

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS *CAMPYLOBACTER*

Ministerio de Salud

Subsecretaría de Investigación y Tecnología
ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS
Departamento Bacteriología
Servicio Bacteriología Sanitaria
Buenos Aires, Argentina
2001

INDICE

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	3
ANTECEDENTES.....	3
HISTORIA.....	3
CARACTERISTICAS GENERALES	4
ESPECIES TERMOFILAS.....	4
EPIDEMIOLOGIA	5
FISIOPATOGENIA.....	6
PRESENTACION CLINICA.....	6
DIAGNOSTICO DE LABORATORIO.....	8
MUESTRAS	8
EXAMEN MICROSCOPICO DIRECTO.....	8
CULTIVO EN MEDIOS SELECTIVOS.....	9
METODO DE FILTRACION PARA LA DETECCION DE CAMPYLOBACTER EN HECES.....	9
ATMOSFERA DE INCUBACION	10
ATMOSFERA DE INCUBACION	11
TEMPERATURA DE INCUBACIÓN.....	12
TABLA 1	12
EXAMEN DE LAS PLACAS.....	12
IDENTIFICACION PRESUNTIVA.....	12
IDENTIFICACION FINAL.....	13
TABLA 2	14
TABLA 3	15
CAMPYLOBACTER EN ALIMENTOS	16
LOS ALIMENTOS COMO FUENTE DE INFECCION.....	16
CONTROL.....	17
INVESTIGACION DE <i>Campylobacter</i> spp.....	17
PREPARACION DE LAS MUESTRAS	17
CAMPYLOBACTERIOSIS EN MEDICINA VETERINARIA.....	19
DIAGNOSTICO	20
ANEXOS	21
ANEXO I.....	22
CONSERVACION DE CEPAS.....	22
CRIOCONSERVACION.....	22
CMSOP 008 (Normas Internacionales).....	22
Coservación en Medio con Glicerol.....	22
CONSERVACION A TEMPERATURA DE REFRIGERACIÓN	23
Medio de Wang.....	23
ANEXO II.....	24
MEDIOS DE CULTIVO Y CALDOS DE ENRIQUECIMIENTO	24
MEDIOS DE CULTIVO.....	24
PREPARACION DE ALGUNAS DROGAS ANTIMICROBIANAS PARA ADICIONAR A LOS MEDIOS DE CULTIVO	24
MEDIO DE SKIRROW	24
MEDIO SKIRROW MODIFICADO.....	25
MEDIO DE BUTZLER	25
MEDIO DE PRESTON	25
MEDIO CAMPY-BAP (BLASER).....	26
MEDIO CDC	26
MEDIO DE TRANSPORTE.....	26
CARY BLAIR	26
MEDIOS PARA TIPIFICACION.....	27
MEDIO PARA DETECCION DE SH ₂	27
AGAR BRUCELLA 1% GLYCINA	27
AGAR BRUCELLA CINa 3,5%.....	27
CALDOS DE ENRIQUECIMIENTO.....	27
CALDO PRESTON	27
CALDO BOLTON.....	27
CALDO HUNT.....	28
CALDO PARK and SANDERS	28
BIBLIOGRAFIA	29

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS CAMPYLOBACTER

ANTECEDENTES

Las diarreas infecciosas continúan siendo un gran problema en los países en desarrollo, ocupando altas tasas de morbilidad y mortalidad, especialmente en niños de corta edad. Hasta hace poco tiempo solo era posible conocer su etiología en un porcentaje de casos relativamente bajo. Sin embargo en los últimos años, con la aplicación de nuevas metodologías, se pudo incluir dentro del espectro de agentes microbianos a “nuevos enteropatógenos” como son los Rotavirus, Criptosporidium, Aeromonas y las especies termófilas de Campylobacter, con lo cual se ha podido identificar el agente causal en el 40-50% de los casos de diarrea.

HISTORIA

Los primeros aislamientos de especies del género Campylobacter fueron realizados en el área de la microbiología veterinaria, en 1909 y 1913.

Mac Fadyean y Stockmann y posteriormente Smith en 1918 establecieron la participación de una bacteria microaerófila en el aborto del ganado bovino y ovino, de morfología similar al género Vibrio, por lo que se lo llamó *Vibrio fetus*.

En 1931, Jones y Little aislaron a partir de bovinos con disturbios intestinales “un vibrión” microaerófilo, al que denominaron *Vibrio jejuni*.

En 1944 Doyle describió “un vibrión” aislado del intestino de cerdos con diarrea y lo denominó *Vibrio coli*.

La primera asociación entre “vibriones” microaerófilos y diarrea en el hombre fue sugerida por Levy en 1946, el que realizó un estudio en un brote de gastroenteritis sobre 357 pacientes en un penal en Illinois, observando en exámenes directos la presencia de vibrios en el 20% de las muestras.

