positiva que indica la presencia de glicina como resultado de la hidrólisis del hipurato. Una reacción incolora o debilmente colorida representa un resultado negativo.

Sensibilidad a Acido Nalidíxico y Cefalotina como pruebas de identificación

Se requieren cultivos puros de 24 a 48 hrs. de crecimiento

Se inoculan tubos de 13x100 mm con tapón de rosca que contienen 5 ml de caldo Muller-Hinton hasta lograr una turbidez semejante a la de 0.5 de MacFarland, lograda la turbidez se impregna un hisopo estéril, de manera que la concentración bacteriana sea homogénea y se descarga en una placa que contiene agar Muller-Hinton. Se realiza estriado masivo con el fin de distribuir las cepa en toda la caja y se colocan sensidiscos de ácido nalidíxico (30 microg/ml) y de cefalotina (30 microg/ml) se meten a incubar a 42°C en condiciones microaerofilicas durante

DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL AISLAMIENTO E
IDENTIFICACION DE CAMPYLOBACTER

SEBRAR POR DUPLICADO EN EL MEDIO DE SKIRROW
POR ESTRIA CRUZADA

↓
COLOCAR LAS PLACAS EN JARRAS DE ANAEROBIOSIS
MAS SOBRES DE ANAEROCULT C

↓
INCUBAR A :

- a) 42°C
- b) 25°C (temp. amb.)
durante 48 hrs.

↓
OBSERVAR MORFOLOGIA COLONIAL
A AMBAS TEMPERATURAS DE CRECIMIENTO
(Si hay contaminación purificar en agar Skirrow)

↓
COLONIAS SOSPECHOSAS REALIZAR:

- Frotis y tinción de Gram modificada
- Oxidasa (+)
- Catalasa (+)

↓
SI SON POSITIVAS

↓
BIOTIFICAR
(TABLA 1)

T A B L A 1
 COMPORTAMIENTO DE LAS ESPECIES DE CAMPYLOBACTER
 CON DIFERENTES SUSTRATOS

ESPECIE	t °C	CATALASA	HIPURATO	ACIDO NALIDIXICO (19 mm)	CEFALOTINA (18 mm)	UREA
<u>Campylobacter jejuni</u>	42	+	+	S	R	-
<u>Campylobacter coli</u>	42	+	-	S	R	-
<u>Campylobacter laridis</u>	42	+	-	R	R	-
<u>Campylobacter fetus</u>	25	+	-	R	S	-
<u>Campylobacter hyointes- tinalis</u>	25-42	+	-	R	S	-
<u>Helicobacter pilori</u>	37	+	-	R	S	+

S = sensible
 R = resistente

48 hrs. La sensibilidad producida se mide por el halo de inhibición producida para la bacteria.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE Y. ENTEROCOLITICA (Fig. 4)

Las muestras transportadas en solución salina (PBS, pH=7.4 (anexo)) se descargaron en el medio de cultivo selectivo de CIN(anexo) y en el medio de MacConkey. Se realizó estria cruzada para aislamiento y se incubaron a 37°C durante 24-48 hrs.

Las muestras en PBS no fueron desechadas inmediatamente sino que se dejaron en refrigeración a 4°C durante 24-48 hrs. para su subsecuente resiembra en los medios de CIN y MacConkey.

Las placas fueron revisadas después de cada incubación para observar morfología colonial, a las colonias sospechosas que en el medio de CIN crecían puntiformes con un centro rojo y rodeadas por un halo transparente y que en el medio de MacConkey eran lactosa negativa, fueron reaisladas en el medio de CIN de donde fueron tomadas para la prueba de oxidasa, si resultaba negativo se montaron las bioquímicas de Kligler, MIO, LIA y Urea (ver fig. 5), y se incubaron a 37°C durante 24 hrs. la confirmación de las colonias sospechosas se realizó mediante el sistema API-20E (anexo).

DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE YERSINIA ENTEROCOLITICA

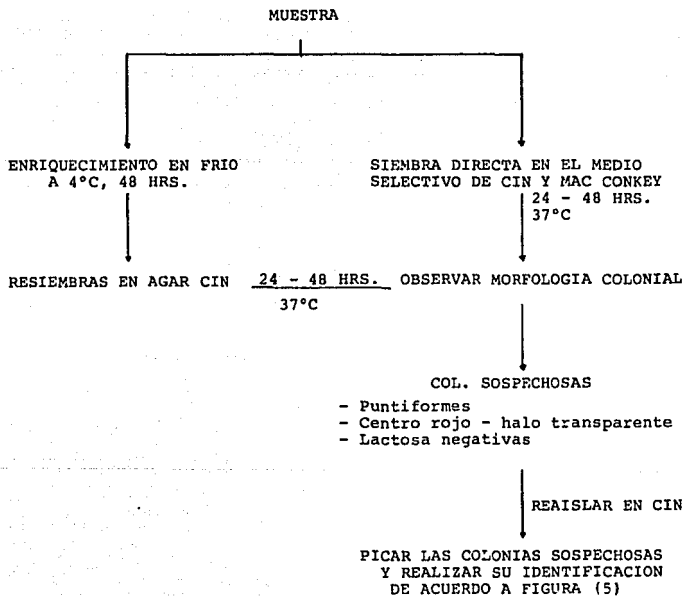


Figura 4

DIAGRAMA DE FLUJO QUE MUESTRA LA IDENTIFICACION DE YERSINIA ENTEROCOLITICA

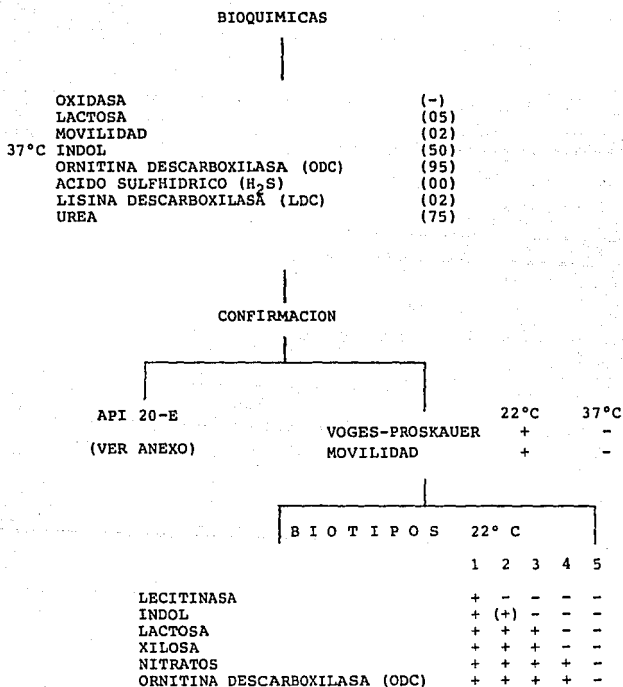


Figura 5

La fig. 6 describe ampliamente el procedimiento a seguir para el aislamiento e identificación de otras enterobacterias Salmonella, Shigella y Escherichia coli enteropatógena.

DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL AISLAMIENTO
E IDENTIFICACION DE ENTEROBACTERIAS

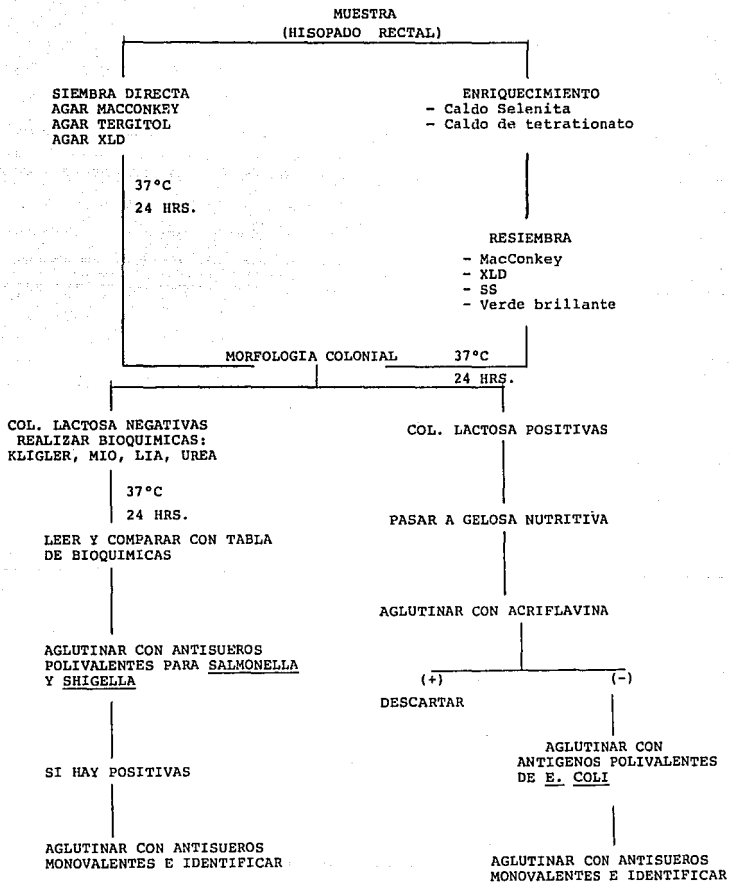


Figura 6

RESULTADOS

Durante los seis meses de investigación se estudiaron 116 niños con diarrea y 102 niños clínicamente sanos (controles).

En ambos grupos se respetaron siempre los criterios de exclusión e inclusión establecidos inicialmente en este estudio.

De los 116 pacientes, únicamente 34 presentaron infección bacteriana. Se identificaron bacterias enteropatógenas con una frecuencia de 31.89% en los pacientes con diarrea. Para el grupo testigo la cifra de aislamiento fué significativamente inferior (4.9%).

En la distribución de bacterias enteropatógenas aisladas en el grupo con diarrea (tabla 2) Campylobacter fué el microorganismo más frecuente (17.24%), en segundo lugar Salmonella con una frecuencia de 7.75%, Shigella y E. coli enteropatógena se encontraron en porcentajes bajos (3.44% y 2.58% respectivamente). Y. enterocolitica se aisló con una muy baja frecuencia 0.86% y pertenece al biotipo O:3. En la fig. 7 puede observarse mejor la frecuencia muy elevada de Campylobacter.

Del grupo testigo se aislaron sólo dos tipos de bacterias Campylobacter y Shigella ambas se encontraron en proporciones inferiores a los del grupo de pacientes.

De los 116 niños con diarrea solamente 34 (29.3%) presentaron infección simple o combinada con estos enteropatógenos. De los pacientes estudiados se incluyeron niños con edad de 0 a 15 años dentro de los cuales se clasificaron en 5 grupos (tabla 3).

La tabla 4 muestra que los grupos I, II y III son los mayormente afectados por las bacterias enteropatógenas. En el grupo I, 16 fueron infecciones simples y solo una mixta; en el grupo II; 6 simples y una mixta y en el grupo III las 7 fueron simples, en los otros grupos IV y V casi no se identificaron agentes etiológicos bacterianos de la diarrea; nótese que los microorganismos más frecuentes fueron Campylobacter y Salmonella.

La tabla 5 describe las 3 infecciones mixtas que se encontraron por grupos de edad. La del grupo I corresponde a una asociación entre Campylobacter coli y Salmonella entérica grupo B; la del grupo II a Campylobacter jejuni y Shigella boydii la del grupo IV a Campylobacter laridis y Salmonella entérica grupo B.

Con respecto a la frecuencia de enterobacterias por meses del año, los meses mayormente afectados fueron octubre y enero; en ambos Campylobacter fué el más frecuente (tabla 6 y figura 7).

Con base en los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas se identificaron 20 cepas de Campylobacter de los cuales 14 (70%) fueron caracterizados como Campylobacter jejuni; 4 (20%) fueron Campylobacter coli y 2 (10%) se identificaron como Campylobacter laridis (gráfica I).

Los grupos de Salmonella identificados fueron 7 (77.7%) que correspondio a S. enterica grupo B, una al grupo D (11.11%) y una al grupo C (11.11%) (gráfica II).

Sólo tres especies de Shigella fueron aisladas 2 (75%) se identificaron como S. flexneri y una que correspondió a la especie boydii (25%) (gráfica III).

SENSIBILIDAD DE LA PRUEBA FROTIS DIRECTO Y TINCION DE GRAM

PARA DETERMINAR CAMPYLOBACTER

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{P.V}}{\text{PV} + \text{NF}} = \frac{\text{P.V}}{\text{total de enfermos}} \times 100$$

Donde

PV = Positivos verdaderos el número de sujetos enfermos

clasificados correctamente por la prueba.

NF = Negativos falsos; el número de sujetos enfermos clasificados erroneamente por la prueba.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{15}{15 + 5} = \frac{15}{20} \times 100$$

Sensibilidad = 75%

T A B L A 2
 FRECUENCIA DE BACTERIAS ENTEROPATOGENICAS EN PACIENTES CON
 SINDROME DIARREICO Y CONTROLES

MICROORGANISMOS	No. DE PACIENTES CON SINDROME DIARREICO (TOTAL = 116)		C O N T R O L E S (TOTAL = 102)	
	FRECUENCIA	%	FRECUENCIA	%
<u>Campylobacter</u>	20	17.24	4	3.29
<u>Salmonella</u>	9	7.75	0	0
<u>Shigella</u>	4	3.44	1	0.98
<u>Escherichia coli enteropatógena</u>	3	2.58	0	0
<u>Yersinia enterocolitica</u>	1	0.86	0	0
T O T A L	37/116	31.89	5/102	4.90

FRECUENCIA DE BACTERIAS ENTEROPATOGENAS CAUSANTES DE SINDROME DIARREICO

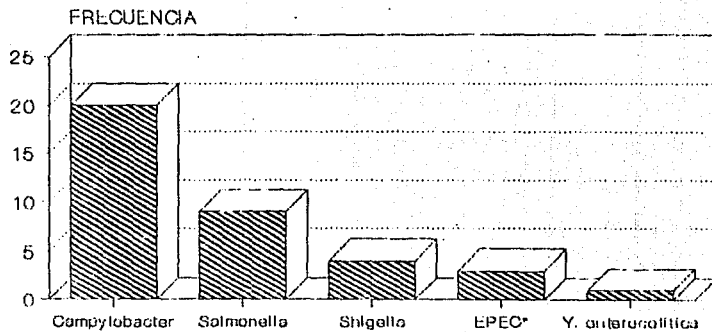


FIGURA 7. * EPEC (Escherichia coli enteropatógena).

