
Universidad de Guadalajara

FACULTAD DE CIENCIAS



"DISTRIBUCION DE *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*
Y SU RELACION CON LA SALUD PUBLICA"

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

MARIA DEL CARMEN BADILLO MARTINEZ

GUADALAJARA, JALISCO. 30 JULIO 1990



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente

Número 1102/89

SRITA. MARIA DEL CARMEN BADILLO MARTINEZ
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "DISTRIBUCION DE *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*" EN AGUAS SUPERFICIALES Y SU RELACION CON LA SALUD PUBLICA" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos a usted que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis al Dr. Sergio Aguilar Benavides.



A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Septiembre 18 de 1989
EL DIRECTOR

ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS

FACULTAD DE CIENCIAS

EL SECRETARIO

M. EN C. ROBERTO MIRANDA MEDRANO

c.c.p. El Dr. Sergio Aguilar Benavides, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente de la alumna.

'mjsd

Ing. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS.
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E :

Por este conducto me permito informar a Ud. que fue revisada la tesis intitulada: "Distribución de Campylobacter jejuni y Campylobacter coli en aguas superficiales y su relación con la Salud Pública". que presenta la p_asante de Biología. María del Carmen Badillo Martínez., por lo que no tengo inconveniente en que dicha tesis se imprima, y ruego a Ud. tramita ante --- quien corresponde, el exámen respectivo.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para reiterarle mi distinguida consideración.

A T E N T A M E N T E
Guadalajara, jal., 5 de Julio de 1990.



Dr. Sergio Aguilar Benavides

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Microbiología Sanitaria de la Facultad de Ciencias Químicas, UdeG, como parte del proyecto 88 MB 2007 01 2075 - financiado por la Universidad de Guadalajara, bajo la responsabilidad del Q.F.B. Alejandro Castillo Ayala.

A t :
que de alguna manera
haz confiado en mí.

Distribución de Campylobacter jejuni y Campylobacter coli
en aguas superficiales y su relación con la Salud Pública.

INDICE

Introducción	1
Objetivos e Hipótesis	9
Materiales y Métodos	10
Resultados y Discusión	35
Conclusiones	59
Resumen	61
Bibliografía	63

INTRODUCCION

En México y en varios países del mundo las enfermedades gastrointestinales constituyen la causa más frecuente de enfermedad y muerte, afectando principalmente a niños y ancianos (2,3,13). Estas enfermedades son la segunda causa de muerte en el primer año de vida y la primera en el grupo de 1 a 4 años de edad (33).

Una variedad de agentes patógenos, tanto bacterianos como virales y parasitarios son la causa de estos padecimientos, y la mayor parte de estos, son transmitidos por el agua o los alimentos. En 1984, el Instituto Mexicano del Seguro Social reportó 3 539 105 casos de enfermedades intestinales - lo que da una relación de 13 633.2/100 000 derechohabientes. En dos estudios hechos en Tailandia se reportó una cifra de mortalidad por enfermedades diarreicas de 1.5/1 000 (21).

Uno de los principales agentes bacterianos causantes de gastroenteritis, es Campylobacter jejuni. Este patógeno ha sido reportado como el principal microorganismo aislado de las heces de enfermos de diarrea en casi todo el mundo (49,32,27,36,21, 4), causando entre el 3 y el 30% de los casos de gastroenteritis en diversos países, tanto industrializados como en vías de desarrollo, como se observa en la Tabla 1.

Hasta hace unos años al Campylobacter spp. sólo se le reconocía como agente casual de enfermedades de tipo veterinario tan importantes como abortos en vacas y ovejas, causando disenteria en perros, gatos, aves de corral, monos, cerdos, roedores etc. En 1980 se reportó un importante brote de aborto ovino en México (35). Pocas veces era relacionado este género con enfermedades en el hombre.

En 1947 se reportó un Vibrio microaerófilo aislado de la sangre de -- tres mujeres embarazadas (12). A partir de esta fecha el género Vibrio ---- empieza a adquirir mayor atención por parte de los investigadores(12), pero es en 1977 tras un reporte por Skirrow que se reconoce a una especie, C. je juni en la importancia para la salud pública como agente etiológico de gastroenteritis (45).

Actualmente en todo el mundo se reconoce al Campylobacter jejuni como uno de los principales agentes etiológicos de enfermedades gastrointestinales. Su aislamiento es por lo menos tan frecuente como el de patógenos clásicos como Salmonella, Shigella, E. coli y G. lamblia, y se sitúa dentro de los tres primeros lugares de frecuencia de aislamiento a partir de heces de enfermos de diarrea (48).

Campylobacter es una bacteria gram-negativa, su tamaño oscila entre 0.2 a 0.8 μ de ancho por 1.5 a 5 μ de largo, oxidasa y catalasa positiva con una morfología de vibrio y una movilidad a manera de espiral como sacacorchos. Es microaerófilo y crece mejor en una atmósfera que contenga 5% O₂ y 10% CO₂. La atmósfera más común para su incubación es 5% O₂, 10% CO₂ y 85% N₂.

Existen discrepancias en cuanto a la clasificación del género Campylobacter. Generalmente se reconoce el esquema adaptado por Blaser (6), que incluye 5 especies: C. fetus, C. jejuni, C. coli, C. fecalis y C. sputorum. C. fetus se divide en dos subespecies: C. fetus subs. fetus y C. fetus subs. venerealis, y C. sputorum en las subespecies sputorum, bubulus y mucosalis; sin embargo actualmente se reconocen 11 especies. El género se divide en -- dos grupos con bases en la producción de catalasa, según se muestra en la -- Tabla 2. En el grupo de especies catalasa positiva, se ubican aquellos patógenos para el humano, y son las especies C. jejuni, C. coli y C. laridis,--

las que adquieren importancia como enteropatógenas. Estas tres especies característicamente son termófilas; así, existe un grupo de especies termófilas que con frecuencia se maneja como una sola; Campylobacter jejuni.

Las características de este patógeno se presentan en la Tabla 3.

Estudios epidemiológicos hechos en Inglaterra y los Estados Unidos indican que la especie predominante en los casos de enteritis por Campylobacter es Campylobacter jejuni (37). sin embargo, las técnicas de análisis -- permiten el aislamiento de C. jejuni y Campylobacter coli, por lo que se investiga a este grupo y no solamente a C. jejuni.

La transmisión del Campylobacter se presenta por la vía fecal-oral, y a través de alimentos y agua contaminada (9, 20, 6,41, 29, 33). De estos, - el agua es el vehículo que presenta brotes de enteritis por Campylobacter - con mayor número de casos. Blaser y col. (7) reportaron una lista de brotes ocurridos en los Estados Unidos entre 1978 y 1981, en los que el agua ocasionó más del 90% de los casos de todos los brotes, y ocupó el segundo lugar de importancia como agente transmisor del patógeno.

En 1978 se reportaron 32 brotes con un total de 11 435 casos de enfermedades en los cuales el agua actúa como agente transmisor de la enfermedad, y en uno de ellos Campylobacter jejuni como agente causal de la enfermedad. Esta ocurrió en Vermont. La fuente de infección fue el agua de un pozo, la cual se encontraba clorada, pero recibía aporte de un pozo de emergencia cuya agua no estaba tratada con cloro (20,41,26).

En octubre de 1980 en Suiza se presentó otro brote por el consumo de agua que afectó a 2 000 personas. En este brote Campylobacter jejuni fué -- aislado de hisopos rectales de 221 (84%) de 263 cultivos (41).

Debido a que C. jejuni es un microorganismo termófilo y microaerófilo no puede desarrollarse en ambientes tales como alimentos, aún a temperatura

ambiente, o en aguas superficiales, que suelen tener una temperatura cercana a 20° y están constantemente siendo aireadas. La tendencia del patógeno es a sobrevivir cuando está fuera del intestino. Así, se espera que si C. jejuni se encuentra presente en esas aguas, esté en un proceso de inactivación y por lo tanto en número bajo. La principal fuente de contaminación de las aguas superficiales puede ser el contenido intestinal de algunos animales.

Dado que C. jejuni y C. coli son alojados en el intestino de un gran número de aves y mamíferos, domésticos y silvestres, los cuales defecan al aire libre. así como también las excretas humanas, pueden llegar a contaminar aguas superficiales empleadas por el hombre para riego o consumo, como presas, lagos, ríos etc.

Por lo tanto, es necesario contar con técnicas analíticas de alta sensibilidad para la recuperación de C. jejuni de estos ambientes.

Algunas técnicas se han evaluado con leche cruda, con sensibilidad -- que va desde < 1 a 1 célula/mL (19,34).

El-Sherbeeney y col. (22) evaluaron diferentes torundas de gasa para el muestreo de agua. Estas incluyen la torunda de Moore (38) y la de Spira (47). Diseñadas originalmente para recuperar Salmonella y V. cholerae respectivamente, de aguas de desecho o superficiales.

Wells y col (50) modificaron la técnica de Moore, para adaptarla al muestreo de leche, en la investigación de Salmonella, haciendo circular la torunda dentro de un recipiente con leche cruda. Otros estudios con ese método indican que es posible recuperar hasta 8 cél/L de leche y de licuado de plátano (23).

El método de Spira presenta una sensibilidad de 33 cél/L. Este método fué creado por Spira para la recuperación de Vibrio cholerae a partir de a-

guas superficiales contaminadas (26).

Estas técnicas son sencillas y económicas y podrían utilizarse en la recuperación de Campylobacter.

En el presente trabajo se estudió la eficiencia de diferentes métodos de muestreo con torunda de gasa para la recuperación de Campylobacter jejuni en aguas superficiales, y la distribución de este patógeno en aguas de arroyos, ríos, lagos, lagunas y presas. Por otra parte se estudió la distribución de Campylobacter jejuni/coli en el contenido intestinal de pollo y en heces de enfermos de diarrea, intentando comparar la distribución de especies en esos tres ambientes.

Tabla 1

Aislamiento de Campylobacter respecto a otros patógenos en diferentes países.

Patógeno	% de coprocultivos positivos para cada patógeno en:						
	México Puebla	D.F.	EUA	Canadá	Inglaterra	Italia	Tailandia
<u>Campylobacter</u>	3.3	16.5	4.6	4.3	13.9	13.0	13.3
<u>Salmonella</u>	3.2	6.2	2.3	5.1	4.3	10.0	12.3
<u>Shigella</u>	2.9	0.8	1.0	1.4	3.9	*	12.6
<u>E. coli</u> enteropatógena	9.8	15.4	-	-	-	-	9.1
<u>Yersinia enterocolitica</u>	-	-	-	2.8	-	-	-
<u>Aeromonas</u>	-	-	-	-	-	1.0	1.9
<u>Plesiomonas</u>	-	-	-	-	-	2.0	2.5
<u>Vibrio parahaemolyticus</u>	-	-	-	-	-	-	0.2
Rotavirus	-	-	-	-	-	-	19.7
Referencia	11	4	48	48	48	18	21

* No citada en la referencia consultada.

Tabla 2

Especies que componen el género Campylobacter

Catalasa positiva

Catalasa negativa

C. fetus subsp. fetus *

C. sputorum subsp. sputorum

C. fetus subsp. venerealis

C. sputorum subsp. bubulus

C. jejuni *

C. sputorum subsp. mucosalis **

C. coli *

C. concisus

C. laridis *

C. faecalis

C. cinaedi *

C. fenelliae *

C. upsaliensis *

C. pylori *

C. hyointestinalis *

* Patógenos para el humano

** Patógenos para animales

Fuente: Adaptada de: Karmeli, M.A. y Skirrow, M.B. 1984. Cap. 1 en: "Campylobacter infection in Man and Animals". J.P. Butzler. Ed. CRC press. Boca Raton, Fla.

Tabla 3

Características más importantes del grupo Campylobacter termófilo.