En 1957 E. King, estudiando las características de estos Vibrios aislados de diferentes fuentes, estableció que no todos correspondían a *Vibrio fetus*, determinó dos grupos con características serológicas y bioquímicas diferentes, mientras algunos eran capaces de crecer a 25 y 37°C, otros lo hacían a 42°C. A estos últimos se los consideró relacionados y se comprobó que eran agentes causantes de diarrea aguda.

En 1963, Sébald y Veron proponen la creación del género Campylobacter.

Butzler y Skirrow, Bolton y Robertson, Blaser y col, desarrollaron medios selectivos que permitieron aislar estos microorganismos con relativa facilidad y establecer su participación en diferentes cuadros infecciosos en el hombre.

En 1972 Dekeyser y Butzler aislaron los microorganismos de las heces de pacientes con enteritis aguda usando una técnica de filtración que permitía el pasaje de pequeños bastones curvos a través de una membrana, pero retenía microorganismos fecales más grandes.

CARACTERISTICAS GENERALES

Las especies del género *Campylobacter* agrupan bacilos Gram negativos curvos, espirilados o en forma de S que presenta un flagelo único en uno o ambos extremos. En cultivos de varios días (mas de tres) degeneran en formas esféricas u ovoides que han perdido su viabilidad.

Los diferentes nombres que han recibido las diferentes especies de *Campylobacter* han dificultado la utilización de una nomenclatura universal.

Al comienzo, estos microorganismos fueron clasificados dentro del género *Vibrio*. Sin embargo, mas tarde, debido a que presentan diferencias fundamentales con relación a la constitución del DNA y por su incapacidad de fermentar los hidratos de carbono, fueron agrupados en un nuevo género bacteriano denominado *campylobacter* (*campylo* = curvo) (*bacter* = bacteria). Actualmente se han incorporado nuevas especies y se ha creado la familia *Campylobacteriaceae*, la cual está compuesta por dos géneros: *Campylobacter* y *Arcobacter*; y un género de afiliación incierta *Helicobacter*.

Las diferencias fundamentales entre los géneros de *Campylobacter* y *Arcobacter* son que *Campylobacter* no puede crecer a 15°C, es móvil por un solo flagelo polar en uno o sus dos extremos y en cultivos viejos degeneran a formas cocoides; *Arcobacter* tiene un solo flagelo, crece bien a bajas temperaturas (17°C) pero mal a 37°C y 42°C, a 30°C pueden crecer aeróbicamente.

ESPECIES TERMOFILAS

Son aquellas capaces de crecer a 42-43°C pero no a 25°C, comprende *C. jejuni* (subespecies *jejuni* y *doylei*), *C. coli*, *C. lari* (biovar ureasa + y -), y *C. upsaliensis*.

De este grupo, *Campylobacter jejuni* (subespecie *jejuni*) es agente causal de diarreas, siendo considerado el más virulento por su mayor resistencia a la fagocitosis; luego le sigue *Campylobacter coli*, pero se considera que la diarrea que produce es más benigna. Ambos se encuentran como comensales en el tracto gastrointestinal de un amplio grupo de animales como ser: vacas, ovejas, cerdos, cabras, perros, gatos, roedores silvestres y domésticos y principalmente en todas las variedades de aves de corral, a las cuales se ha adaptado perfectamente, es por ello que su temperatura óptima de desarrollo es a 42-43°C. La dosis infectante es baja, bastan 1000 microorganismos para causar la enfermedad, lo cual evidencia su capacidad de producir epidemias.

Infecciones extraintestinales pueden ocurrir raramente en huéspedes normales; en pacientes HIV positivos e inmunocomprometidos pueden producir bacteriemias, bursitis, artritis, infecciones del tracto urinario, endocarditis, peritonitis, aborto y sepsis neonatal. *Campylobacter lari* ha sido aislado de intestino de gaviotas, de otros animales y también del hombre. Su rol patógeno para este último aún no está definido. La diferencia con los otros dos enteropatógenos está en que es negativo para la prueba de indoxyl acetato.

Campylobacter upsaliensis raramente es aislado de diarreas, produce bacteriemias en huéspedes inmunocomprometidos. Son más resistentes al poder bactericida del suero que las otras especies termófilas, por lo que puede sobrevivir en sangre. Si bien su fuente de infección no está bien definida, se ha relacionado con animales, especialmente perros, alimentos como leche no pasteurizada y sus derivados.

Campylobacter fetus (subsp. *fetus* y *veneralis*) son microorganismos de gran importancia veterinaria producen aborto esporádico en el ganado bovino y ovino.

Para el humano *C. fetus* subsp. *fetus* es considerado un patógeno oportunista, provocando infecciones sistémicas en pacientes debilitados o inmunosuprimidos, se aísla de intestino de ovejas, vacas y cerdos. *C. fetus* subsp. *veneralis* se encuentra frecuentemente en el aparato genital de vacas causando infertilidad. La diferencia entre ambas subespecies es la capacidad de crecer en 1% de glicina de *C. fetus* subsp. *fetus*.