T A B L A 3
 DISTRIBUCION DE PACIENTES CON SINDROME DIARREICO DE
 ACUERDO A LA EDAD EN GRUPOS.

GRUPO	EDAD	No. DE PACIENTES	% DEL TOTAL
I	0 - 6 MESES	30	25.86
II	7m - 1 AÑO	35	30.17
III	2a. - 5 AÑOS	36	31.03
IV	6a. - 10 AÑOS	12	10.34
V	11a.- 15 AÑOS	3	2.58
TOTAL		116	100

NOTA : m = meses
 a = años

T A B L A 4

PORCENTAJE DE AISLAMIENTOS DE PATOLOGIA ENTERICA
CON RELACION A LOS PACIENTES ESTUDIADOS POR GRUPOS DE EDAD

MICROORGANISMO	GRUPO I 30/18	GRUPO II 35/8	GRUPO III 36/7	GRUPO IV 12/2	GRUPO V 3/2	TOTAL 116 PACIENTES
<u>Campylobacter</u>	11	5	3	0	1	20
<u>Salmonella</u>	6	0	2	0	1	9
<u>Shigella</u>	0	2	1	1	0	4
<u>Escherichia coli</u> <u>enteropatógena</u>	1	1	1	0	0	3
<u>Yersinia enterocolitica</u>	0	0	0	1	0	1
T O T A L	18 (60.0%)	8 (22.85%)	7 (19.44%)	2 (16.66%)	2 (66.66%)	116/37 (31.89%)

NOTA : Se obtuvieron solo tres casos de infección mixta que aparecen en la tabla 5.

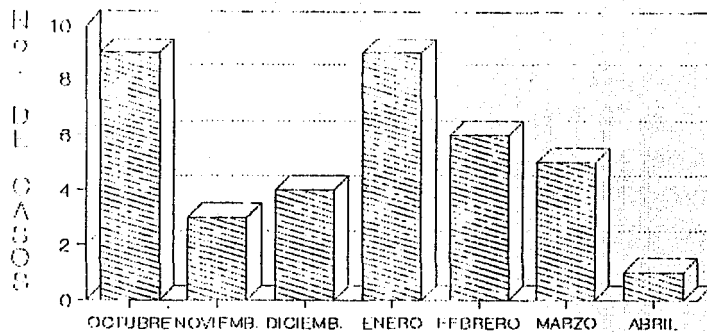
T A B L A 5
CASOS DE INFECCION MIXTA POR GRUPOS DE EDAD

GRUPO	MICROORGANISMOS ASOCIADOS	No. DE CASOS
I	<u>CAMPYLOBACTER COLI</u> Y <u>SALMONELLA ENTERICA GRUPO B</u>	1
II	<u>CAMPYLOBACTER JEJUNI</u> Y <u>SHIGELLA BOYDII</u>	1
V	<u>CAMPYLOBACTER LARIDIS</u> Y <u>SALMONELLA ENTERICA GRUPO B</u>	1

T A B L A 6
 FRECUENCIA DE AISLAMIENTO DE ACUERDO AL MES DEL AÑO

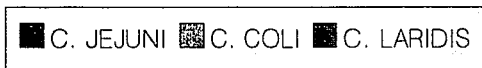
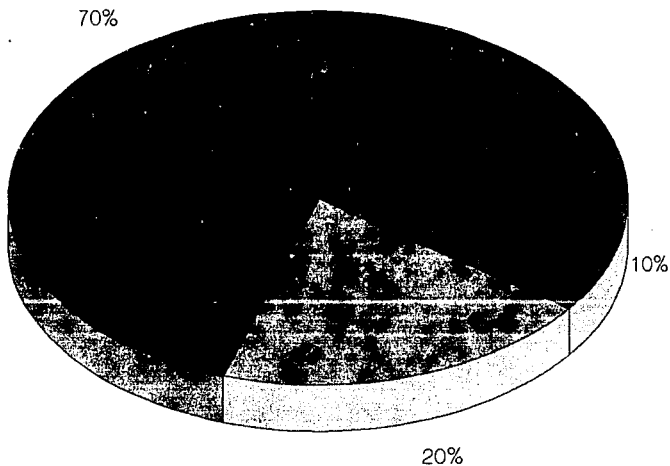
MICROORGANISMO	OCTUBRE	NOVIEMBRE	DICEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL
<u>Campylobacter</u>	4	2	2	6	3	2	1
<u>Salmonella</u>	2	1	2	0	2	2	0
<u>Shigella</u>	1	0	0	3	0	0	0
<u>Escherichia coli</u> <u>enteropatógena</u>	2	0	0	0	0	1	0
<u>Yersinia enterocolitica</u>	0	0	0	0	1	0	1
T O T A L	9	3	4	9	6	5	1

FRECUENCIA DE AISLAMIENTO DE ACUERDO AL MES DEL AÑO.



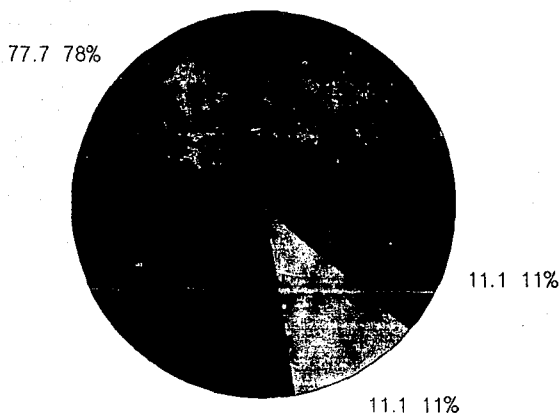
GRAFICA I

ESPECIES DE *CAMPYLOBACTER* AISLADAS



GRAFICA II

GRUPOS DE *SALMONELLA* ENTERICA AISLADAS



■ S. ENTERICA GRUPO B ▨ S. ENTERICA GRUPO D
■ S. ENTERICA GRUPO C2

GRAFICA III

ESPECIES DE *SHIGELLA* AISLADAS



DISCUSION DE RESULTADOS

Las enfermedades diarréicas se conocen desde tiempos inmemorables, constituyendo aún en la actualidad un serio problema de los países en desarrollo.