	Crecimiento				Acido Nalidíxico	Cefalotina	Crec. TTC	Hidrólisis del Hipurato
	25°	30.5°	35°	42°				
<u>C. jejuni</u>	-	-	+	+	S	R	+	+
<u>C. coli</u>	-	+	+	+	S	R	+	-
<u>C. laridis</u>	-	+	+	+	R	R	-	-

R Resistente.

S Sensible.

TTC Cloruro trifeniltetrazolium.

Fuente: Adaptada de: Karmeli, M.A. y Skirrow, M.B. 1984. Cap. 1 en: "Campylobacter infection in Man and Animals"

J.P. Butzler. Ed. CRC Press. Boca Raton, Fla.

OBJETIVOS

- 1.- Seleccionar una técnica sencilla y económica para la recuperación de --
Campylobacter jejuni / coli en agua.
- 2.- Determinar la incidencia de C. jejuni / coli en aguas de Arroyos, Lagos
- Lagunas, Presas y Ríos.
- 3.- Identificar los biotipos de Campylobacter aislados de esas aguas y de -
enfermos de diarrea.
- 4.- Establecer una relación entre los biotipos aislados de aguas superficial
les y de casos clínicos.

HIPOTESIS

Dado que Campylobacter jejuni y Campylobacter coli son alojados en el intestino de un gran número de aves y mamíferos, domésticos y silvestres, y que las excretas de estos animales, así como las humanas, pueden llegar al agua con relativa facilidad, las aguas superficiales son un ambiente con un alto grado de contaminación por estos patógenos. Esto las convierte en una fuente importante de infecciones en el humano.

MATERIALES Y METODOS

MATERIAL

- Aguja del No. 15.
- Asa de nicromo de 4 mm de diámetro.
- Asa de platino.
- Balanza analítica Metter H 10 cap. 160 g.
- Balanza granataria Ohaus cap. 2 610 g.
- Baño maría 37⁰ - 45⁰ J.M. Ortíz.
- Baño maría de circulación a 43⁰ Precision.
- Bolsas de plástico de 35 x 25 y 25 x 17.5 cm.
- Bomba de vacío Millipore.
- Cajas de petri estériles 100 x 15
- Cámara para microaerobiosis (frasco de vidrio de boca ancha, tapón de rosca y válvula para cambio de atmósfera).
- Campanas de fermentación.
- Contador de colonias Quebec.
- Cubre objetos 22 x 22 mm.
- Dosificador automático Brewer con adaptación para muestreo con torunda.
- Embudo.
- Filtro de membrana millipore 45
- Flujo laminar
- Frascos de PVC con capacidad de 450 g.
- Frascos de vidrio con cap. para 1 200, 500 y 100 mL.
- Gasa de algodón.
- Gradillas metálicas con cap. para 72 y 60 tubos.

- Hielo.
- Hielera.
- Incubadora de 20⁰, 37⁰ y 42⁰ Felisa.
- Jeringa de 10 mL.
- Matraz Quitazato de 500 mL.
- Mechero Bunsen y Fisher.
- Mezcla de gases con concentración de 5% O₂, 10% CO₂ y 85% N₂.
- Microcopio binocular Zwiiftt.
- Papel filtro.
- Perlas de vidrio.
- Pinzas estériles.
- Pipetas graduadas de 0.1, 1, 2, 5, 10 y 25 mL estériles.
- Porta objetos de 26 x 76 mM.
- Potenciómetro Conductronic 10.
- Probetas de 100, 250, 500 y 1 000 mL.
- Tapas horadadas.
- Tijeras.
- Tubos de 13 x 100, 16 x 150 y 16 x 175 con tapón de rosca.
- Varillas de vidrio para extensión por superficie.
- Vortex Genie 2 Scientific Industries.

SOLUCIONES Y REACTIVOS

- Alcohol para Gram.

Alcohol absoluto	95 mL.
Agua destilada	5 mL.

- Mezcla de antibióticos de Blaser (para CampyBAP).

a).- Solución de Anfotericina B.

De un frasco con Anfotericina B con una potencia de 750_µg/mL. - pesar 0.27 mg y disolver en 10 mL de agua destilada estéril. De esa solución adicionar 0.1 mL (0.0027 mg) a cada 100 mL de medio.

b).- Solución de Cefalotina.

Se pesaron 15 mg de Cefalotina y se disolvieron en 10 mL de agua destilada estéril. De esa solución se adicionaron 1 mL (1.5 mg) a cada 100 mL de medio.

c).- Solución de Polimixina B.

De un frasco de Polimixina B Sulfato con potencia de 8 140 UI - mg pesar 0.031 g (250 000 UI) y disolver en 10 mL de agua destilada estéril. De esa solución pasar 0.01 mL (250 UI) a cada 100 mL de medio.

d).- Solución de Trimetoprim.

Pesar 5 mg de Trimetoprim y disolver en 1 mL de NaOH 1N estéril, aforar a 10 mL con agua destilada estéril. De esa solución pasar 1 mL a cada 100 mL de medio.

e).- Solución de Vancomicina.

Pesar 10 mg de Vancomicina y diluir en 10 mL de agua destilada estéril. De esa solución adicionar 1 mL (1 mg) a 100 mL de medio.

Concentración final de cada antibiótico en el medio.

Anfotericina B	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
Cefalotina	15 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
Polimixina B	2.5 UI/mL.
Trimetoprim	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
Vancomicina	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Nota: En algunos casos se sustituyó Anfotericina B por Cicloheximida a una concentración de 50 μg 100 mL.

- Mezcla de antibióticos de Butzler.

a).- Solución de Bacitracina.

Pesar 373 mg de Bacitracina Zinc con una potencia de 67 UI mg - (25 000 UI). Disolver en 1 mL de NaOH 1N estéril y ajustar a 10 mL con agua destilada estéril. De esa solución adicionar 1 mL a cada 100 mL de medio.

b).- Solución de Cefalotina.

Se pesaron 15 mg de Cefalotina y se disolvieron en 10 mL de agua destilada estéril. De esa solución se adicionaron 1 mL a cada 100 mL de medio.

c).- Solución de Cicloheximida.

Pesar 50 mg de Cicloheximida y disolver en 10 mL de agua destilada estéril. De esa solución adicionar 1 mL a cada 100 mL de medio.

d).- Solución de Colistina.

De un frasco con Colistina a una potencia de 66.6 mg equivalente a 2 000 000 UI, pesar 3.3 mg y disolver en 10 mL de agua destilada estéril. De esa solución adicionar 0.1 mL (1 000 UI) a ca

da 100 mL de medio.

e).- Solución de Novobiocina.

Pesar 6 mg de Novobiocina con una potencia de 835 μ g/mg, y disolver en 10 mL de agua destilada estéril. De esa solución adicionar 1 mL (0.6 mg) a cada 100 mL de medio.

Concentración final de cada antibiótico en el medio:

Bacitracina	25 UI/mL.
Cefalotina	15 μ g/mL.
Cicloheximida	50 μ g/mL.
Colistina	10 UI/mL.
Novobiocina	6 μ g/mL.

- Mezcla de antibióticos de Preston.

a).- Solución de Cicloheximida.

Pesar 100 mg de Cicloheximida y disolver en 10 mL de agua destilada estéril. De esa solución adicionar 1 mL a cada 100 mL de medio.

b).- Solución de Polimixina B.

De un frasco de Polimixina B Sulfato con potencia de 8 140 UI/-mg pesar 0.0614 g y disolver en 10 mL de agua destilada estéril. De esa solución adicionar 0.01 mL a cada 100 mL de medio.

c).- Solución de Rifampicina.

De un frasco con Rifampicina con una potencia de 1.03 mg/g. Pesar 0.0103 g y disolver en 10 mL de agua destilada estéril. De esa solución adicionar 1 mL a cada 100 mL de medio.

d).- Solución de Trimetoprim.

Pesar 10 mg de Trimetoprim y disolver en 1 mL de NaOH 1N estéril.

ril, aforar a 10 mL con agua destilada estéril. De esa solución adicionar 1 mL a cada 100 mL de medio.

Concentración final de cada antibiótico en el medio:

Cicloheximida	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
Polimixina B	5 UI/mL.
Rifampicina	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
Trimetoprim	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

- Mezcla de antibióticos de Skirrow.

a).- Solución de Polimixina B.

De un frasco con Polimixina B Sulfato con potencia de 8 140 U/ mg pesar 0.031 μg (250 000 UI) y disolver en 10 mL de agua destilada estéril. De esa solución pasar 0.01 mL (250 UI) a cada 100 mL de medio.

b).- Solución de Trimetoprim.

Pesar 5 mg de Trimetoprim y disolver en 1 mL de NaOH 1N estéril, aforar a 10 mL con agua destilada estéril. De esa solución adicionar 1 mL a cada 100 mL de medio.

c).- Solución de Vancomicina.

Pesar 10 mg de Vancomicina y diluir en 10 mL de agua destilada estéril. De esa solución adicionar 1 mL (1 mg) a 100 mL de medio.

Concentración final de cada antibiótico en el medio:

Polimixina B	2.5 UI/mL.
Trimetoprim	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
Vancomicina	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

- Peróxido de Hidrógeno a 30 volúmenes.

- Reactivo para Oxidasa.

Clorhidrato de p- difenilendiamina 1 g.
Agua destilada 100 mL.

- Solución de Acetato de Plomo.

Acetato de Plomo 1 g.
Agua destilada estéril 100 mL.
Disolver y esterilizar por filtración.

- Solución de Acido Nalidíxico.

Disolver 3 mg de ácido nalidíxico en 1 mL de NaOH 1N estéril y aforar a 10 mL con agua destilada estéril.

- Solución de FBP para aerotolerancia.

Sulfato ferroso 0.25 g.
Piruvato de Sodio 0.25 g.
Meta-bisulfito de Sodio 0.25 g.

Disolver las tres sales en 10 mL de agua destilada y esterilizar -- por filtración. Adicionar 1 mL de esta solución a cada 100 mL de medio.

- Solución de Hipurato de Sodio.

Hipurato de Sodio 1 g.
Agua destilada 100 mL.

- Solución de Lugol para Gram.

Yodo 0.33 g.

Yoduro de Potasio	0.66 g.
Agua destilada	100 mL.

- Solución de Ninhidrina.

Ninhidrina	3.5 g.
Butanol	50 mL.
Acetona	50 mL.

Mezclar el butanol y la acetona. Disolver la ninhidrina en la mezcla.

COLORANTES

- Cristal Violeta para Gram.

Cristal Violeta	20 mg.
Alcohol etílico al 95%	20 mL.
Oxalato de Amonio	0.8 g.
Agua destilada	80 mL.

Disolver el cristal violeta en el alcohol etílico, mezclar con una solución que contenga 0.8 g de oxalato de amonio en 80 mL de agua -- destilada. Dejar reposar 24 hrs. y filtrar por papel.

- Fuscina fenicada.

Solución A:

Fuscina básica (90% de contenido)	0.3 g.
Alcohol etílico al 95%	10 mL.

Solución B:

Fenol	5 g.
-------	-------	------

Agua destilada 95 mL.

Mezclar soluciones A y B.

MEZCLA DE GASES

Mezcla comercial con 5% de O_2 , 10% de CO_2 y 85% de N_2 .

La concentración de los diferentes gases fueron garantizados por el fabricante mediante certificado de análisis.

SANGRE

Sangre de caballo desfibrinada obtenida por punción venosa de la yugular de caballos descerebrados por choque eléctrico antes de su matanza en el rastro. Para colectarla se utilizó un matraz con perlas de vidrio y tapón de hule con el mismo material conectado a aguja -- del No. 15.

Este equipo fue esterilizado a 15 libras durante 15 minutos dentro de una doble envoltura con papel de estraza.