Campylobacter hyointestinalis se ha recuperado de hisopados rectales de hombres homosexuales con proctitis. Anteriormente solo era hallado en animales, sobre todo como causa de ileitis en cerdos. Presenta reacciones bioquímicas similares a *C. fetus* subsp. *fetus*, pero a diferencia de este también puede crecer a 42°C y produce SH₂ en TSI.

Campylobacter consisus y *Campylobacter rectus* se aíslan de pacientes con enfermedad periodontal, infecciones intestinales y bacteriemia.

Campylobacter sputorum biovar *sputorum* forma parte de la flora normal de la boca e intestino humano, ha sido aislado de forúnculos perianales y abscesos pulmonares.

Campylobacter sputorum biovar *bubulus* es un comensal de ovejas y vacas, se ha aislado de forúnculos y abscesos en hígado, escroto, ingle y axilas humanas en personas que trabajan en el campo.

Campylobacter showae es una especie recientemente descrita, aislada de enfermedad periodontal, presenta la particularidad de tener múltiples flagelos.

EPIDEMIOLOGIA

La campilobacteriosis es una zoonosis de distribución mundial. *Campylobacter* se halla habitualmente como comensal del tracto gastrointestinal de vacas, ovejas, cerdos, cabras, perros, gatos, roedores silvestres o domésticos y toda variedad de aves de corral. Muchos de los casos de enteritis humana han sido asociados al contacto con animales, agua contaminada o alimentos de origen animal.

En países desarrollados, la diarrea por *Campylobacter* es más frecuente en los meses de verano, siendo afectados todos los grupos étnicos de ambos sexos, no encontrándose portadores sanos. Se considera que un alto porcentaje de infecciones es provocado por consumo de carne de ave mal cocida.

En países en vías de desarrollo la enfermedad parece ser más frecuente en niños de corta edad.

Campylobacter jejuni y *Campylobacter coli* son causas importantes de diarreas agudas en viajeros que visitan zonas en vías de desarrollo. No soportan durante mucho tiempo situaciones de desecación o congelamiento, característica que limita su transmisión. Sobreviven en la leche, otros alimentos o el agua a 4°C durante una semana. La desinfección con cloro y la pasteurización destruye al microorganismo.

De la misma forma que con otros patógenos entéricos, es importante la transmisión fecal-oral de persona a persona sobre todo en lactantes, que no controlan esfínteres.

FISIOPATOGENIA

El microorganismo se adquiere por vía oral (ingestión de comidas y bebidas contaminadas) o por contacto con animales infectados. *Campylobacter jejuni* es sensible al pH gástrico, por lo que debe ingerirse un inóculo de 10^4 para que se produzca la infección, sin embargo en algunos casos es altamente infectivo, provocando la infección con dosis del orden de 500 microorganismos.

El periodo de incubación es de 1 a 7 días, afecta tanto intestino delgado como grueso.

De diferentes estudios epidemiológicos realizados en países subdesarrollados y desarrollados se desprende la existencia de cepas con distinto grado de patogenicidad y distintas respuestas del huésped a la infección.

Estas variaciones en la presentación clínica hacen pensar en la existencia de importantes diferencias en los mecanismos de virulencia entre las cepas de distintas zonas geográficas.

Muchas cepas pueden invadir las células epiteliales, provocando infiltrados inflamatorios de la lámina propia y abscesos en las criptas similares a los producidos por *Shigella*, apareciendo hematíes y leucocitos en las heces (diarreas inflamatorias y disentéricas). Pueden atravesar mucosa intestinal y proliferar en la lámina propia y ganglios, semejante a infección por *Salmonella* (infecciones extraintestinales), aunque la acción inhibitoria del suero impide bacteriemias en la mayoría de los casos.

Algunas cepas producen toxinas termolábiles muy semejante a la de *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), se unen al gangliosido GM1 y activa la adenilciclasa, aumentando el AMP cíclico, provocando una diarrea secretora. También se ha encontrado acción citotóxica sobre células Hela y células Vero.

PRESENTACION CLINICA

La gastroenteritis aguda causada por *Campylobacter* se caracteriza por una rápida elevación de la temperatura, acompañada de malestar general, dolores musculares, cefaleas, náuseas, vómitos, ruidos hidroaéreos, anorexia y tenesmo. La diarrea comienza generalmente a las 24 horas posteriores al inicio de los síntomas. Las deposiciones, disgregadas o acuosas, pueden ser mucosanguinolentas, son oscuras, con mayor olor, ligeramente verdosas. Con frecuencia se ven células de inflamación y un predominio de microorganismos de formas curvas y espirilares.

La enfermedad se autolimita alcanzando su mayor expresión entre el 2^{do} y 4^{to} día, remitiendo completamente después del séptimo día.