El planteamiento de medidas preventivas específicas contra procesos diarréicos en niños menores de tres años de edad requiere de datos obtenidos en diferentes niveles de atención de salud que reflejen con mayor fidelidad lo que acontece en la comunidad.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que las cepas de Campylobacter y Salmonella constituyeron más del 70% de los microorganismos comunmente asociados a cuadros diarréicos en los niños que asistieron a consulta al Servicio Urgencias Pediatría del Hospital 20 de Noviembre, siendo los niños de los grupos I, II y III los mayormente afectados quienes correspondieron a niños menores de 5 años de edad. Comparando estos resultados con los realizados en otros lugares (29, 61, 62, 83) podemos observar que no hay diferencia significativa entre ambos.

Cabe mencionar que en este trabajo no se investigó de manera sistemática la presencia de enteroparásitos ni de rotavirus, sin embargo, en otros estudios se han detectado parásitos en 7.2% de los lactantes con diarrea y una cifra similar en niños asintomáticos; del mismo modo se han encontrado rotavirus asociados a cuadros de diarrea en 9.1 a 14.3% de los casos en la época de verano y entre 18.9 y 37.5% en invierno (61).

Estos antecedentes indican que en algunos casos de diarrea no

es posible identificar un agente enteropatógeno, lo cual, podría explicarse porque las técnicas utilizadas no alcanzan una sensibilidad óptima o bien porque todavía no se conoce totalmente el espectro completo de los agentes que intervienen en el síndrome diarréico agudo.

De los agentes entropatógenos aislados Campylobacter fué el microorganismo más frecuentemente encontrado en los niños con diarrea (17.24%) ya sea en forma pura o combinada y causó en la población estudiada una enfermedad similar a la que provocan las infecciones por Shigella y Salmonella. Esta frecuencia relativamente alta de Campylobacter encontrada en los niños con diarrea concuerda con la observación de que en los países en desarrollo este microorganismo se aísla con más frecuencia que en los industrializados; probablemente debido a la deficiencia en las condiciones sanitarias y al contacto con adultos y animales con diarrea.

La frecuencia con la que se aisló Campylobacter confirma su importancia como agente casual de diarrea aguda en nuestra población infantil situándole en una proporción semejante a la observada tradicionalmente para Shigella. A pesar de que este microorganismo se detectó en forma pura en 4 de los 102 niños sanos (3.9%), se encontró una diferencia significativa con respecto a la presencia de la bacteria entre enfermos y testigos.

Lo anterior contrasta con estudios realizados en Bangladesh (5) donde no se ha establecido este tipo de diferencia, ya que la

bacteria se ha aislado con igual frecuencia tanto de personas enfermas como de sanas.

El que se hayan encontrado cepas de Campylobacter durante todos los niveles de estudio nos sugiere que su aislamiento puede ser en cualquier época del año y posiblemente con incremento mayor durante el verano.

Con respecto a las especies de Campylobacter aislados se observa que las especies termorresistentes son la más comunmente identificadas en los pacientes con diarrea siendo C. jejuni la especie predominante (70%) confirmándonos que su identificación como agente responsable del síndrome diarréico agudo es de mayor importancia.

En cuanto a la utilidad del frotis teñido para la identificación de Campylobacter se aplicó la fórmula de sensibilidad emanada de la tabla de contingencia estadística para calcular la sensibilidad de este método con respecto al cultivo, encontrándose una sensibilidad del 75%. Este resultado nos sugiere que el método como prueba de escrutinio para iniciar un tratamiento oportuno es confiable, rápido y muy sencillo.

La frecuencia de aislamiento de Y. enterocolitica fué baja (0.86%), resultado comparable con otros estudios realizados en nuestro país, donde se reporta que su aislamiento puede ir desde hasta un 3.1% (54); esto puede ser explicado porque generalmente su hábitat natural se encuentra en las zonas frías como Canadá y Europa donde alcanza una frecuencia elevada.

CONCLUSIONES

De los 116 niños estudiados, únicamente 34 presentaron infección bacteriana. La distribución porcentual de bacterias enteropatógenas fué: Salmonella (7.75%), Shigella (3.44%), E. coli enteropatógena (2.58%), Campylobacter (17.24%) y Y. enterocolitica (0.86%).

Campylobacter fué el microorganismo mayormente identificado ya sea en forma simple o combinada. Se aisló con una frecuencia de 17.24% siendo la especie jejuni la más frecuente (70%), en segundo lugar Campylobacter coli (20%) y en tercer lugar Campylobacter laridis (10%).

En comparación con los controles estudiados la frecuencia de Campylobacter fué significativamente menor que la de enfermos, (3.29% y 17.24% respectivamente).

El método frotis directo y tinción de Gram modificada es confiable como prueba de escrutinio para un diagnóstico previo al cultivo y tiene una sensibilidad del 75%.

La identificación de C. jejuni, la cual es alta en niños menores de 5 años de edad por lo que debe considerarse en los exámenes de rutina en los laboratorios de pruebas clínicas.

El aislamiento de Y. enterocolitica es baja, sin embargo, es necesario que se sigan realizando estudios de este tipo para ampliar mejor el conocimiento sobre la epidemiología de estos microorganismos.

A N E X O

MEDIOS DE CULTIVO COMERCIALES

AGAR BASE PARA CAMPYLOBACTER (DIFCO)

Es un medio basal utilizado con suplemento antimicrobiano S o B Bacto para Campylobacter en su aislamiento y cultivo.

COMPOSICION

(INGREDIENTES X LITRO)

Proteosa-Peptona, Difco	15 g
Digestión de hígado	2.5 g
Extracto de levadura Bacto	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar Bacto	12 g

PREPARACION

Rehidratar el medio suspendiendo el contenido del Kit-Blaser agar para Campylobacter (19.75 g) en 500 ml de agua destilada o desionizada y calentar hasta disolver totalmente. Esterilizar en autoclave durante 15 min. a 15 lbs. de presión (121°C), enfriar a 45 ó 50°C.

Adicionar en condiciones asépticas 5-7% de sangre estéril de borrego más 5 ml del suplemento S antimicrobiano Bacto para Campylobacter. Agregar el medio a las placas y solidificar.

pH final= 7.4± 0.2 a 25°C.

"SUPLEMENTO"

AGAR BASE BACTO PARA CAMPYLOBACTER.

Suplemento S antimicrobiano Bacto para Campylobacter

FORMULA

Vial 5 ml

Vancomicina	5 mg
Polimixina B	1.250 Units
Trimetroprim	2.5 mg

Agar base selectivo para Yersinia

Cefsulodina Irgasan Novobiocina

(CIN)

Un medio selectivo y diferencial en placa usado con Bacto suplemento Antimicrobiano para Yersinia CN en el cultivo de Yersinia enterocolitica.