MEDIOS DE CULTIVO

- | | |
|----------------------------------|-------|
| - Agar Bacteriológico | Abac. |
| - Agar Brucella | AB |
| - Agar de hierro y triple azúcar | TSI |
| - Agar para método estandar | CE |
| - Caldo Brucella | CB |

- Caldo Escherichia coli EC
- Caldo Lactosado CL

Excepto el caldo EC, los medios de cultivo fueron de la marca Bioxon y se prepararon de acuerdo a las indicaciones del fabricante, ajustando el pH con potenciómetro en los casos que se requirió. El caldo EC fue preparado en el laboratorio a partir de sus ingredientes de acuerdo con la fórmula propuesta en la referencia (25)

El caldo Brucella y agar Brucella sirvieron como base para preparar caldo y agar selectivos adicionando las mezclas de antibióticos de Skirrow, Blaser, Butzler y Preston.

Los caldos selectivos se prepararon con caldo Brucella al cual se le adicionó 1 mL de solución de FBP para aerotolerancia, de tal manera que cada sal quedara a una concentración de 0.025%. Posteriormente se le agregó la mezcla de antibióticos seleccionada.

Los medios de aislamiento selectivos se prepararon a partir de agar Brucella. Este medio estéril, fue fundido y acondicionado a una temperatura de 45^o en baño maría. Posteriormente se le agregó solución de FBP para una concentración final de cada sal de 0.025% y 7% de sangre de caballo desfibrinada y lisada. A esta base se le agregaron diferentes mezclas de antibióticos según el medio deseado. Los medios empleados incluyen las mezclas de Blaser (CampyBAP) y de Butzler (agar Butzler).

METODOLOGIA

El estudio se dividió en dos partes: en la primera se evaluó la eficiencia de diferentes métodos de muestreo con torundas de gasa en la recuperación de Campylobacter jejuni en aguas superficiales y agua potable.

Los métodos probados fueron el de Wells y col. (50) en el cual se hace circular una torunda de Moore (38) dentro de frascos con 500 mL a 1 L - del líquido analizado, y el de Spira, el cual consiste en hacer fluir el líquido muestreado a través de una gasa contenida en un frasco. En ambos casos las torundas después de muestrearse se transfirieron a caldos de enriquecimiento de donde se aisló en placas de agar selectivo.

La segunda parte incluyó el estudio de la distribución de Campylobacter en aguas de arroyos, ríos, lagos, lagunas, de una presa y aguas de deshecho, así como en heces de enfermos de diarrea y en el contenido intestinal de pollo.

En el análisis del agua el muestreo fue hecho con torundas de Moore y de Spira, las cuales se enriquecieron en caldos selectivos, seguido del aislamiento en placas de agar selectivo para Campylobacter. El análisis de heces humanas y de contenido intestinal de pollo fue hecho mediante siembra - directa en placas de agar selectivo.

PRIMERA PARTE:

Evaluación de métodos de muestreo con torundas de gasa en la recuperación de C. jejuni en agua.

PREPARACION DE LAS TORUNDAS

Torunda de Moore: (38)

Esta torunda consiste en una porción de gasa de algodón de 30 x 35 cm, la cual en doblada 5 veces a lo largo y 4 a lo ancho, para obtener una torunda aproximada de 6 x 5 cm. Las torundas fueron sujetas con hilasa de manera que el amarre divida la torunda en cuatro partes envueltas en papel de estraza (Figura 1) y autoclaveadas a 15 lbs durante 20 min. Una vez estériles, fueron puestas en bolsa de plástico nueva hasta uso.

Torunda de Spira: (47)

El sistema de Spira consiste en un frasco de plástico de los usados como envase de medios de cultivo con capacidad para 450 g al cual se le hizo una perforación en la base de 2 cm de diámetro. Dentro de este envase se coloca gasa suficiente (0.5 x 3 m), para formar un paquete firme pero comprimible hasta aproximadamente dos tercios del volumen original. La gasa se distribuye dentro del envase en capas cuidando especialmente que no se enrolle dentro del frasco lo que formaría canales y permitiría que el agua pasara libremente sin filtrarse a través de la gasa. Tanto la boca del frasco como la perforación fueron protegidos con papel aluminio y envueltos con papel de estraza. Figura 2. Las torundas así preparadas fueron autoclaveadas a 15 lbs durante 20 min.

MICROORGANISMOS DE PRUEBA:

Los microorganismos empleados en este estudio fueron cepas de C. jejuni obtenidas en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia de Enfermedades de la Secretaría de Salud INORE y en el Laboratorio Nacional de Salud Pública. La proporcionada por el INDRE corresponde al serotipo Penner 3. Así, nos referiremos a esta cepa como P 3, y a la obtenida en el Laborato--

rio Nacional de Salud Pública, como IP 383. Estas cepas fueron conservadas en refrigeración en medio semisólido para Brucella resemebrándose cada semana. Previo a su empleo, fueron transferidas a caldo Brucella e incubadas a 42° por 48 h dentro de una cámara con atmósfera microaerófila consistente en una mezcla comercial (Linde Division, Union Carbide) compuesta por 5% O₂, 10% CO₂ y 85% N₂.

EVALUACION DE METODOS

1.- Torunda de Moore: (38)

Diluciones seleccionadas del cultivo de las cepas de Campylobacter jejuni fueron inoculadas en frascos de boca ancha con capacidad para 700 mL - conteniendo 500 mL de agua, de manera que cada frasco tuviera una cantidad 10 veces menor que el anterior.

Las torundas de Moore fueron sujetas a un soporte el cual estaba unido al aparato dosificador Brewer. Figura 3, se hicieron circular por separado dentro de cada frasco, durante 10 min. con el rotor del dosificador a 80 rpm. De esta manera la torunda circuló, dentro del agua inoculada, muestreando según el método de Wells y col. (50).

Con este método se hicieron las siguientes evaluaciones:

1.1.- Capacidad de la torunda de Moore para recuperar C. jejuni a partir de aguas de alta y baja turbiedad.

La cepa IP 383 se inoculó en frascos que contenían 500 mL de solución de peptona (1%) estéril y en otros conteniendo agua del canal de aguas negras estéril y no estéril. De cada variante (solución de peptona y agua residual estéril y no estéril) se dispusieron frascos duplicados. Un duplicado se inoculó con 100 y 1 000 células en el volumen total (500 mL) y el o--

tro se inoculó con 10 000 células. En cada frasco inoculado se hizo circular durante 10 min una torunda según el método de Wells y col. Posteriormente la torunda se transfirió a frascos de caldo Blaser en el caso de solución de peptona y caldo Butzler para aguas negras. Los frascos tenían en la tapa una horadación tapada con gasa para permitir el flujo de gases durante el cambio de atmósfera. Estos caldos con la torunda fueron incubados a 42° durante 48 horas en atmósfera microaerófila antes de transferir tres asadas a placas de agar Brucella cuando se trabajó con solución de peptona y en agar Blaser con aguas negras.

Las placas se incubaron en las mismas condiciones descritas y las colonias sospechosas de ser Campylobacter se confirmaron mediante las pruebas de reacción al gram, movilidad característica, morfología de vibrio, catalasa y oxidasa.

1.2.- Sensibilidad del método para detectar células de Campylobacter jejuni.

Series de frascos con 500 mL de agua embotellada libre de cloro, agua embotellada esterilizada y adicionada una concentración de 2 ppm de cloro residual, así como de solución de peptona al 1% estéril, fueron inoculados, en cada caso, con aproximadamente 1, 10, 100, 1 000 y, en algunos casos, 10 000 células de C. jejuni (cepa IP 383). A cada frasco inoculado se le hizo circular la torunda mediante el procedimiento anotado, y las torundas, una vez hecho el muestreo fueron transferidas a caldo Brucella + FBP cuando se trabajó con muestras estériles y a caldo Blaser, cuando se probó agua embotellada no esterilizada y se continuó la investigación de Campylobacter jejuni en la forma descrita con anterioridad.

1.3.- Capacidad de la torunda de Moore para retener células de C. jejuni -- después de haberlas capturado.

Frascos con 500 mL de agua embotellada libre de cloro fueron inoculados por duplicado con C. jejuni (IP 383). Cuatro experimentos fueron hechos para esta evaluación. Dos con un inóculo de 100 cél/500 mL, y dos con 1 000 cél/500 mL.

En cada experimento la torunda de Moore se hizo circular por 10 min - en dos frascos inoculados. Después de este muestreo la torunda procedente - de un frasco, se analizó en la forma antes mencionada y uno del otro duplicado se hizo circular sucesivamente en 7 frascos con 500 mL de agua de garrafón estéril adicionada de FBP, 10 min en cada frasco, con el propósito - de comprobar si las células una vez capturadas, son liberadas después de lavados prolongados.

Después de estos enjuagues sucesivos, (duración total de 85 min) la torunda se analizó siguiendo en procedimiento ya descrito.

Dado que Wells y col. (50) reportaron que Salmonella no es liberada mediante este tratamiento, utilizamos una cepa de Salmonella london obtenida de nuestro laboratorio procedente de carne cruda de cerdo, para hacer un experimento control, en la misma forma descrita pero usando S. london en lugar de C. jejuni. En este caso las torundas fueron enriquecidas en caldo tetrationato verde brillante, incubadas en baño maría a 43^o durante 24 horas y el aislamiento en agar Verde brillante-Sulfa y Sulfito de bismuto.

2.- Torunda de Spira: (47)

Diluciones seleccionadas de las cepas de referencia de C. jejuni fueron inoculadas en vasos de precipitado conteniendo un litro de agua de garrafón libre de cloro.

El agua inoculada se filtró vertiéndola por el orificio realizado en la base del frasco y se dejó escurrir de 5 a 10 min antes de incorporarlas

al caldo de enriquecimiento.

De esta manera el agua fue muestreada a través de la gasa, siendo éste el método de Spira. Figura 4.

Los siguientes experimentos fueron hechos para evaluación de este método.

2.1.- Sensibilidad en la recuperación de Campylobacter en agua potable.

Vasos de precipitado que contenían un litro de agua se inocularon con diluciones de la cepa IP 383, de manera que se obtuvieran cantidades en las concentraciones finales de 1, 10 y 100 células/litro.

El contenido de cada vaso fue hecho pasar a través de la torunda de Spira, y dejándola escurrir durante 5 a 10 min cada una. Posteriormente la torunda se pasó a bolsas de plástico (25 x 35 cm), conteniendo 1 L de caldo Blaser. A la bolsa con su contenido se le evacuó el aire con bomba de vacío a no más de ½ libras de vacío y se llenó con la mezcla de gases (5% O₂, 10% CO₂ y 85% N₂), y se selló con liga de hule. Estas bolsas fueron depositadas dentro de otra bolsa, la cual se llenó también con la misma mezcla de gases. Simultáneamente se estudió la recuperación por el método de Wells y col. para comparar la eficiencia de ambos métodos. Las torundas en este método se enriquecieron en frascos con caldo Blaser, siguiendo todas el análisis descrito anteriormente.

Las bolsas y frascos fueron incubados por 48 horas a 42^o, para después transferir tres asadas a agar CampyBAP para el aislamiento de C. jejuni. Las colonias que mostraron morfología típica de Campylobacter se sometieron a las cuatro pruebas preliminares para su confirmación (gram, catalasa, oxidasa y movilidad característica).

2.2.- Capacidad de retención de células de Campylobacter.

Para esta evaluación se usaron dos cepas de Campylobacter.

En dos experimentos con la cepa IP 383, se inocularon cantidades de -100 y 1 000 células del microorganismo en un litro de agua de bebida embotellada.