La presentación puede ser variable, desde una forma leve de corta duración a un cuadro más severo y prolongado con características similares a Shigellosis o Salmonelosis.

Los casos mas leves no requieren de tratamiento antimicrobiano, la presentación más grave o recidivante se trata; la droga de elección es la eritromicina.

En los neonatos puede presentarse con una o más deposiciones sanguinolentas y ningún otro síntoma. También se puede desarrollar solo una fiebre tan severa y persistente que es necesario diferenciar de fiebre tifoidea.

En pacientes inmunocomprometidos puede presentarse colecistitis aguda, pancreatitis, cistitis, artritis reactiva y otras complicaciones como síndrome urémico hemolítico, nefritis intersticial, hepatitis y síndrome de Guillén-Barré.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Puede realizarse el diagnóstico por la demostración del microorganismo en examen directo o a través del cultivo.

El uso de los métodos serológicos para el diagnóstico tiene valor para la investigación, ya que en países en vías de desarrollo los títulos en la población suelen ser altos.

El examen de las muestras fecales diarreicas utilizando microscopio de campo oscuro o contraste de fase, dentro de las 2 horas de evacuación, puede permitir un diagnóstico presuntivo rápido si se observa la rápida motilidad de las especies de *Campylobacter* en su mayoría acompañadas por eritrocitos y neutrófilos.

Para cultivo y aislamiento a partir de materia fecal se requiere de una atmósfera microaerófila, medios de cultivo selectivos para inhibir la flora acompañante, temperatura óptima de desarrollo (42-43°C), aunque pueden desarrollar a 37°C, pH óptimo de crecimiento (6,5-6,9).

A partir de alimentos congelados, o de muestra de materia fecal de pacientes con tratamiento antibiótico previo, es necesario hacer un pasaje reconstituyente de la estructura celular, de por lo menos 6 horas a 37°C, por un medio en base a Caldo Brucella, succinato de sodio al 0,3%, cisteína al 0,01% y solución antibiótica (trimetroprima, vancomicina, anfotericina, cefalotina). Para las células dañadas por calor, no hace falta realizar este pasaje.

Para aislar de agua es necesario filtrar un gran volumen, centrifugar y sembrar.

MUESTRAS

Las muestras de deposiciones pueden ser tomadas con hisopo rectal o bien por evacuación espontánea, pudiendo mantenerse a temperatura ambiente, por algunas horas, evitando su desecación. La refrigeración de las muestras prolonga por varios días la sobrevivencia del microorganismo.

Si es necesario usar un medio de transporte, debe utilizarse el medio Cary Blair modificado por la reducción de la concentración de agar en un 0,12% (ver ANEXOS, Medios de Cultivo).

EXAMEN MICROSCOPICO DIRECTO

Las muestras de materia fecal pueden ser examinadas a través de una tinción simple como Gram utilizando carbolfucsina como colorante de contraste, o azul de metileno para identificar leucocitos y formas bacilares curvas. La observación en microscopio óptico o de campo oscuro de bacilos curvos y/o espirilados con gran motilidad en forma circular o de sacacorchos nos permite un diagnóstico presuntivo rápido.

CULTIVO EN MEDIOS SELECTIVOS

Las placas se siembran en forma directa con hisopo o con 2-3 gotas de deposiciones acuosas, se disemina por estría. Se incuban con una atmósfera microaerófila que tenga 5-10% de oxígeno y 3 a 10% de dióxido de carbono.

Dado que en una diarrea el número de *Campylobacter* es alto, no es necesario realizar enriquecimiento. Se recomienda solo en caso de esperar un bajo número de microorganismos (manipuladores, convalecientes).

METODO DE FILTRACION PARA LA DETECCION DE CAMPYLOBACTER EN HECES^(*)

El método se basa en la separación de *Campylobacter* del resto de la flora microbiana presente en las heces, como por ejemplo los coliformes, que quedan retenidos en la superficie de una membrana de celulosa de 0,45 o 0,66 μm ; los bacilos que logran penetrar o transponer la membrana van a depositarse sobre un medio rico con sangre que actuará como sustrato para el crecimiento del microorganismo. De esta manera se obtiene un cultivo selectivo, situación que reemplaza a la adición de antibióticos, para eliminar la flora acompañante.