FORMULA

(INGREDIENTES POR LITRO)

Extracto de levadura Bacto	29
Peptona Bacto	17 g
Proteosa-Peptona, Difco	3 g
Manitol	20 g

CONTINUA...

Deoxicolato de sodio	0.5 g
Colato de sodio	0.5 g
Cloruro de sodio	1 g
Piruvato de sodio	2 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	10 mg
Agar Bacto	13.5 g
Rojo neutro Bacto	30 mg
Cristal violeta Bacto	1 mg
Irgasan	4 mg

PREPARACION

Rehidratar el medio, suspendiendo 59.5 g en un litro de agua destilada o desionizada y calentar hasta disolver completamente. Esterilizar en autoclave 15' a 15 lbs de presión (121°C). Enfria a 45- 50°C.

En condiciones asépticas adicionar 10 ml de Bacto suplemento antimicrobiano para Yersinia CN y mezclar lentamente. Vaciar a cajas de petri. pH final 7.4 ± 0.2 a 25°C.

Bacto (DIFCO)

Suplemento antimicrobiano para Yersinia CN

Cefsulodina	4 mg
Novobiocina	2.5 mg

Para usarse con Bacto Agar base selectivo para Yersinia en la preparación de agar selectivo para Yersinia.

Observación: Todos los demás medios comerciales utilizados se prepararon de acuerdo a las indicaciones dadas por el fabricante.

MEDIOS PREPARADOS EN EL LABORATORIO

Cary-Blair

FORMULA

Tioglicolato de sodio	1.5 g
Fosfato disódico	1.1 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	5.0 g
Agua destilada	991 ml

Calentar con agitación hasta clarificar, enfriar a 50°C y adicionar 9 ml de solución fresca acuosa de cloruro de calcio al 4 ajustar pH= 8.4. Colocar 7 ml en tubos esterilizados con tapón de rosca.

Solución Buffer de Fosfatos (PBS) 0.067 M pH= 7.6

FORMULA

Cloruro de sodio	8.5 g
Fosfato de potasio monobásico 0.067 M	120 ml
Fosfato de sodio dibásico 0.067 M	880 ml

Preparar los fosfatos a 0.067 M mezclar y disolver el cloruro de sodio. Esterilizar y colocar 4 ml en tubos esterilizados con tapón de rosca.

Agar yema de huevo

FORMULA

Peptona..... 20 g.
Monofosfato de sodio..... 2.9 g.
Cloruro de sodio..... 1.0 g.
Solución acuosa al 5% de
sulfato de magnesio..... 1.0 ml.
Agar 12.5 g.
Agua destilada..... 500 ml.
pH final= 7.3

Esterilizar y enfriar a 60°C, añadir una yema de huevo, mezclar y servir en cajas petri.

Uso: se utiliza para la prueba de lecitinasa en la identificación de biotipos de Y. enterocolitica. la formación de un precipitado alrededor de la colonia indica una prueba positiva.

PREPARACION DE SOLUCIONES

Reactivo para oxidasa

Dimetilparafenilendiamina 1.0 g
Agua destilada 100 ml

Preparación

Hacer tiras de papel filtro e impregnarlas con el reactivo diluido, dejar secar las tiras y guardarlas en frasco ámbar a 4°C (estas tiras pueden usarse confiablemente de 15 a 20 días). Se utilizan para la prueba de oxidasa.

Reactivo para catalasa

Peróxido de hidrógeno 3.7 ml
Agua destilada 97.0 ml

Tomar una asada de la colonia a investigar y colocarla sobre un portaobjetos, adicionar una gota de peróxido de hidrógeno y observar. Si hay formación de burbujas la prueba es positiva.

Fuscina

Solución A	Solución B
Fuscina básica 0.3 g	Fenol fundido 5 ml
Etanol 10.0 ml	Agua destilada 95 ml

Preparación

Mezcle perfectamente la solución A y la solución B y guarde en frascos ámbar. Se utiliza para la tinción de Gram modificada para *Campylobacter*, en lugar de safranina.

Acriflavina

Acriflavina	1.0 g
Agua destilada	550.0 ml

Preparación

Mezcle perfectamente la solución y guardarla en frasco ámbar en refrigeración. Se utiliza para la aglutinación de las colonias de *E. coli*.

Hipurato de sodio

Acido hipúrico	0.1 g
Agua destilada	10.0 ml

Preparación

Mezclar perfectamente el ácido hipúrico y colocar 0.4 ml de la solución en tubos de 10 X 75 mm. Se utiliza para la determinación de hidrólisis del hipurato.

Ninhidrina

Ninhidrina	0.175 g
Butanol	2.5 ml
Acetona	2.5 ml

Preparación

A la ninhidrina se le agrega el butanol y la acetona, se mezclan perfectamente, y se guarda en frasco ambar. Su preparación puede realizarse el mismo día de su utilización o guardarse en refrigeración a 4°C y ser utilizado en no más de una semana.

REACTIVO DE KOVACS

Alcohol amílico o isoamílico.....	150 ml.
p-Dimetil aminobenzaldehido.....	10 g.
Acido clorhídrico Conc.....	50 ml.

Preparación

Disolver el aldehido en alcohol y agregar lentamente el ácido. El reactivo debe ser de color amarillo, si el color es café no deberá usarse.

Método de utilización

Añadir aproximadamente 0.5 ml de Kovacs al medio MIO o al SIM para detectar la producción de Indol. Reacción positiva color rojo, negativa si no hay cambio de color.

Reactivo de Barritt

Solución A	Solución B
α -Naftol.....	5 g.
Hodroxido de Potasio....	40 g.
Alcohol etílico absoluto... 100 ml	Agua destilada..... 100 ml.

Nota: Al disolver el Hidróxido de potasio en agua, colocar el recipiente en un baño de agua fría circulante para controlar la temperatura

Método de utilización

Añadir 0.6 ml. de la solución A y 0.2 ml. de la solución B a 1 ml. de caldo VP (Voges Proskauer) ya crecido. Agitar vigorosamente después de la adición de caldo reactivo. La reacción

positiva se desarrolla después de 5 min. y está indicado para la producción de un color rojo. En la reacción negativa, no hay cambio de color.

Uso: Prueba bioquímica de voges-proskauer.

Lugol

Iodo..... 1g.
Iodo de K..... 2g.
H O 300 ml.

Preparación

Triturar el Iodo y el Ioduro de potasio en un mortero, añadir unos mililitros de agua y triturar vigorosamente, ir añadiendo poco a poco el resto del agua conservar la solución en frasco ámbar. Uso tinción de gram.

Alcohol-Acetona

Alcohol etílico 95%
Acetona

Preparación

Mezclar ambos solventes en partes iguales. Uso tinción de gram.

Safranina

Solución stock	Solución de Trabajo
Safranina O..... 2.5 g.	Solución stock.... 10 ml.
Alcohol etílico al 95% ...100 ml	Agua destilada.... 90 ml.