Primero se hizo pasar a través de la torunda de Spira en un litro de agua de garrafón, luego el litro inoculado con Campylobacter y posteriormente ocho litros de agua sin inocular por torunda. Se dejaron escurrir 10 min y se incorporaron a bolsas de plástico con un litro de caldo Blaser, se incubaron en condiciones microaerófilas durante 24, 48 y 72 horas a 42°. Como paso siguiente se tomó tres asadas de cada bolsa de plástico, en los respectivos intervalos de tiempo, (24, 48 y 72 h). Y se aislaron en placas de agar Blaser, incubando éstos en las condiciones antes mencionadas durante 48 horas.

En un experimento hecho con la cepa P 3, con inóculo de 1 000 células se procedió de igual manera que el anterior, sólo que se enriqueció en caldo Butzler y se aisló en agar Butzler.

Las cepas probables de Campylobacter en ambos experimentos fueron confirmadas mediante las pruebas preliminares.

SEGUNDA PARTE

Distribución de Campylobacter jejuni / coli en aguas superficiales y en heces de enfermos de diarrea y contenido intestinal de pollo.

Los sitios de muestreo fueron:

- Arroyo de la Primavera.
- Arroyo de San Isidro.

- Lago de Chapala.
- Laguna de Villa Corona.
- Presa de Osorio.
- Río Juchipila.
- Río Santiago.
- Aguas de desecho.

1.- Muestreo y análisis de laboratorio.

1.1.- Las primeras 50 muestras se estudiaron comparativamente por los siguientes métodos de muestreo:

- a.- Por el procedimiento de Moore.
- b.- Por el procedimiento de Wells y col.
- c.- Por inoculación directa de 25 mL de agua en caldo de enriquecimiento.
- a.- Procedimiento de Moore (38).

En el sitio de muestreo se introdujo la torunda, procurando que ésta se encontrara bajo el flujo suave de la corriente y sin tocar el fondo, durante una hora aproximadamente. Pasado este tiempo, se sacó la torunda, y se pasó a un frasco con 50 mL de caldo Brucella + FBP, el cual fue transportado al laboratorio en hielo.

Una vez ya en el laboratorio, se procedió a cambiar la torunda a frascos de caldo Blaser.

- b.- Procedimiento de Wells y col. (50).

Se tomaron, en frascos estériles, 500 mL de agua para su análisis en el laboratorio. Estos frascos fueron transportados en hielo.

En el laboratorio, se hizo circular una torunda en dicho frasco fijada a un soporte el cual se encuentra unido a un aparato dosificador durante

10 min con aproximadamente 80 rpm. Posteriormente la torunda fue depositada en frascos con 50 mL de caldo selectivo antes mencionado.

Por separado se incluyó un frasco con 500 mL de agua como muestra control. Esto consistió en inocular 1 000 células de Campylobacter en el agua y hacer circular la torunda dentro del frasco en las mismas condiciones descritas.

c.- Inoculación directa.

25 mL de agua se inocularon en el sitio de muestreo en 25 mL de caldo de enriquecimiento pero, con doble concentración de sus componentes. Estos frascos fueron transportados ya inoculados al laboratorio en hielo.

Los caldos de enriquecimiento con las torundas y los de las muestras directas fueron colocados en baño maría a 43^o durante 10 minutos con la finalidad de obtener la temperatura idónea para su posterior incubación. Posteriormente, se incubaron los caldos durante 48 horas a 42^o en una atmósfera microaeróbica. De cada enriquecimiento se transfirió tres asadas respectivamente a placas de agar CampyBAP. Las placas inoculadas se incubaron 48 horas a 42^o en atmósfera microaeróbica. Las colonias sospechosas se sometieron a los esquemas de identificación propuestos en el manual de Métodos de la Asociación Americana de Salud Pública (41).

1.2.- Las últimas 48 muestras se estudiaron mediante el método propuesto -- por Spira y Ahmed (47).

Los 10 litros de agua muestreada se pasaron a través de esa torunda, la cual se dejó escurrir 10 min y posteriormente se transfirió al caldo de enriquecimiento el cual consistió en 70 mL de caldo Blaser con la concentración de nutrientes y suplementos necesarios para 700 mL. Como esta torunda

captura 200 mL de agua (26), el volumen posteriormente se ajustará a 700 - mL adicionando agua de la misma fuente muestreada. Los caldos con la torunda fueron incubados 48 horas a 42^o en atmósfera microaeróbica. Y de este enriquecimiento se transfirieron tres asadas a placas de agar CampyBAP.

La identificación de colonias sospechosas se realizó mediante los esquemas recomendados en el manual mencionado (41)

2.- Investigación de Campylobacter jejuni / coli en heces de enfermos de diarrea y en contenido intestinal de pollo.

2.1.- Investigación en heces humanas.

Se acudió a diferentes hospitales y clínicas de la ciudad de Guadalajara y se solicitaron muestras de heces diarreicas ya sea de las llevadas - al laboratorio para exámenes coproparasitoscópicos $\frac{y}{o}$ coprocultivo o de pacientes internos.

Los sitios de muestreo fueron;

- Clínica Yugoslavia SSA.
- Hospital General de Occidente.
- Hospital de Pediatría IMSS.
- Laboratorio de Servicio Social de la Facultad de Ciencias Químicas.
- Laboratorio Privado.
- Nuevo Hospital Civil.

Las muestras diarreicas se tomaron con hisopo estéril el cual se introdujo en el medio de transporte y de enriquecimiento, consistente en: agar Brucella semisólido + FBP y antibióticos de Blaser dentro de tubos de - 13 x 100.

Los tubos fueron transportados en hielo al laboratorio. Una vez ahí -

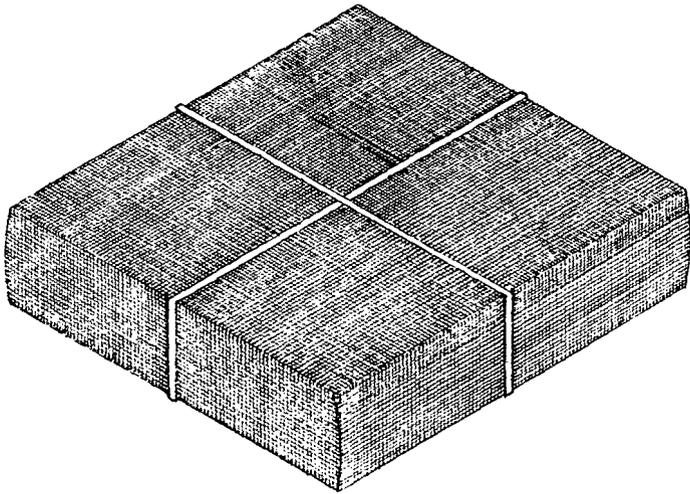
se colocaron en baño maría a 43^o durante 10 min. Luego se incubaron a 42^o - por 48 horas en microaerobiosis. Posteriormente las muestras se sembraron - en dos medios de aislamiento selectivos, incubándose estas placas a 42^o du- rante 48 horas en una atmósfera microaerófila. De cada placa se selecciona- ron colonias probables de Campylobacter y se resembraron en agar Brucella - FBP las cuales se incubaron en microaerobiosis por 24 horas a 42^o.

De estas colonias las que presentaban características típicas de ---- Campylobacter se confirmaron mediante las pruebas bioquímicas recomendadas en el manual antes mencionado.

2.2 .- Aislamiento en contenido intestinal de pollo.

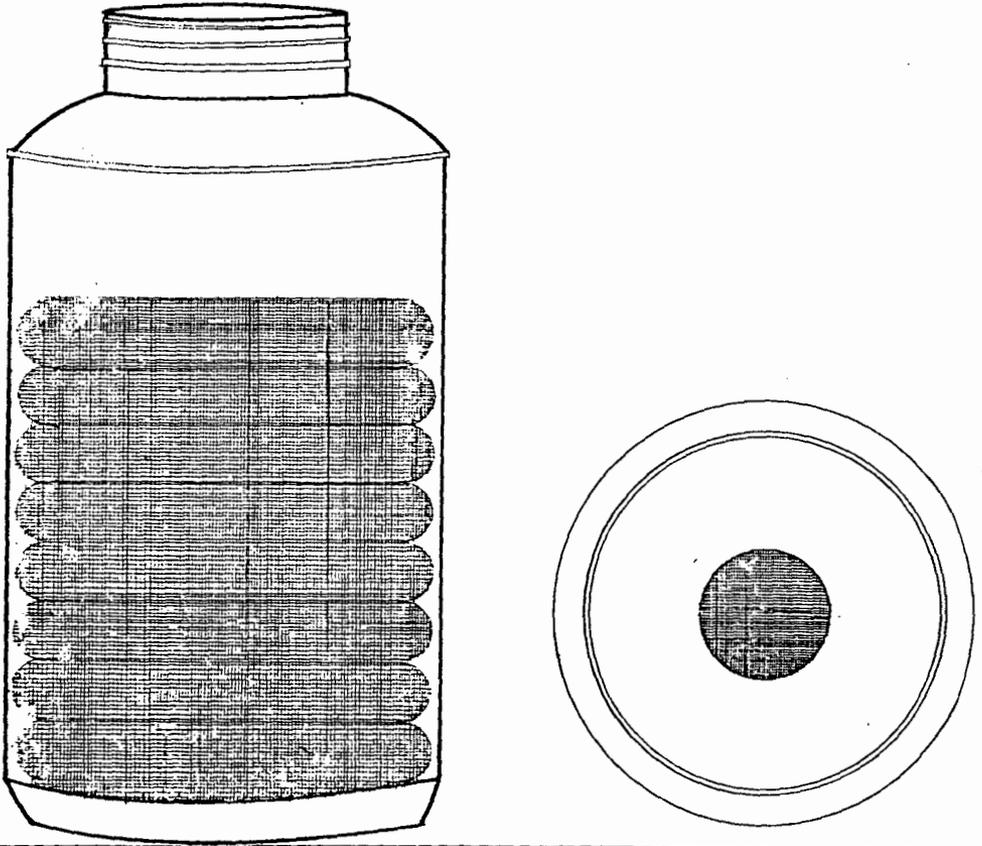
Las muestras de intestino de pollo se obtuvieron en mercados públicos de la ciudad de Guadalajara. En el laboratorio se realizó un corte transver- sal de aproximadamente 10 cm de longitud en la región rectal del tubo diges- tivo. En esa región se maceró presionando con varilla de vidrio estéril y - se tomaron tres asadas obtenidas arrastrando el asa a lo largo de la por---- ción seccionada. Estas asadas fueron sembradas por estriación directamente en placas de agar Butzler o CampyBAP. Las placas fueron incubadas a 42^o du- rante 48 horas en atmósfera microaerófila y las colonias se identificaron - mediante las pruebas bioquímicas propuestas en el manual.

Figura 1



Torunda de Moore.

Figura 2



Recipiente horadado con torunda de Spira y Ahmed.