Este método se recomienda para el aislamiento de las especies emergentes (ej. *Campylobacter upsaliensis*)

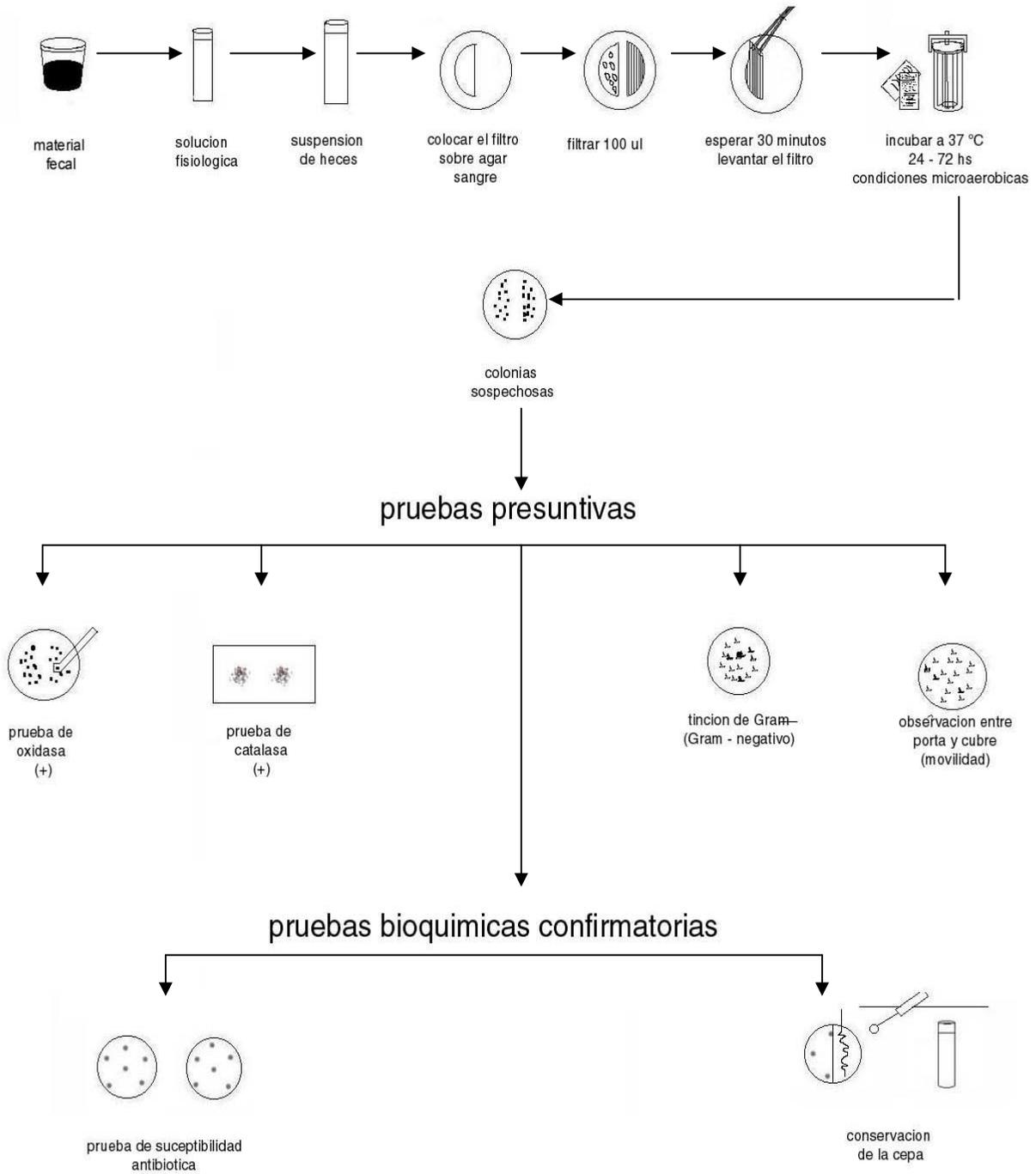
Procedimiento: (ver FIGURA 1) atemperar el medio de cultivo en placa de Petri, acomodar con una pinza los filtros estériles de celulosa de 0,45 μm , esperar a que se adhieran al medio. Realizar una suspensión de materia fecal en solución fisiológica y con una micropipeta o pipeta Pasteur, depositar aproximadamente 100 μl sobre la membrana, tratando que no se derrame sobre el medio de cultivo. Dejar que se filtre por un tiempo mínimo de 30 minutos, luego levantar el filtro con la pinza y desecharlo. Estriar el filtrado con anza. Acondicionar las placas en jarras para incubar en microaerofilia a 37°C durante 24-48 horas.

Si la diarrea es acuosa, no es necesario realizar una suspensión en solución fisiológica.

Continuar con los métodos de identificación y tipificación.

^(*) Extraído de: **Aplicación del Método de Filtración para la Detección de *Campylobacter* spp en Heces.** Pinto, A.M., Fundación de Tecnología de Alimentos, Sucre – Bolivia, 1999

FIGURA 1. Técnica de Filtración con Membrana de Celulosa para la detección de *Campylobacter* spp en Heces



ATMOSFERA DE INCUBACION

Existen varios métodos para obtener una atmósfera adecuada para el desarrollo de estos microorganismos.

Reemplazo de una atmósfera normal por una mezcla de gases apropiada: se retira el aire contenido en la jarra anaeróbica con bomba de vacío y se reemplaza por una mezcla conteniendo 85% de Nitrógeno, 10% de dióxido de carbono y 5% de oxígeno.