Uso : Tinción de gram

Cristal violeta

Solución A	Solución B
Cristal violeta..... 2.0 g.	Oxalato de amonio..... 0.8 g.
Alcohol etílico al 95%..... 20 ml.	Agua destilada..... 80 ml.

Preparación Mezclar la Solución A y B, filtrar la preparación y guardar en frasco ámbar. No usar antes de 24 hrs.

Uso : Tinción de gram.

API 20-E

El equipo API 20-E consta de una tira plástica con 20 minitúbulos que contienen sustratos deshidratados y una cámara de incubación con tapa hermética. En la parte superior de cada túbulohay un pequeño orificio através del cual se inocular la suspensión bacteriana con una pipeta.

PROCEDIMIENTO:

Se coloca la placa sobre una bandeja de incubación.

Se prepara una suspensión bacteriana del organismo en estudio, suspendiendo las células de una colonia bien aislada en 5 ml. de solución salina estéril al 0.85%. Empleando una pipeta Pasteur se llena cada uno de los tubos con la suspensión bacteriana através del orificio de inoculación. Los tres tubos correspondientes a las descarboxilasas (ADH, LDC, ODC), H₂S y urea se cubren con una

cepa de aceite mineral estéril. Se añaden 5 ml. de agua corriente para proveer una atmósfera húmeda durante la incubación.

Se tapa y se incuba a 37°C durante 24 hrs.

Los resultados obtenidos se transforman en números de biotipos de 7 dígitos a partir de los cuales se puede efectuar la identificación del cultivo bacteriano con la ayuda de un registro de perfiles.

Interpretación visual de las reacciones positivas y negativas

API 20-E

Características	Reacciones visuales	
	Positiva	Negativa
ONPG	Amarillo	Incoloro
Arginina dihidrolasa	Rojo anaranjado	Amarillo
Lisina descarboxilasa	Rojo anaranjado	Amarillo
Ornitina descarboxilasa	Rojo anaranjado	Amarillo
Citrato	Azul oscuro	Verde claro
Sulfuro de hidrógeno	Ennegrecimiento	Incoloro
Ureasa	Rojo cereza	Amarillo
Triptófano desaminasa (añadir FeCl ₃ , 10%)	Rojo castaño	Amarillo
Indol	Anillo Rojo	Amarillo
Voges-Proskauer (añadir KOH + α-naftol)	Rojo	Incoloro
Gelatina	Difusión de pigmento	Sin difusión de pigmento
Glucosa	Amarillo	Azul verdoso
Manitol	Amarillo	Azul verdoso
Inositol	Amarillo	Azul verdoso
Sorbitol	Amarillo	Azul verdoso
Ramnosa	Amarillo	Azul verdoso
Sacarosa	Amarillo	Azul verdoso
Melibiososa	Amarillo	Azul verdoso
Amigdalina	Amarillo	Azul verdoso
Arabinosa	Amarillo	Azul verdoso

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Arredondo J.: Diarrea en el recién nacido. Bol Méd. Hosp. Infant. Méx., 1987, 44: 360-368.
- 2.- Bishop R.F, Davidson G.P., Holmes I.H., Ruck B.J.: Vives particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. Lancet 1973, 2: 1281-1283.
- 3.- Bisset M.L., Powers C., Abbott L.S., and Janda M.J.: Epidemiologic Investigations of Yersinia enterocolitica and Related Species: Source, Frequency and Serogroup Distribution. J. Clin Microbiol 1990, 28:910-912.
- 4.- Bisset L.M.: Yersinia enterocolitica Isolates from humans in California 1968-1975 J. Clin Microbiol 1976, 4: 137-144.
- 5.- Blaser J.M., Glass I.R., Huq M.I. y col: Isolation of Campylobacter fetus subsp jejuni from bangladesh Children. J. Clin Microbiol. 1980, 12: 744-747.
- 6.- Bok H.E., Greeff A.S. and Crewe B. H.: Incidence of toxigenic Campylobacter Strains in South Africa. J. Clin. Microbiol. 1991, 29: 1262- 1264.
- 7.- Boop A.C., Birkness A. K., Nachsmuth K.J. and Barrett J.T.: In Vitro Antimicrobial Susceptibility, Plasmid Analysis and Serotyping of Epidemic- Associated Campylobacter jejuni J. Clin. Microbiol. 1985, 21: 4-7.

- 8.- Bottone J.E. and Thomas R.: Yersinia enterocolitica: Recovery and characterization of two unusual Isolates from a case of Acute Enteritis. J. Clin. Microbiol. 1977 5: 341-345.
- 9.- Bradbury C.W. and Munroe L.G.: Occurrence of plasmids and Antibiotic Resistance among, Campylobacter jejuni and Campylobacter coli Isolated from Healthy and Diarrheic Animals. J. Clin. Microbiol. 1985, 22: 339-346.
- 10.- Capioli A. y col.: Isolation of Salmonella wein heatlabile enterotoxin - Toxicon. 1982, 20: 254.
- 11.- Caprioli T., Drapeu J.A. and Kasatiya S: Yersinia enterocolitica: Secotypes and Biotypes Isolated from Humans and the Environment in Quebec, Canada. J. Clin. Microbiol. 1978, 8: 7-11.
- 12.- Carter B.P., PHD: Yersinia enteritis. American J. Path. 1975, 81: 703-706.
- 13.- Cravioto A., Reyes R. E., Ortega R., Fernández G., Hernández R., Lopéz D.: Incidencia y etiología de diarrea aguda durante los dos primeros años de vida de una cohorte de niños rurales. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 1987, 44: 316-321.
- 14.- Choong H.P., PHD. y col.: A rapid Diagnosis of Campylobacter Enteritis by Direct Smear Examination. Amer. J. Clin. Path. 1983, 80: 388-390.

- 15.- Chou P.S., Dular R. and Kasatiya S.: Effect of ferrous Sulfate Sodium Metabilsulfite and Sodium Pyruvate on Survival of Campylobacter jejuni. J. Clin. Microbiol. 1983, 18: 986-987.
- 16.- Davis J.S. and Penfold J.B.: Campylobacter urinary Infection. 1979, Lancet 1:1091.
- 17.- Elharrif Z., Mégraud F. and Marchand M.A.: Susceptibility of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli to Macrolides and Related Compounds. Antimicrob Agents Chemother. 1985, 28:695-697.
- 18.- Figueroa G.T., Anaya Q.M.: Infecciones Sintomáticas y Asintomáticas por Campylobacter jejuni. Rev. Chil. Pediatr. 1985, 56: 485-489.
- 19.- Fliegelman M.R., Petrak R.M., Goodman J.L. y col.: Comparative in Vitro Activities of twelve Antimicrobiol Agents. Against Campylobacter Species. Antimicrob Agents Chemother. 1985, 27:429-430.
- 20.- Flores G.S., Vazquez A.V., moreno A.L.: Campylobacter como agente etiológico de diarrea en niños. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 1983, 40: 315-319.
- 21.- Foberg U., Fryden A., Kihlstrom E., Persson K., Weiland O. Yersinia Enterocolitica Septicemia: Clinical and Microbiological Aspects. Scand J. Infect. Dis. 1986, 18: 269-279.