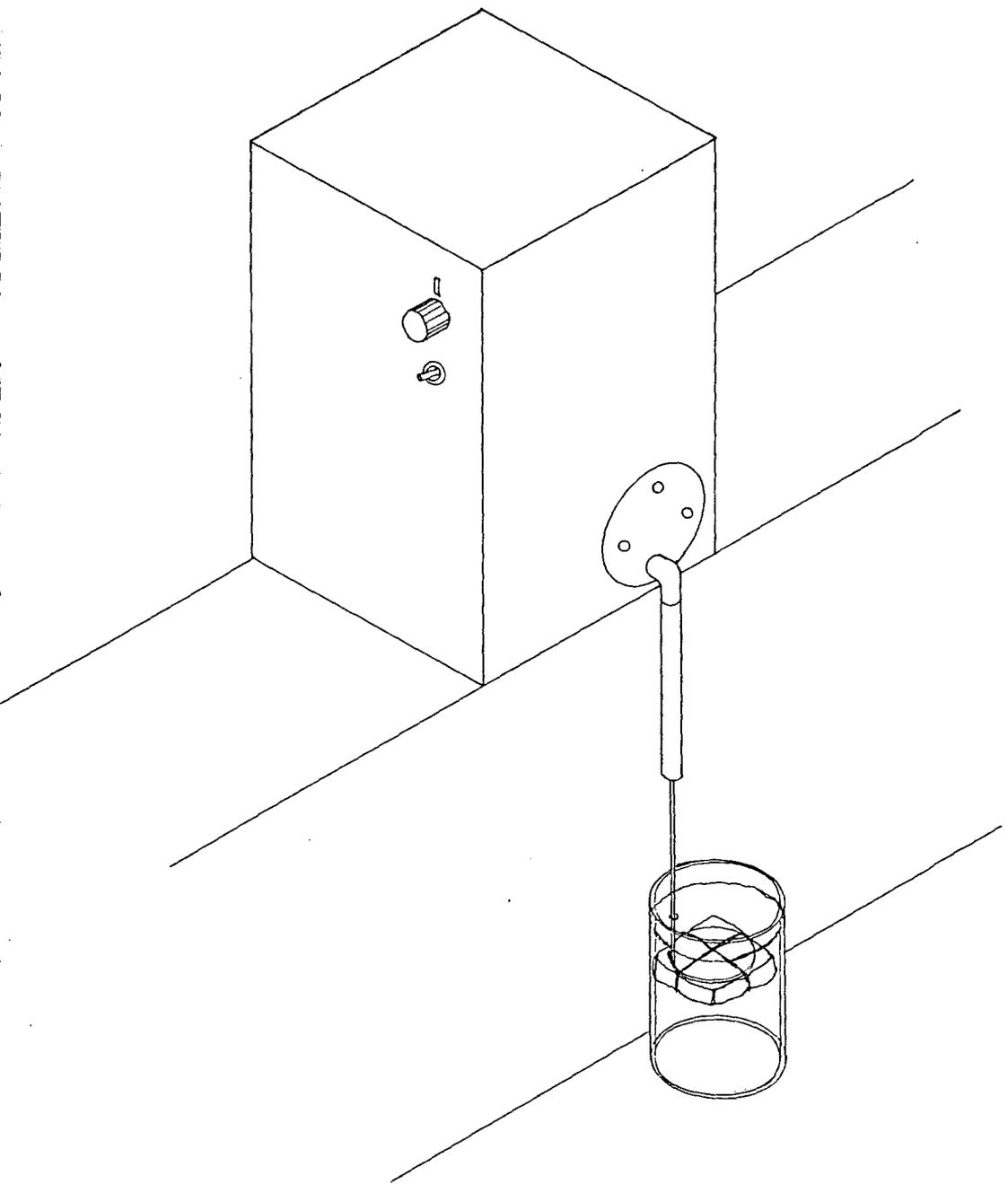
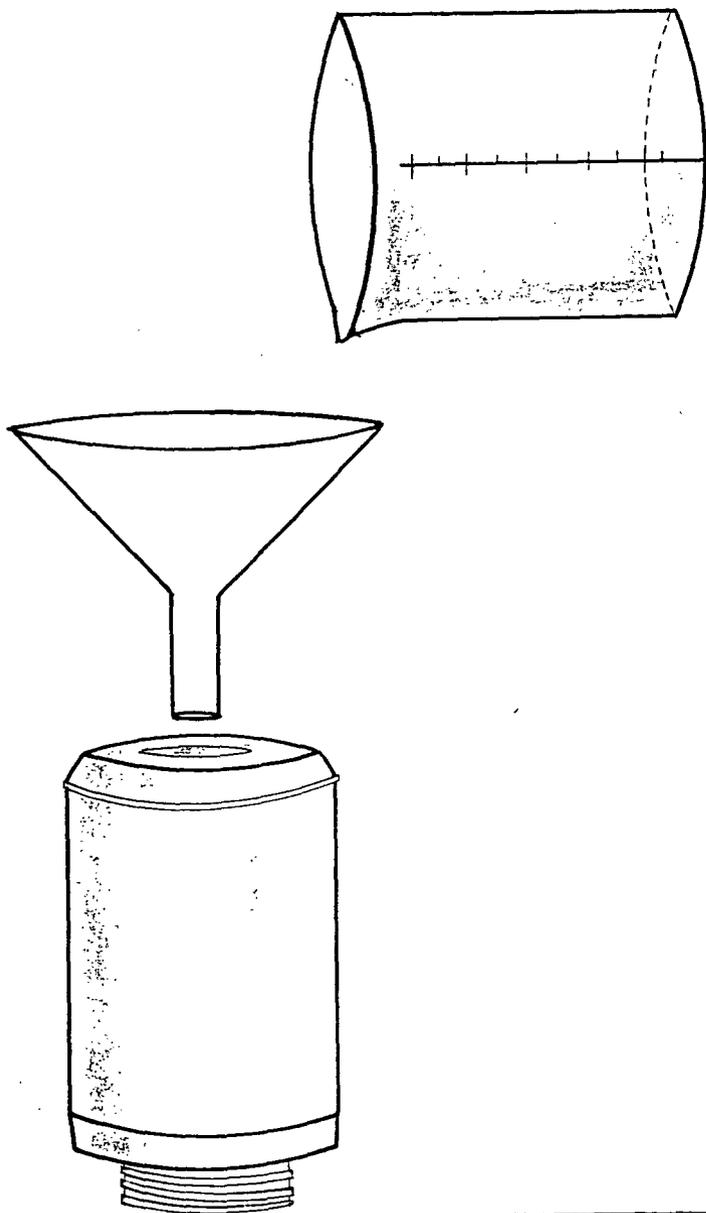


Figura 3 Torunda adaptada a dosificador automático.

Figura 4



Muestreo por el método de Spira y Ahmed

RESULTADOS Y DISCUSION

1.- Evaluación de métodos de muestreo con torunda de gasa para la recuperación de Campylobacter jejuni en agua.

Dentro de este trabajo se incluyó esta etapa, en la cual se probó la eficiencia de algunas técnicas para la investigación de Campylobacter en el agua, que posteriormente pudiéramos emplear para determinar la distribución de este patógeno en aguas superficiales. Probamos dos métodos de muestreo con torunda de gasa: El de Moore y el de Spira.

Nuestra primera evaluación consistió en determinar la capacidad de la torunda de Moore para capturar células de C. jejuni presente en aguas de alta y baja turbiedad, utilizando para el muestreo un procedimiento similar al descrito por Wells y col. (50) que consiste en hacer circular la torunda dentro de un recipiente con el agua inoculada.

La Tabla 4 muestra la recuperación de C. jejuni en aguas negras en función de la cantidad de células del patógeno inoculadas. C. jejuni no pudo recuperarse aún cuando se le inoculó en cantidades hasta de 490 000/500 mL sin embargo en las mismas aguas, inoculadas después de haberse autoclaveado, la torunda pudo detectar hasta 130 células presentes en el recipiente de agua. Eso significa que mediante el muestreo con la torunda de Moore se tiene capacidad para detectar números bajos de células en el agua, aunque la flora asociada podría interferir en su aislamiento. En aguas de baja turbiedad autoclaveadas, como fue la solución de peptona al 1% y el agua de garrafón libre de cloro, la sensibilidad aumentó, pudiendo detectar hasta + 10 células y, en una ocasión, una sola célula presente en el frasco con 500 mL de agua o solución de peptona. Esos resultados se pueden observar en la

Tabla 5. Moore (38) diseñó este método de muestreo para el aislamiento de Salmonella en aguas de drenaje. El muestreo con la torunda de Moore se ha empleado también para la investigación de Salmonella en Líbano (39) y Salmonella typhi en Chile (43), en aguas de drenajes en las ciudades de Beirut y Santiago respectivamente. Posteriormente Wells y col. (50) estudiaron la aplicabilidad de este método en el aislamiento de Salmonella a partir de leche, con una modificación que consiste en hacer circular la torunda dentro de un frasco con el líquido que se muestrea. En los reportes mencionados los resultados indican una gran capacidad de la torunda de Moore para retener células de Salmonella sin embargo la cantidad de éstas que puede detectar este método aún no se ha estudiado con detalle.

Wells y col. (50) fueron capaces de recuperar consistentemente Salmonella en leche cruda sólo cuando ésta contenía cuando menos 10 células por litro, por otra parte Fernández Escartín y col. (23) pudieron recuperar Salmonella derby en leche pasteurizada y licuado de plátano en cantidades hasta de cuatro células por litro. Así, parece ser, según nuestros resultados, que mediante el método de Wells y col. (50) es posible recuperar Campylobacter en agua con una sensibilidad muy parecida a la reportada por otros autores para el aislamiento de Salmonella en leche. Nosotros aplicamos este método también en la recuperación de C. jejuni en agua clorada, según se observa en la Tabla 6. En agua clorada (2 ppm de cloro residual) la torunda sólo pudo detectar 390 cél/500 mL mientras que en el agua libre de cloro la cantidad detectada fue 10 veces menor (39 cél/500 mL). Esto significa que eventualmente la torunda podría detectar C. jejuni aún en aguas cloradas, lo cual es importante, ya que en un brote de enteritis por Campylobacter que ocurrió en Vermont, C. jejuni fue transmitido por agua supuestamente adicionada de cloro. La ciudad se surtía de un pozo central y tenía pozos emergen

tes para casos de escasez de agua. En un caso así, se mezcló agua de un pozo emergente la cual no estaba clorada, con la del pozo central, que sí había recibido este tratamiento. Así, el cloro pudo haberse diluido. En este brote fueron afectadas 3 000 personas y, curiosamente, en el agua de los pozos involucrados no se detectaron organismos coliformes (14).

Otro aspecto importante en la evaluación de la aplicabilidad de la torunda de Moore para recuperar Campylobacter jejuni en agua, fue la capacidad de ésta para, una vez que ha capturado las células del patógeno, retenerlas aún después del flujo de grandes volúmenes de agua a través de ella. El experimento consistió en muestrear agua por el método de Wells y col. (50), y la misma torunda con que se muestreó, hacerla circular sucesivamente en siete frascos con agua estéril. Los resultados de estos experimentos pueden apreciarse con detalle en la Tabla 7. Mediante este procedimiento pudimos recuperar al patógeno en las torundas que no habían sido hechas circular en los siete frascos con agua estéril, sin embargo en aquellas que se sometieron a estos siete enjuagues solamente lo recuperamos en uno de cuatro experimentos, y fue en el que habíamos empleado el mayor inóculo (2 300 cél/500 mL). Como control utilizamos una cepa de Salmonella london, la cual sí se recuperó aún después de los siete enjuagues. El que C. jejuni no haya sido aislado en la torunda después de haberse enjuagado, es un factor que limita grandemente la aplicabilidad de la torunda de Moore en la recuperación de C. jejuni en agua, ya que esta torunda es sumergida en el agua en movimiento y las células de Campylobacter pueden ser atrapadas y posteriormente liberadas por el flujo continuo del agua a través de ella. Así, consideramos que no se debería aplicar este método a la investigación de Campylobacter en aguas superficiales, pero que se puede aplicar con una sensibilidad relativamente alta en el análisis de líquidos contenidos en un recipiente

te, según el método de Wells y col. (50). La liberación de las células se Campylobacter no deja de ser una observación interesante, ya que en un estudio similar, Wells y col. (50) recuperaron Salmonella a partir de la torunda con que se había muestreado leche cruda con 100 células por litro, después de 12 enjuagues sucesivos de 10 min. cada uno. Ellos concluyeron que una torunda podría ser suspendida en el flujo de leche cruda en una planta lechera o en un centro de recepción y que así, se podrían examinar grandes cantidades de leche con una sola torunda. Esto en el caso de Campylobacter no sería posible. La retención de células de Salmonella pero no de C. jejuni (Tabla 7) podría estar determinada por receptores moleculares del tipo de las adhesinas, o simplemente por las diferencias en el número, tamaño y distribución de los flagelos en las células de ambos géneros.