Algunas especies, por ej. *C. hyointestinalis*, requieren de la presencia de hidrógeno para crecer.

Sobres generadores de gases especiales para Campylobacter: son sobres que se consiguen en el comercio (BBL, Oxoid, Bio-Merieux) que aportan una atmósfera aproximada de 5-10% de oxígeno y 5-12% de dióxido de carbono.

Sobres generadores de hidrógeno y oxígeno para anaerobiosis: se utilizan sin catalizador de paladio. En general no son recomendados por el peligro de explosión que representa el hidrógeno remanente en la jarra.

Jarra con vela: la combustión de la vela aporta una atmósfera aproximada de 17-19% de oxígeno y de 2-4% de dióxido de carbono que mejora el aislamiento de Campylobacter si se incluye al medio de cultivo el suplemento FBP que aumenta alrededor de 10 veces la aerotolerancia del microorganismo. Se postula que el rendimiento de este método es mayor a 42-43°C que a 37°C.

Generadores caseros: reduce la atmósfera de oxígeno por consumo en reacción química y aumenta la de dióxido de carbono por medio de la disolución de bicarbonato en agua. Entre estos tenemos:

5.a Una pastilla de boranato de sodio (0,8 gr para una jarra de 3 litros)

Una pastilla de Alka Seltzer o Yastá
10 ml de agua destilada.

5.b Lana de acero

Solución ácida de sulfato cúprico:	Sulfato de cobre	5 gr
	Agua	100 ml
	Ac. sulfúrico	0,33 ml
	Tween 80	0,2 ml

TEMPERATURA DE INCUBACIÓN

Las especies termófilas de *Campylobacter* crecen mejor a 42-43°C que a 37°C. La mayor temperatura actúa como inhibición de la flora fecal.

Si no se cuenta con una estufa a esa temperatura, se puede utilizar una de 37°C con las consideraciones del caso.

TABLA 1. Temperaturas de Desarrollo de las Diferentes Especies de *Campylobacter*

	25°C	37°C	42°C
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>Jejuni</i>	-	+	+
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>Doylei</i>	-	+	-
<i>C. coli</i>	-	+	+
<i>C. fetus</i> subsp. <i>Fetus</i>	+	+	D
<i>C. fetus</i> subsp. <i>Veneralis</i>	+	+	-
<i>C. lari</i>	-	+	+
<i>C. upsaliensis</i>	-	+	+
<i>C. hyointestinalis</i>	d	+	D
<i>C. sputorum</i> subsp. <i>sputorum</i>	-	+	+
<i>C. sputorum</i> subsp. <i>bubulus</i>	d	+	-
<i>C. curvus</i>	-	+	+
<i>C. rectus</i>	-	+	D
<i>C. showae</i>	-	-	+

EXAMEN DE LAS PLACAS

El tiempo de incubación ideal es de 48 horas, aunque si el caso lo requiere, se pueden examinar a las 18-24 horas.

Las colonias sospechosas pueden observarse planas, no hemolíticas de aspecto acuoso, grisáceas, con bordes irregulares y con tendencia a diseminarse. Muchas veces se pueden ver incoloras. Se les debe realizar una identificación presuntiva para su posterior confirmación y tipificación.

IDENTIFICACION PRESUNTIVA

Tinción de Gram: debido a que este microorganismo no se tiñe bien con safranina, se recomienda el uso de carbofucsina al 0,8% como coloración de contraste. Teniendo en cuenta la morfología característica, es posible realizar solo la coloración simple con este colorante.

Catalasa: se debe colocar sobre un portaobjetos limpio una colonia de un cultivo fresco, agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 3 %. Una reacción positiva se evidencia por la

formación de burbujas producto de la liberación de oxígeno a partir de la reducción del peróxido de hidrógeno.

Oxidasa: se debe utilizar un buen inóculo que se coloca en un tubo de hemólisis conteniendo 0,2 ml de agua destilada a la que se le introduce un disco impregnado en la solución de oxalato de p-aminodimetilamina. La enzima, citocromo oxidasa es convertida a su forma activa por la transferencia de electrones al oxígeno molecular. En presencia de oxígeno molecular un gran número de electrones pueden ser transferidos por el sistema citocromo oxidasa a una cantidad de compuestos orgánicos, entre ellos a la p-aminodimetilamina. Una reacción positiva se evidencia por el desarrollo de color rojo.

Motilidad: se realiza por microscopía óptica, de contraste de fase o campo oscuro donde se observa microorganismos espiralados o con forma de S con movimientos en espiral o tirabuzón.

IDENTIFICACION FINAL

Crecimiento a 42-43°C y a 25°C: suspender al microorganismo en solución fisiológica estéril hasta una densidad óptica del # 1 de la escala de Mac Farland.