- 22.- Freeman B.A.: Microbiología de Burrows: Campylobacter 22a. edición, Interamericana, México D.F. 1989 pag. 566-572.
- 23.- Fricker R.C., Alemohammad M.M. and Park Row: A Study of factors affecting the Sensitivity of the passive haemagglutination method for serotyping Campylobacter jejuni and Campylobacter coli and commendations for a more rapid procedure: Can. J. Microbiol. 1987, 33: 33-39.
- 24.- Gilchrist R.M., Grewell M.C. and Washington II A. J.: Evaluation of Media for Isolation of Campylobacter Fetus Subsp. jejuni from fecal Specimens. J. Clin. Microbiol. 1981, 14: 393-395.
- 25.- Gómez B.D., González S.N. y Pérez E.J.: Gastroenteritis. en Infectología Clínica Pediatría.- Gómez Saldaña N., Torrales Andrés., Gómez B.D. Eds. Editorial Trillas. México D.F. 1987, 3a. edición pag. 146-175.
- 26.- Goossens H., Debroeck M. and Butzler J.P.: A New Selective medium for the Isolation of Campylobacter jejuni from human faeces. Eur. J. Clin. Microbiol. 1983, 2:389-394.
- 27.- Goossens H., Henoque G., Kremp L. y col.: Nosocomial outbreak of Campylobacter jejuni Meningitis in Newborn Infants. Lancet. 1986, 12: 146-149.
- 28.- Grönberg A. and Kihlström E.: Structural variations and growth potential of Yersinia enterocolitica under different culture Conditions APMIS. 1989, 97:227-235.

- 29.- Guderian R.H., Ordoñez R., Bossano R.R.: Diarrea aguda asociada a Campylobacter y otros agentes Patógenos en Quito, Ecuador. Bol. of Sain. Panam. 1987, 102: 333-339.
- 30.- Guerrant R.L. et al : Activation of Intestinal guanylate Cyclase by heat - Stable enterotoxin of Escherichia coli: Studies of tissue Specificity, potential receptors, and Intermediates. J. Infect. Dis. 1980, 142: 220-228.
- 31.- Harris J.R. et al: High-molecular-weight plasmid correlates with Escherichia coli enteroinvasiveness. Infect. Immun: 1982, 37: 1295-1298.
- 32.- Hebert A.G., Hollis G.D., Weaver R.E. y col.: Serogroups of Campylobacter jejuni, Campylobacter coli and Campylobacter fetus. Defined by Direct Immunofluorescence. J. Clin. Microbiol. 1983, 17: 529-538.
- 33.- Hebert A.G., Hollis G.D., weaver E.R., y col.: 30 Years of Campylobacter: Biochemical characteristics and a Biotiping proposal for Campylobacter jejuni. J. Clin. Microbiol. 1982, 15: 1065-1073.
- 34.- Hernández F., Rivera P., Herrera M.L. Rodríguez R.M.: Alteraciones morfológicas inducidas por ampicilina en Campylobacter. Rev. Biol. Trop. 1986, 34: 99-104.

- 35.- Hernández F., Rivera P., Herrera M.: Campylobacter fetus ss jejuni, aeromonas hydrophila, bacterias helicoidales y coronavirus en intestino murino. Rev. Biol. Trop. 1985, 33: 143-146.
- 36.- Hiroshi F.: New Selective Agar Medium for Isolation of Virulent Yersinia enterocolitica: J. Clin. Microbiol. 1987, 25:1068-1073.
- 37.- Holland R.E.: Some Infections Causes of Diarrhea in young form Animals. Clin. Microbiol. Rev. 1990, 3:345-375.
- 38.- Jesper J. A. : In vitro susceptibility of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli isolated in Denmark to fourteen Antimicrobial Agents. Acta Path Microbiol Scand Sect B. 1987, 95: 189-192.
- 39.- Kachoris M., Ruoff K.L., Welch K. y col.: Routine Culture of Stool Specimens for Yersinia enterocolitica Is Nota Cost-Effective procedure. J. Clin. Microbiol. 1988, 26: 582-583.
- 40.- Karmali A.M. and Fleming C.P.: Campylobacter enteritis in Children. J. Pediatr. 1979, 94: 527-533.
- 41.- Karmali M.A.: Bacterial diarrhea: An Update diagnostic Med. 1985, 12: 12-19.
- 42.- Kensih G.T. and Jacewicz M.: The Pathogenesis of Shigella diarrhea VI. Toxin and antitoxin in Shigella flexneri and Shigella Sonnei. Infection in humans. J. Infect. Dis. 1977, 135: 552-556.

- 43.- Lastovica J.A., Le R.E., Congi V.R. and Penner L.J.:
Distribution of sero-biotypes of Campylobacter jejuni and
C. coli isolated from paediatric patients. J. Med.
Microbiol. 1986, 21: 1-5.
- 44.- Lennete H.E., Balows A., Hauseler J.W., Shadomy J.H.
Manual de microbiología Clínica: Campylobacter,
Morris G.K., Patton Ch.M., 4a. edición, Edit.
Panamericana Buenos aires. 1987, (2a. reimpression 1991).
pag. 383-391.
- 45.- Levine M.N., Nataro J.P., Karch H. y col.: The diarrheal
response of man to some Classical enteropathogenic.
E. coli in dependent on a plasmid encoding an
enteroadhesive factor. J. Infect. Dis. 1985, 152: 550.
- 46.- Lior H. Woodward L.D., Edgar A.J. y col.: Serotyping of
Campylobacter jejuni by slide Agglutination Based on
Health - Labile Antigenic Factors. J. Clin. Microbiol.
1982, 15: 761-768.
- 47.- Lior H., Woodward D.L., Edgar A.J. y col.: New Extended
Biotiping Schene for Campylobacter jejuni, campylobacter
coli and "Campylobacter laridis". J. Clin. Microbial.
1984, 20: 636-640.

- 48.- Luechtefeld W.N., Keller L.B., Blaser J.M. and Wang L.L.
Comparison of atmospheres of Incubation for Primary
Inoculation of Campylobacter fetus subsp jejuni from
Animal Specimens 5% Oxygen Versus Candle Jar. J. Clin.
Microbiol. 1982, 15: 53-57.
- 49.- Mawer S.L, and Smith B.A.M: Campylobacter infection of
Premature baby. Lancet 1979, 1: 1041
- 50.- Miller V.L.: Yersinia invasión Genes and their products.
Studies of single gene products provide insight into
basic requirements for pathogenesis: ASM News. 1992, 58:
26-33.
- 51.- Mingrone G.M., et al: Characteristics of Yersinia
enterocolitica isolated from children with Diarrhea in
Italy. 1987, 25: 1301-1304.
- 52.- Moeller D.D., F.A.C.P. y col.: Perforation of the Ileum
in Yersinia enterocolitica infection: Am. J.
Gastroenterol. 1985, 80: 19-20.
- 53.- Morales C.M., García P.M., Pedroza J.L. y col.:
Frecuencia de Campylobacter fetus ss jejuni y Yersinia
enterocolitica en niños con diarrea aguda. Bol. Med.
Hosp. Infant. Méx. 1984. 44: 86-89.