Debido a que el muestreo con la torunda de Moore podría no ser confiable en nuestro estudio decidimos probar la aplicación de la torunda de Spira y Ahmed (47). Este método fue diseñado originalmente para la investigación de Vibrio cholerae en aguas superficiales, y posteriormente El-Sherbeeny y col. (22) lo utilizaron para la investigación de Campylobacter en aguas de arroyos, en donde mostró una eficiencia sólo ligeramente inferior a la que presentaron los métodos de filtración por membrana. En nuestro caso comparamos la sensibilidad de este método con la del método de Wells y col. (50) en la recuperación de C. jejuni a partir de agua de garrafón libre de cloro. Los resultados de estos experimentos se observan en la Tabla 8. En muestras de agua con un contenido de bacterias mesofílicas aerobias de entre 110 y 36 000/mL mediante el empleo de la torunda de Spira recuperamos a C. jejuni aún con inóculos de dos a cuatro células/mL. Esta sensibilidad es 10 veces mayor que la que obtuvimos con el método de Wells y col., y fue observada sistemáticamente en todos los experimentos que realizamos. El --

Sherbeeny y col. (22) compararon la recuperación de C. jejuni mediante el empleo de métodos de filtración por membrana con el método de Spira. Estos investigadores recuperaron el C. jejuni en forma consistente sólo cuando se le inoculó en cantidades superiores a 10 células/L. nosotros fuimos capaces de recuperar a este patógeno aún en cantidades 10 veces menores. Por el método de Wells y col. estos autores no pudieron recuperar consistentemente - C. jejuni, razón por la cual no emplearon este método en un estudio posterior para determinar la distribución de este patógeno en aguas de arroyos. Sin embargo la evaluación de este último método presenta una falla importante, ya que el muestreo que ellos hicieron consistió en dejar una torunda de Moore inmersa durante toda la noche, en el agua inoculada. El error, a nuestro juicio, consistió en no haber tomado en cuenta por una parte, que la torunda de Moore se diseñó para muestrear líquidos en movimiento ya que el microorganismo es capturado por la gasa al fluir el líquido a través de ella. En el trabajo de El-Sherbeeny y col. (22), según se describe en su metodología, la torunda quedó estática en el agua. Por otra parte no consideraron la poca sobrevivencia que exhibe C. jejuni en el agua a temperatura ambiente. A 42^o, 100 células mL desaparecen totalmente en tres horas, y en seis horas a 37^o (16). En otros estudios, se ha determinado que 10⁶ células de C. jejuni mL de agua se inactivan totalmente en nueve días a 20^o y en 14 días a 4^o (A. Castillo, comunicación personal), así, la dificultad que estos autores encontraron para recuperar C. jejuni en aguas de arroyo mediante el empleo del método de Wells y col. puede deberse a causas no imputables al propio método. Nosotros ya mencionamos que muestreando con este método podemos recuperar repetidamente a este patógeno en cantidades hasta de 10 células/500 mL. La limitación más importante que nosotros observamos para el empleo de este método, consiste en que sólo se pueden muestrear volúmenes

de agua hasta de un litro, los cuales resultan demasiado pequeños para la cantidad de células de C. jejuni que se espera se encuentren en el agua en condiciones naturales. Debido a eso, y a la notoria superioridad del método de Spira y Ahmed en cuanto a su superioridad, nos inclinamos por el empleo de este último método para llevar a cabo la segunda parte de nuestro trabajo que consistió en determinar la distribución de C. jejuni en aguas de arroyos, ríos, lagos, lagunas y presas. No obstante, la torunda de Spira y Ahmed (47) puede llegar a liberar las células de C. jejuni que ya había -- capturado. En la Tabla 9 se puede apreciar cómo cantidades de 60 a 360 células capturadas por la gasa, son lavadas por el flujo continuo de agua. De esta manera, a pesar de la notoria superioridad de este método con respecto a los otros que estudiamos, encontramos esta fuente de error; sin embargo -- nos apoyamos en el reporte de El-Sherbeen y col. (22) en el que indica -- que se obtienen resultados muy similares a los obtenidos mediante filtros -- de membrana en la recuperación de C. jejuni en agua, y a los resultados de nuestra evaluación para considerar como razonablemente confiable a este método para el muestreo de aguas superficiales.

2.- Incidencia de Campylobacter en aguas superficiales.

En esta etapa se muestrearon aguas de diferentes arroyos cercanos a -- la ciudad de Guadalajara, de diferentes puntos del río Santiago y del río -- Juchipila, junto al poblado de San Cristóbal de la Barranca, Jalisco., así -- como del lago de Chapala y la laguna de Villa Corona. Además se incluyeron algunas muestras obtenidas en la presa de Osorio y del canal de aguas de de -- secho de la ciudad.

Las primeras muestras fueron analizadas comparativamente por los méto

dos de Moore y de Wells y col., y, en algunos casos, inoculación directa de 25 mL de agua en caldo selectivo. El método de Moore consistió en dejar inmersa la torunda en el agua durante una hora antes de pasarla al caldo de enriquecimiento selectivo. Los resultados de esta comparación se presentan en la Tabla 10. De 50 muestras estudiadas por cualquier método, ninguna resultó positiva. Esta falta de muestras positivas pudo deberse, en el método de Moore a la incapacidad de la torunda para retener las células que pasan a través de ella según habíamos presentado en la Tabla 7, y en el caso del método de Wells y col. y de la inoculación directa, al volumen pequeño de muestra estudiado. Por supuesto, también pudieron deberse a la ausencia de Campylobacter en el agua; pero esto no se puede saber en tanto no se utilice una técnica confiable para recuperar este patógeno. Debido a estas observaciones decidimos utilizar el método de Spira y Ahmed, basados en la evaluación presentada en la Tabla 8, sin embargo aún después de utilizar este método, el cual parece ser confiable, continuaron los resultados negativos. En la Tabla 11 se observa cómo en aguas de arroyos, ríos y lagos, de 48 --- muestras estudiadas ninguna resultó positiva. En este caso si podríamos admitir como razonable la hipótesis de que C. jejuni no se encontraba presente en las aguas muestreadas. Esta ausencia de Campylobacter puede estar influenciada por una variedad de factores. Por una parte existe la posibilidad de que la fauna que se encuentra alrededor de estos cuerpos de agua no contenga Campylobacter en su intestino, de manera que, a pesar de que sus excretas vayan a dar al agua, no por esta razón C. jejuni contamine a ésta. En este caso nuestra hipótesis inicial quedaría rechazada.

Campylobacter jejuni se ha aislado del contenido intestinal de una diversidad de animales tanto silvestres como domésticos. En Noruega, Kapperud y Rosef (30) aislaron C. jejuni / coli en el contenido intestinal del 28% -

de diferentes especies de aves silvestres, las que comúnmente arrójan sus excretas al agua. En otro estudio Rosef y col. (42) aislaron al patógeno - en el 10.6% de las heces de diversos mamíferos domésticos y silvestres. En los Estados Unidos Pacha y colaboradores (40) encontraron que las ratas almizcleras son un importante reservorio de este patógeno y que sus heces - pueden contaminar el agua. Por esta razón, Carter y col. (14) estudiaron - la distribución de C. jejuni en aguas de arroyos y su relación con grupos - bacterianos indicadores. Ellos encontraron C. jejuni en el 33% de las muestras estudiadas, y observaron una variación en la recuperación de este patógeno según la estación del año. El otoño fue la estación con más positivos. De ahí que el factor estacional pudo haber también influido en nuestros resultados, ya que la parte relevante de nuestro muestreo se llevó a cabo en los meses de Noviembre, Diciembre, Enero y Febrero. De darse una variación estacional en la distribución de Campylobacter en aguas superficiales, como lo reportado por Carter y col. (14) sería necesario sostener el muestreo - durante todo el año para ponerla de evidencia. La influencia de las épocas del año sobre la distribución de los microorganismos patógenos es importante como factor determinante en la ecología de éstos, y aún de la epidemiología de las enfermedades causadas por ellos. Speelman y Strulens (46) encontraron a Campylobacter jejuni como causante de diarrea del viajero en Tailandia, y por otra parte en nuestra ciudad parece existir una mayor frecuencia de aislamiento de C. jejuni a partir de pollo crudo durante épocas frías, siempre y cuando se acompañaran de una baja humedad ambiental (17). El aislamiento de C. jejuni en aguas superficiales es diferente según el país. Por ejemplo Knill y col. (8) lo aislaron en el 50% de aguas de ríos en Inglaterra; El-Sherbeen y col. (22) en Estados Unidos lo aislaron en el 42 % de aguas de pozos, lagos y arroyos, también en Estados Unidos lo aisla-

ron Carter y col. (14) obtuvieron una positividad del 33% en aguas de arroyos, mientras que por otra parte Crotti y col. (18), no pudieron aislar -- Campylobacter en aguas de ríos en Italia. Así, es posible encontrar algunos ambientes acuáticos en los que no se encuentre Campylobacter, a pesar de la amplia distribución de este patógeno en el medio ambiente.

También es posible que C. jejuni, habiendo contaminado el agua, muera rápidamente, y que su presencia en ella sea tan escasa que se requiera del análisis de grandes volúmenes de agua para poderlo recuperar. Esto podría ser poco probable. Aunque C. jejuni tiende a morir en el agua, en aguas de arroyo a 20° 10^6 células/mL de este patógeno se inactivan totalmente en un lapso de siete días (A. Castillo, comunicación personal). Como se ve, la -- muerte no es tan rápida como para ser el factor que determine nuestra incapacidad para recuperarlo. Por otra parte, nosotros muestreamos volúmenes de 10 litros de agua por torunda de Spira y Ahmed (47) analizada, por lo que no podemos decir que hayamos utilizado muestras de tamaño pequeño. Todo parece indicar que es perfectamente válido concluir que la presencia de C. jejuni, por lo menos en los ambientes que nosotros estudiamos, es una situación más bien rara.

2.1.- Aislamiento de Campylobacter jejuni en las heces de enfermos de diarrea y en contenido intestinal de pollo.

En el planteamiento original de las actividades que se incluían en -- nuestro trabajo habíamos contemplado una que consistía en aislar o conseguir cepas de C. jejuni provenientes de la materia fecal de personas enfermas de diarrea, con el propósito de identificar los biotipos aislados tanto

de estas fuentes como del agua, en un intento por establecer una ligazón epidemiológica entre el agua y la enteritis por Campylobacter. Como no obtuvimos ninguna cepa proveniente del agua, la identificación de biotipos de C. jejuni no se llevó a cabo y solamente nos dedicamos a identificar especies de Campylobacter en muestras de materia fecal de enfermos con diarrea obtenidas en el laboratorio clínico de los siguientes hospitales: Nuevo Hospital Civil, Hospital General de Occidente, Hospital de Pediatría del Instituto Mexicano del Seguro Social, Clínica Yugoslavia dependiente de la Secretaría de Salud, de un laboratorio privado y del laboratorio de Servicio Social de la Facultad de Ciencias Químicas. Las muestras en los laboratorios mencionados eran destinadas a exámenes coproparasitológicos y/o coprocultivo, y sólo teníamos cuidado de que éstas fueran diarreicas.