Sembrar 0,5 ml de la suspensión en dos tubos con caldo brucella, incubar uno a 42-43°C y el otro a 25°C (temperatura ambiente). Controlar a las 48 horas si hubo o no desarrollo.

Se puede usar placas de agar sangre o medios para *Campylobacter*.

Sensibilidad al ácido nalidíxico y cefalotina: la suspensión anterior (1 en la escala de Mac Farland) se siembra con hisopo sobre la superficie de una placa de agar sangre, agar para antibiograma u otro medio para *Campylobacter*, colocar un disco de ácido nalidíxico de 30 µg. y un disco de cefalotina de 30 µg.

Se incuba 48 horas y se observa si hay halo de inhibición o no de manera de determinar si la cepa es sensible a los antimicrobianos estudiados.

Hidrólisis del hipurato: suspender una ansada de la cepa en 400ul de una solución hipurato de sodio al 1%. Luego de incubar a 37°C durante 2 horas, se le agrega 200ul de solución de ninhidrina al 3,5% en acetona-butanol 1:1 por la pared del tubo, se deja en reposo a 37°C observándolo entre 10 minutos y 2 horas. La aparición de una coloración azul-púrpura indica una reacción positiva que revela la presencia de glicina, producto final de la hidrólisis del hipurato.

Producción de ácido sulfhídrico: se determina depositando una ansada en el centro de la columna del tubo del medio para SH₂ (medio de Lior. Los tubos se mantienen por 4 horas a temperatura ambiente. La aparición de una coloración negra alrededor del inóculo indica una reacción positiva.

La reacción se basa en la liberación de ácido sulfhídrico por acción enzimática de los aminoácidos que contienen azufre, y se pone en evidencia por indicadores como sulfato ferroso, tiosulfato de sodio, etc.

En caso de dudas, la incubación puede prolongarse a temperatura ambiente o a 37°C.

Una alternativa consiste en usar medio de cultivo TSI o Kligler incubando en microaerofilia.

Crecimiento en Glicina al 1%: sembrar 0,1 ml de suspensión en un tubo de agar brucella semisólido con 1% de glicina y rojo neutro como indicador. Incubar durante 3-5 días a 37°C en microaerofilia. Observar si se forma una delgada línea de desarrollo por debajo de la superficie.

Crecimiento en CINA al 3,5%: sembrar 0,1 ml de suspensión de una cepa en un tubo con agar Brucella semisólido con 3,5% de cloruro de sodio y rojo neutro como indicador. Incubar 3-5 días a 37°C en microaerofilia. Observar si se forma una delgada línea de desarrollo por debajo de la superficie.

Hidrólisis de indoxil acetato: se puede preparar por adición de 50 µl de una solución al 10% (p/v) de acetona a un disco standard y dejando secar al aire. Luego se deben guardar a 4°C en envase con desecante (sílicagel). En estas condiciones duran 1 año. La técnica se puede realizar de dos formas:

Se adiciona una colonia del microorganismo sobre un disco y se agrega una gota de agua. Si se produce la hidrólisis aparece un color azul entre 10 y 15 minutos después.

El otro método consiste en suspender una colonia en 0,3 ml de agua destilada estéril y luego agregar el disco. La lectura se realiza igual que en el punto anterior.

Hidrólisis de 2,3,5 cloruro trifeniltetrazolium: Esta prueba se utiliza como complementaria cuándo hay dudas con la prueba de hidrólisis del hipurato para diferenciar *C. jejuni* de *C. coli*. Se deben cortar tiras de papel de filtro de 7 por 1 cm embebidas en una solución de la sal de tetrazolium en agua destilada al 4% (p/v). Las tiras se secan a 60°C y se guardan a 5°C en frasco oscuro, manteniéndose estables por 6 meses. Se prepara la cepa y el medio como se ha descrito para la sensibilidad al ácido nalidíxico sustituyendo el disco por la tira impregnada con la sal de tetrazolium. Después de un periodo de incubación de 24 a 48 horas a 37° en microaerofilia se observa si ha habido o no inhibición del crecimiento. En caso de producirse desarrollo bacteriano este se observa metalizado amarillento por reducción de la sal de formazan.

TABLA 2. Características Bioquímicas de Especies de Campylobacter Termotolerantes

	<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
	jejuni	Doyle			
Hidrólisis del hipurato	+	+	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+
Producción de catalasa	+	+	+	+	-/d
Reducción de nitratos	+	-	+	+	+
Producción de SH ₂	-	-	-/d	-	-
R. Ac. Nalidíxico	S	S	S	R	S
R. cefalotina	R	V	R	R	S
Indoxil acetato	+	+	+	-	+
TTC	S/d		S	S	
Glicina 1%	+	+	+	+	V