- 54.- Morris G.J. y col.: Y enterocolitica Isolated from two cohorts of young Children in Santiago Chile Incidence of and lack of correlation between Illness and Propose Virulence Factors. J. Clin. Microbiol. 1991, 29: 2784-2788.
- 55.- Morris K.G., Sherbeeney R.M., Kodaka H. y col.: Comparison of four Hippurate hydrolysis Methods for Identification of thermophilic Campylobacter spp. J. Clin. Microbiol. 1985, 22: 714-718.
- 56.- Mota F., et al: Training: the tool against diarrhea in México (editorial). Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 1991, 48: 317-319.
- 57.- Noble A.M., Barteluk J.R., Freeman J.H. y col.: Clinical Significance of Virulence-Related Assay of Yersinia Species. J. Clin. Microbiol. 1987, 25: 802-807.
- 58.- Patton M.Ch., Barret J.T. and Morris K.G.: Comparison of the Penner and Lior Methods. for Serotyping Campylobacter Spp. J. Clin. Microbiol. 1985, 22: 558-565.
- 59.- Penner J.L.: The Genus Campylobacter: A Decade of Progress. Clin. Microbiol. Rev. 1988, 1: 157-172.
- 60.- Peppersack F., D Huene M., Toussaint Ch. and Schoutens E: Campylobacter jejuni peritonitis Complicating continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis. J. Clin. Microbiol. 1982, 16: 739-741.

- 61.- Prado-Jimenez V., Braun J.S., Sir A.T. y col.:
Escherichia coli enterotoxigena y Campylobacter jejuni
en el síndrome diarreico agudo en lactantes chilenos Bol.
of Sanit. Panam. 1988, 104: 51-62.
- 62.- Prasanna R.D. and Mathan I.V.: Prevalence of
Campylobacter fetus subsp. jejuni in Healthy populations
in southern-India. J. Clin. Microbiol. 1982, 15: 749-751.
- 63.- Pickett C.L., Auffenberg T., Pesci E.C., Sheen V.L. and
Jusuf S.D.: Iron acquisition and Hemolysin Production by
Campylobacter jejuni Infection and Immunity. 1992, 60:
3872-3877.
- 64.- Rettig J.R.: Campylobacter Infections in human beings.
J. Pediatr. 1979, 94: 855-864.
- 65.- Reising R., Olnes S. and Eiklid K.: The cytotoxic
activity of Shigella toxin. Evidence for Catalytic
Inactivation of the 60s Ribosomal Subunit J. Biol. Chem.
1981, 256: 8739-8744.
- 66.- Richards K.L. and Douglas S.D.: Pathophysiological
effects of Vibrio Cholerae and enterotoxigenic
Escherichia coli and their exotoxins on eucaryotic cells.
Microbiol. Rev. 1978, 42: 592-613.
- 67.- Rodgers B.B. and Karn G.: Yersinia Enterocolitis. J.
Pediatr. Surgery. 1975, 10: 497-499.
- 68.- Rowe B: The role of Escherichia coli in gastroenteritis
Clin. Gastroenterol. 1979, 8: 625.

- 69.- Ruiz-Palacios, Torres J., Torres N.I., Escamilla E.,
Ruiz-Palacios and Tamayo J. Cholera-Like enterotoxin
produced by *Campylobacter jejuni*. *lancet* 1983 ii:250-53.
- 70.- Schiemann D.A.: Synthesis of a selective agar medium for
Yersinia enterocolitica. *can J. Microbiol.* 1979, 25:
1298-1304.
- 71.- Skirrow M.B.: *Campylobacter* enteritis: a "New" disease,
Br, Med. J. 1977, 2; 9-11.
- 72.- Skirrow M.B. and Benjamin J.: "1001" *Campylobacter*:
cultural Characteristics of intestinal *Campylobacter* from
man and animals *J. Hyg. Camb.* 1980, 85: 427-442.
- 73.- Smibert M.R.: The Genus *Campylobacter*. *Ann. Rev.*
Microbiol. 1978, 32: 673-709.
- 74.- Soriano G.F., Reinlein J.M. y Perez-Irezabal J.: Género
Yersinia con especial referencia a *Y. enterocolitica*.
Aportación de dos casos de Infección humana *Rev. Clin.*
Esp. 1975, 137: 205-215.
- 75.- Taylor N.D., Echevarria P. y col.: Influence of Strain
Characteristics and Immunity on the Epidemiology of
Campylobacter infections in Thailand. *J. Clin Microbiol.*
1988, 26: 863-868.
- 76.- Tokata T., Fujimoto S. and Amako K.: Isolation of
Nonchemotactic Mutans of *campylobacter jejuni* and their
Colonization of the Mouse Intestinal tract. *Infect.*
Immunit. 1992, 60: 3596-3600.

- 77.- Toma S. and Deldrick V.R: Isolation of *Yersinia enterocolitica* from swine, *J. Clin. Microbiol.* 1975, 2: 478-481.
- 78.- Valenzuela R.H., Luengas B.J., Marquet S.L. Diarreas agudas. *Manual de Pediatría, Nueva Ed. Interamericana, México D.F.* 1987, 10ª edición Pag. 281-297.
- 79.- Vidon J.D. and Delmas L.C.: Incidence of *Yersinia enterocolitica* in Raw Milk in Eastern France. *Appl. Environement Microbiol.* 1981, 41: 355-359.
- 80.- Vives-Mata L., castro B.: Diarrea por *campylobacter fetus jejuni* y otros agentes infecciosos en niños del area rural de puriscal Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 1984, 32: 137-143.
- 81.- Volk, Benjamin, Kadner, Parsoni: *Microbiología Médica: "Microorganismos entéricos y gramnegativos afines: 3a edición, Interamericana. Mc. Graw-Hill, México D.F.* 1988, pag. 403-428.
- 82.- Wong L.W., Luchtefeld W.N., Blaser J.M. and Reller B.L.: Comparison of Campy Pack II With Standard 5% oxygen and Candle Jars for Growth of *Campylobacter jejuni* from Human Feces. *J. Clin. Microbiol.* 1982, 16: 291-294.
- 83.- Zamora Ch.A., Galindo H.E., Mejía A.M., Ramírez A.M.: Infección por *Campylobacter jejuni* en niños. *Bol. Med. Hosp. Infant. Méx.* 1987, 44: 155-160.