Como se aprecia en la Tabla 12, de 81 muestras analizadas de materia fecal 1 (1.2%) resultó positiva. Este hallazgo fue sorprendente, ya que en diferentes países el % de aislamiento de C. jejuni a partir de enfermos de diarrea oscila entre el 3 y el 39% (11,21,4,32,27,36). Esto puede deberse a que nosotros obteníamos muestras de la población en general independientemente de su edad, ya que la mayoría de los estudios mencionados fueron hechos con niños, que es la población más comúnmente afectada. En un estudio hecho en el Hospital de Pediatría del Instituto Mexicano del Seguro Social en Guadalajara C. jejuni fue aislado en el 15.2% de 145 pacientes enfermos de diarrea, y este patógeno fue el más frecuentemente aislado (31). En la República Federal Alemana la tasa de aislamiento fue relativamente baja para la población general (aproximadamente 3.5%), (27).

Un estudio más exhaustivo posiblemente hubiese arrojado un porcentaje mayor de recuperación: sin embargo ese trabajo por sí solo tendría las características de una investigación separada, y no era ese nuestro propósito,

sino la sola obtención de cepas de C. jejuni/coli aisladas de enfermos con diarrea en nuestra comunidad o por lo menos en nuestra región: ninguno de los laboratorios clínicos a los que acudimos estuvo en condiciones de proporcionarnos dichas cepas. En este sentido sería interesante señalar la importancia que tiene la investigación multidisciplinaria en la resolución de problemas, en este caso de Salud Pública, que afectan a nuestra comunidad, y que el conocimiento del que deriva su resolución no sale solamente del laboratorio de Microbiología Sanitaria. En el conocimiento de las vías, aún indirectas, de infección de Campylobacter al hombre hace falta en nuestro país investigación, por lo menos en el área de la Ecología Microbiana, Microbiología Sanitaria, Microbiología Médica y Salud Pública.

Otro factor importante en la transmisión de C. jejuni al humano podría ser la presencia de este patógeno en el contenido intestinal de pollo, que puede posteriormente contaminar la canal. Esta contaminación pudiera estar indirectamente vinculada con el agua. Existen algunos reportes que indican que la principal fuente de infección de C. jejuni a los pollos poco después de su nacimiento es el agua de bebida (1); Una vez que ingresa el patógeno al intestino de pollo se aloja en las cavernas de las vellosidades intestinales y ahí coloniza y se multiplica, con poca interferencia por parte de la flora asociada (5). Nosotros investigamos la frecuencia de aislamiento de Campylobacter a partir del contenido intestinal de pollo. De 112-muestras analizadas, (38.3%) resultaron positivas (Tabla 13). Este porcentaje de aislamiento guarda relación con el que han reportado otros investigadores. Shanker y col. (44) en Suecia, aislaron Campylobacter en 41% de hisopos rectales que obtuvo de pollos en rastros de aves. Una observación importante fue que la infección por Campylobacter se da entre grupos de pollos, y que existen parvadas libres de este patógeno. Pearson y col.(Abstr., Vth

Internat. Workshop on Campylobacter Infections. México 1989) encontraron una estrecha correlación entre el incremento en la venta del pollo en Inglaterra y Escocia y un aumento en los índices de morbilidad por Campylobacteriosis en esas comunidades. Dado que C. jejuni contamina las canales de pollo durante su procesamiento en el rastro, existe una alta probabilidad de infección por Campylobacter derivada del manejo de pollo crudo. Inclusive, Hopkins y Scott (28) reportaron que hay mayor riesgo de enfermar como resultado de cocinar pollo que por consumirlo. Las especies de Campylobacter aisladas a partir de las muestras de contenido intestinal de pollo se presentan en la Tabla 14.

Según los hallazgos obtenidos en nuestro estudio las aguas superficiales no parecen jugar un papel importante para la Salud Pública en su relación con la transmisión directa de C. jejuni/coli a la comunidad, por lo menos en nuestro medio. Estas aguas son un problema como agentes transmisores de otros patógenos. Por ejemplo, el riego de hortalizas con aguas negras, es un factor de contaminación de dichas hortalizas con Listeria monocytogenes (10), y en aguas superficiales y residuales, existe una elevada frecuencia de aislamiento de Salmonella (24). Sin embargo, no parece haber una contaminación muy importante de estas aguas con C. jejuni/coli. Esto no significa que no exista la posibilidad de que se presenten brotes de enteritis por Campylobacter en nuestra comunidad. Ya hemos mencionado algunos brotes transmitidos por el agua en otros países, y estos suelen ser muy extensivos (26); sin embargo en nuestro caso las posibilidades de transmisión de este patógeno por el agua parecen ser muy pocas. A pesar de esto hace falta bastante más investigación para conocer las características ecológicas y epidemiológicas de este patógeno el cual indudablemente es uno de los más importantes agentes etiológicos de gastroenteritis, y que en nues-

tro país apenas existen unos cuantos reportes en cuanto a su distribución - en alimentos y en el humano, que arrojan muy poca luz sobre su verdadera -- importancia para la Salud Pública de México.

Tabla 4

Eficiencia del método de Wells y col. en la recuperación de Campylobacter - jejuni a partir de aguas de desecho autoclaveadas y sin autoclavar.

C.jejuni/500 mL de agua residual *	Recuperación en aguas de desecho	
	No autoclaveadas	Autoclaveadas **
490 000	-	+
130 000	-	+
490	-	+
130	-	+

* Cuenta estándar del agua residual: 170 000 000/ mL.

** Autoclaveada a 10 libras durante 10 minutos.

Tabla 5

Sensibilidad del método de la torunda en la recuperación de Campylobacter - jejuni en solución de peptona (1%) y en agua embotellada sin cloro residual.

Células inoculadas de <u>C. jejuni</u> /500 mL	Muestras positivas / muestras estudiadas con:	
	Solución de peptona *	Agua * embotellada
1 000	2 / 2	3 / 3
100	2 / 2	3 / 3
10	2 / 2	3 / 3
1	1 / 2	0 / 3

* Cepas utilizadas: solución de peptona IP 383, agua embotellada IP 383 (1 exp) y P 3 (2 exp).

Tabla 6

Recuperación de Campylobacter jejuni en agua embotellada clorada y sin clorar mediante el muestreo con torunda.

<u>C. jejuni</u> /500 mL	Recuperación en agua:	
	Sin clorar	Con 2 ppm de cloro residual
3 900	+	-
390	+	-
39	+	-
4	+	-

Tabla 7

Retención de células de Campylobacter jejuni y Salmonella london en la torunda de Moore después de 7 enjuagues sucesivos en agua de garrafón muestreando por el método de Wells y col.

<u>C. jejuni</u> 500/mL de agua de garrafón*	Retención con torunda:	
	Sin enjuagar	Después de 7 enjuagues
2 300	+	+
1 200	+	-
140	+	-
100	+	-
<u>S. london</u> 500/mL de agua de garrafón*		
100	+	+

* Cuenta estándar del agua: 10 - 2 700/col/mL.

Tabla 8

Sensibilidad de los métodos de Moore y Spira en la recuperación de Campylobacter jejuni en agua de garrafón.

Experimento No.	<u>C. jejuni</u> /1 L	Recuperación:	
		Moore	Spira
1	170	-	+
	17	-	+
	2	-	+
C.E. 36 500/mL.			
2	260	+	+
	26	+	+
	3	-	+
C.E. 290/mL.			
3	420	+	+
	42	+	+
	4	-	+
C.E 110/mL.			

Tabla 9

Retención de células de Campylobacter jejuni por la torunda de Spira después de pasar de 8 litros de agua de garrafón.

<u>C. jejuni</u> /l L	Recuperación de torunda:	
	Sin enjuagar	Luego de 8 Lts. de agua
700 000	+	+
370	+	-
60	+	-

Tabla 10

Distribución de Campylobacter jejuni en aguas superficiales y de desecho.

Aislamiento por el método de:	Muestras positivas / Muestras estudiadas en:					Total
	Arroyos	Ríos	Lagos	Presa	Agua de desecho	
Moore	*	0 / 14	0 / 5	0 / 1	0 / 15	0 / 35
Wells y col.	0 / 2	0 / 4	0 / 2	0 / 2	*	0 / 10
Inoculación directa	*	0 / 3	0 / 1	0 / 1	*	0 / 5
Total	0 / 2	0 / 21	0 / 8	0 / 4	0 / 15	0 / 50

* No analizado por ese método.

Tabla 11

Aislamiento de Campylobacter jejuni en aguas superficiales mediante el método con torunda de Spira y Ahmed.

Aguas de:	Muestras estudiadas	Muestras positivas	% de positividad
Arroyos	19	0	0.0
Ríos	14	0	0.0
Lagos y Lagunas	15	0	0.0
Total	48	0	0.0

Tabla 12

Aislamiento de Campylobacter jejuni / coli en materia fecal de enfermos de -
diarrea.

Muestras estudiadas	81
Muestras positivas	1 *
% de positividad	1.2

* Cepa identificada como C. jejuni.

Tabla 13

Aislamiento de Campylobacter jejuni en contenido intestinal de pollo.

Muestras estudiadas	112
Muestras positivas	43
% de positividad	38.3

Tabla 14

Especies de Campylobacter aisladas en 43 muestras de contenido intestinal - de pollo.

Espece	No. de Muestra	%
<u>C. jejuni</u>	20	46.5
<u>C. coli</u>	13	30.2
<u>C. laridis</u>	1	2.3
<u>C. jejuni</u> + <u>coli</u>	3	6.9
<u>C. jejuni</u> */ <u>coli</u> *	6	14.0

* Prueba de Hipurato no realizada.

CONCLUSIONES

- 1.- Mediante el método de Wells y col. es posible recuperar hasta 10 células de Campylobacter jejuni presentes en el frasco con 500 mL de agua, lo que le da a este método una sensibilidad similar a la reportada para el aislamiento de Salmonella en leche cruda. En agua clorada su sensibilidad disminuye 10 veces.
- 2.- La torunda de Moore no es recomendable para utilizarse como método de muestreo en la investigación de C. jejuni/ coli en aguas superficiales y de desecho, debido a su incapacidad para retener las células de este patógeno después de haberlas capturado.
- 3.- La torunda de Spira y Ahmed permite recuperar hasta 2 a 4 células presentes en el líquido muestreado, y es recomendable para el análisis de grandes volúmenes de agua.
- 4.- Campylobacter jejuni/ coli no se aisló en ninguna de 98 muestras de agua de arroyos, lagos, ríos, presas y aguas de desecho. Debido a la evaluación previa de la metodología empleada parece ser que la falta de aislamiento de este patógeno en aguas superficiales se debe principalmente a su ausencia en ellas.
- 5.- Campylobacter jejuni fue aislado en 1 (1.2%) de 81 muestras de heces de personas enfermas de diarrea. Este % de aislamiento es inferior al que se reporta en otros estudios, y puede estar influido por la población estudiada, que incluye niños y adultos, en tanto que en la mayoría de los reportes

que revisamos la población estudiada fue infantil.

6.- Se aisló Campylobacter en el 38% de 112 muestras de contenido intestinal de pollo.

7.- Las especies aisladas en contenido intestinal de pollo fueron en orden de frecuencia: C. jejuni (46.5%), C. coli (30.2%) y C. lariidis (2.3%).

RESUMEN

Se estudió la eficiencia de diferentes métodos de muestreo con torundas de gasa en la recuperación de Campylobacter jejuni inoculado en agua de desecho y agua potable, y la distribución de C. jejuni/coli en agua de arroyos, lagos, lagunas, ríos, presas y agua de desecho, así como en heces de enfermos de diarrea y en contenido intestinal de pollo.

Mediante el muestreo por el método de Wells y col. se recuperó al patógeno en agua de desecho autoclaveada en cantidades de 130 cél / 500 mL; sin embargo en el agua que no había sido autoclaveada no fue posible la recuperación del patógeno aún en concentraciones aproximadas de 500 000 cél / 500 mL. En agua de garrafón y de solución de peptona C. jejuni se recuperó sistemáticamente a partir de una concentración de 10 cél / 500 mL. En agua clorada esta sensibilidad disminuyó 10 veces. La torunda de Moore no mostró capacidad para retener células de C. jejuni previamente capturadas después de una serie de lavados repetitivos en agua de garrafón estéril; sin embargo cuando este experimento se llevó a cabo utilizando Salmonella london, este microorganismo no fue liberado. Mediante el muestreo por Spira y Ahmed, se recuperó C. jejuni en cantidades tan bajas como 2 a 4 células / litro en agua de garrafón. Este método parece ser apropiado para la investigación de C. jejuni/coli en aguas superficiales. C. jejuni/coli no se recuperó en ninguna de 98 muestras de aguas superficiales y residuales y en el 1.2% de 81 muestras de materia fecal de enfermos de diarrea. En este caso la especie identificada fue C. jejuni. En 112 muestras de contenido intestinal de pollo en el 38.3%. Las especies aisladas fueron, en orden de frecuencia: C. jejuni (46.5%), C. coli (30.2%) y C. laridis (2.3%).

Parece ser que las aguas superficiales no juegan un papel importante como agente transmisor directo de C. jejuni/coli a la población.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Acuff,G.R., C.Vanderzant., F.A,Gardner and F.A,Golan. 1982. Examination of Turkey Eggs, Poults and Brooder House Facilities for Campylobacter jejuni. J. Food. Prot.. 45: 1279-1281.
- 2.- Anónimo. 1980. Infant Mortalit in the Americas. Epid. Bull. Pan amer. - Health Organiz. 1 (4):1-3.
- 3.- Anónimo. 1982. Enfermedades Diarreicas. Boletín Epidemiológico. OPS 3 - (3):10-13.
- 4.- Basualdo,M.C., M.T,Ramírez e I,Aguilar.1989. Recuperación de Campylobacter spp. en relación con otros microorganismos clásicos causantes de diarreya en niños menores de 2 años de la zona oriente de la ciudad de México. L.A.B. acta. 1:15-18.
- 5.- Beery,M.J., Hugdahl,M.B. and M.P,Doyle. 1988. Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by C. jejuni. Appl. Environ. Microbiol. 54: -- 2365-2370.
- 6.- Blaser,M.J. and L.B,Reller. 1981. Campylobacter enteritis.N. Engl. J. Med. 305:1444-1452.
- 7.- Blaser,M.J., J.L.Penner and J.G.Wells. 1982. Diversity of Serotypes in Outbreaks of Enteritis due Campylobacter jejuni. J. Infect. Dis. 146:826.
- 8.- Blaser,M.J., M.D,Taylor and R.A,Feldman. 1984. Epidemiology of Campylobacter infections. Cap. 13 en "Campylobacter Infection in Man and Animals".J.P,Butzler. Ed. CRC. Press. Boca Raton. Fla.
- 9.- Blaser,M.J. 1980. Campylobacter fetus subs. jejuni: the need for surveillance. J. Infect. Dis. 141:670-671.
- 10.- Brackett,R.E. 1988. Presence and Persistence of Listeria monocytogenes in Food and Water. Food Technol. April 1988. pp. 162-164.
- 11.- Bravo-Peregrina,J.M., A.Vierna-Quijano and R,Ruiz-Arenas. 1989. Isolation of Campylobacter jejuni in human stool samples. Resúmenes Vth International Workshop on Campylobacter infections. Puerto Vallarta, México.
- 12.- Butzler,J.P. 1984. Introduction. en "Campylobacter Infection in Man -- and Animals" J.P,Butzler. Ed. CRC. Press. Boca Raton. Fla.

- 13.- Cárdenas R.C., Moran y M.P Ruz. 1975. Características de algunas causas de mortalidad en Guadalajara durante 1971. Sal. Pub. Méx. XVII:219-233.
- 14.- Carter, A.M., R.E.Pacha., G.W.clark and E.A.Williams. 1987. Seasonal occurrence of Campylobacter spp. in surface waters and their correlation with standar indicator bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 53:523-526.
- 15.- Castillo Ayala, A y Fernández Escartín. E. 1987. Sobrevivencia de C. jejuni en papaya y sandía. Resúmenes IV Reunión Anual de Microbiología Sanitaria. Agua y Alimentos. Guadalajara, Jalisco.
- 16.- Castillo Ayala, A. "Importancia de las frutas rebanadas como agente -- transmisor de bacterias enteropatógenas" Tesis de Maestría. U de G. En proceso.
- 17.- Castillo Ayala, A. 1990. Environmental factors affecting prevalence of Campylobacter spp. in fresh deboned market chicken. Appl. Environ. Microbiol. En prensa.
- 18.- Crotti, D., Fonzo, G. and Geranio, N. 1989. Campylobacteriosis in Perugia: First official Data. Resúmenes Vth Int. Works on Campylobacter Infections.
- 19.- Doyle, M.P. and D.J, Roman. 1982. Recovery of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli from inoculated foods by selective enrichment. Appl. Environ. Microbiol. 43:1343-1353.
- 20.- Doyle, M.P. 1980. Campylobacter fetus subsp jejuni An old pathogen of new concern. J. Food. Prot. 44:480-488.
- 21.- Echeverría, P., D.N, Taylor., U. Leksomboon., M. Bhaibulaya., N.R, Blacklow., K. Tamura. and R. Sakazaki. Case - Control Study of Endemic. Diarrheal Disease in Thai Children. J. Infect. Dis. 159:343-348.
- 22.- El-Sherbeeney, M.P., B. Cherly., J.G. Wells and G.K. Morris. Comparison of gauze swabs and membrane filters for isolation of Campylobacter spp from surface water. 1985. Appl. Environ. Microbiol. 50:611-614.
- 23.- Fernández Escartín, E., A. Castillo Ayala. 1983. Evidencias bacterianas de contaminación fecal en aguas frescas y licuados con leche. Resúmenes XIV Congreso. Nal. Microbiol. Chihuahua, México.

- 24.- Fernández Escartfn, E., J.Saldaña Lozano y R. torres Vitela. 1983. Aplicación de la técnica de la torunda en el aislamiento de Salmonella a partir de algunas fuentes de agua superficial. Resúmenes, XIV Congreso Nacional de Microbiología. Chihuahua Méx.
- 25.- Fernández Escartfn, E. 1981. Microbiología Sanitaria. Ed. Univ. de Guadalajara. Guadalajara, México. pp 277-279.
- 26.- Haley, C.G., R.R, Gunn., J.M. Huges., E.C, Lippy., F.G, Craun. 1978. - Outbreaks of water borne disease in the United States. J. Infect. Dis. 141:794-797.
- 27.- Holan, J., G, Hensel ., K, Hoffman. 1984. Infection dureh C. jejuni/C. coli : bericht aus bakteriologischer, Klimischer und epidemiologischer sich offen liche Gesundheitswesen. 46 (3) 131-135.
- 28.- Hopkins, R.S and A.S, Scott. 1983. Handling raw chicken as a surce for sporadic Campylobacter jejuni infections. J. Infect. Dis. 148:770.
- 29.- Jeffrey, R.H., L,Mitchell., and E.C, Lippy. 1981. Water Related Disease Outbreaks in the United States. J. Infect. Dis. 148; 759-761.
- 30.- Kapperud,G. and O. Rosef. 1983. Avian wild life reservoir of Campylobacter fetus subs, jejuni, Yersinia spp and Salmonella spp in Norway, - Appl. Environ. Microbiol. 45:373-380.
- 31.- Lara Avila, M.T. 1986. Aislamiento de microorganismos enteropatógenos en niños de diarrea. Tesis profesional, Químico Farmacobiólogo. U de G.
- 32.- Lasson. J., Kapperud.G. 1984. Epidemiological aspects of enteritis due Campylobacter spp in Norway, J. Clin. Microbiol. 19 (2):153-156.
- 33.- López-León, V.M., E. San Román-Rivera., L. Velásquez-Jones. 1988. Uso de la solución de hidratación oral con o sin tomas de agua intermedia - en niños deshidratados con diarrea aguada. Boletín médico del hospital infantil de México. 45:84-88.
- 34.- Lovett,J., D.W. Francis and J.M. Hunt. 1983. Isolation of Campylobacter jejuni from raw milk. Appl. Environ. Microbiol. 26:459-462.
- 35.- Mancera martínez,A,. R. Flores castro y F. Suárez Guenes. 1980. Campylobacter fetus intestinalis: Primer aislamiento asociado con aborta epi zootio ovino en México. Rev. Lat. amer. Microbiol. 22:109-111.

- 36.- Matsusaki,S., Katayama., K,Tanaka., T,Nakamura. 1984. Campylobacter Enteritis in Japanese Children. J. Diarr. Dis. Res. 2 (2):88-91.
- 37.- Monamed,A.K. and Skirrow,M.B. 1984. Taxonomy of the genus Campylobacter. pp 1-20 en "Campylobacter Infection in Man and Animals" J.P,Butzler. Ed. CRC. Press. Boca Raton, Fla.
- 38.- Moore,B. 1950. Detection of paratyphoid carriers in towns by means of sewage examination. Mon Bull. Minist. Health Public. Health Lab. Serv. 9:72-78. citado en referencia 22.
- 39.- Nabbut,N.H. 1973. Elevated temperature technique for the isolation of Salmonella from sewage and human faeces. J.Hyg. Camb. 71:49-54.
- 40.- Pacha,R.E., G.W,Clark and E.A,Williams. 1985. Occurrence of C. jejuni and Giardia spp in Meskay (Ondatara Zibethica). Appl. Environ. Microbiol. 50:177-178.
- 41.- Park,C.A., R.M,Smibert., M.J,Blaser., C,Vanderzant and N.J,Ster. 1986. Campylobacter en: "Compendium of methods for microbiological examination of foods" 2nd. Ed. M.L,Speck. Ed. Washington D.C.
- 42.- Rosef,O., B.Gondrosen., G,Kaperud and B,Underdal. 1983. Isolation and Characterization of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli from domestic wild mammals in Norway. Appl. Environ. Microbiol. 46:855-859.
- 43.- Sears,S.D., C,Ferrencio., M.M,Levine., A.M,Cordano., J,Moreal., R.E,Black., K.D'Ottone., B,Rowe and the Chilean Typhoid Committee. 1984. -- The use of Moore swabs for isolation of Salmonella typhi from irrigation water in Santiago, Chile. J. Infect. Dis. 149:640-642.
- 44.- Shanker,S., J.A,Rosenfield., G.R,Davey and T.C,Sorrell. 1982. Campylobacter jejuni: Incidence in processed broiler and biotype distribution in human and broilers isolates. Appl. Environ. Microbiol. 43:1219-1220.
- 45.- Skirrow,M.B. 1977. Campylobacter Enteritis: a "New disease". Brit. Med. J. 2:9-11
- 46.- Speelman,P. and M.J,Strulens. 1984. Campylobacter jejuni in traveler's diarrhea. pp 33-38 en:"Campylobacter Infection in Man and Animals". P,J Butzler Ed. CRC. Press. Inc. Boca Raton, Fla.
- 47.- Spira,W.M. and Q.S,Ahmed. 1981. Gauze filtration and enrichment proce-

dures for recovery of Vibrio cholerae from contaminated water. Appl. Environ. Microbiol. 42:730-733.

- 48.- Stern, N.J. and Kazmi, S.U. 1989. Campylobacter jejuni. pp 72-110 in: -- "Foodborne Bacterial Pathogens" M.P. Doyle. Ed. Marcel Dekker. Inc. N.Y.
- 49.- Svedhem, A. and B. Kaiser. 1980. Campylobacter fetus subsp. jejuni: A common cause of diarrhea in Sweden. J. Infect. Dis. 142:353-359.
- 50.- Wells, J.G., G.K. Morris and P. Brachman. 1971. New method for isolating Salmonella from milk. Appl. Environ. Microbiol. 21:215-219.