S: sensible R: resistente d: débil V: variable TTC: cloruro trifenil tretazolium

TABLA 3. Características Bioquímicas de otras Especies de Campylobacter

	<i>C. fetus</i>		<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	<i>C. sputorum</i>		<i>C. curvus</i>	<i>C. rectus</i>	<i>C. chowae</i>
	fetus	veneralis		sputorum	bubulus			
Hidrólisis de hipurato	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+	-	-	-
Producción catalasa	+	+	+	-	-	-	-	+
Reducción de nitratos	-	-	-	+	+	+	+	+
Producción de SH ₂	-	-	+	+	+	+	+	+
R. Ac. nalidixico	R	d	R	S	R	S	S	R
R. cefalotina	S	S	S	S	S			S
Indoxil acetato	-	-	-	-	-	+	+	+
Glycina 1%	+	-	+	+	+	+	+	V

S: sensible R: resistente d: débil V: variable TTC: cloruro trifenil tretazolium

CAMPYLOBACTER EN ALIMENTOS

Las especies *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* están reconocidas como causantes de gastroenteritis en el hombre. Su estudio en este aspecto comienza en 1972 y actualmente el interés radica en la identificación y el control de las principales fuentes de infección: carnes de abasto, aves, leche y agua.

Las Campilobacterias forman parte de la flora intestinal normal de animales: bovinos, ovinos, cerdo, cachorros de perros y gatos, aves de corral y salvajes.

Las aves constituyen el principal reservorio de *C. jejuni*; es posible encontrarlas en heces y carcasas de aves recién sacrificadas y es probable la contaminación en los huevos. A pesar de ser portadoras del microorganismo, no muestran signos clínicos de la enfermedad.

El ganado porcino es el principal portador de *Campylobacter coli*, pudiendo tener además *Campylobacter jejuni* como comensal habitual.

El ganado vacuno contiene habitualmente *C. jejuni* en sus heces. Durante el sacrificio y la evisceración, se contaminan las canales, aunque es mucho menor que en el caso de las aves y los cerdos. La leche puede contaminarse a partir de las heces y ser causa de gastroenteritis cuando se la consume sin pasteurizar.

LOS ALIMENTOS COMO FUENTE DE INFECCION

Las prácticas tecnológicas en la elaboración de los alimentos contribuye a la dispersión de microorganismo en los productos de origen animal.

En las carnes de abasto, el nivel de contaminación por *Campylobacter jejuni/coli* desciende considerablemente a partir del siguiente día de almacenamiento en refrigeración. Esto es comprensible teniendo en cuenta que la temperatura óptima de desarrollo es alta, 42-43°C requiriendo una temperatura mínima de 30°C.

La incidencia de este germen es superior en productos de origen aviario, aún en condiciones de refrigeración, ya que la tasa de contaminación es mucho mayor que en animales de abasto.

Otro alimento de origen animal, vector del microorganismo es la leche cruda contaminada con heces o procedentes de vacas con mastitis por *Campylobacter*.

CONTROL

Procurar la cocción completa de los alimentos, sobre todo de aves de corral.

Mantener la higiene personal de manipuladores de alimentos.

Evitar que manipulen alimentos personas enfermas sobre todo con cuadros gastrointestinales.

No consumir leche cruda.

No consumir agua sin tratar.

Evitar contaminación cruzada de alimentos crudos a los cocidos.

INVESTIGACION DE *Campylobacter* spp.

Las técnicas de aislamiento de *Campylobacter jejuni/coli* en alimentos, necesitan de medios de enriquecimiento esenciales para conseguir su rehabilitación y asegurar su detección.

Los alimentos que se van a investigar, pueden estar altamente contaminados con una flora competitiva que hace difícil el crecimiento de *Campylobacter*. Por otra parte, el número puede ser escaso o su vitalidad disminuida o lesionada como consecuencia de las condiciones ambientales, de almacenamiento y procesamiento (calentamiento, desecación, congelación, acidulación).

Se han sugerido numerosos medios de enriquecimiento selectivos, la mayoría de las veces se trata de modificaciones de los medios utilizados para el aislamiento.

En general, al caldo base de la fórmula se le incorporan antibióticos como agentes selectivos entre los cuales tenemos: vancomicina, trimetoprim, polimixina B, anfotericina, cefalotina, actidiona, colistina y rifampicina. También llevan incorporados suplementos tales como sulfato ferroso, metabisulfito de sodio, piruvato de sodio, cisteína, hematina, sangre equina y extracto de levadura.

Los medios de enriquecimiento, una vez sembrados se incuban en atmósfera microaerófila a 42°C durante 48 horas. Si el alimento ha sido refrigerado o congelado, se debe realizar una pre-incubación a 37°C, en microaerofilia, por 6 horas evitando que los medios contengan polimixina o rifampicina ya que las células sometidas a frío sufren una alteración en sus características biológicas haciéndose sensibles a los 42°C y a estos antimicrobianos.

PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Las muestras pueden conservarse refrigeradas y protegidas del aire durante una a tres semanas.

Una vez abiertos los envases deben ser analizadas, dado que la introducción de oxígeno provoca daño celular.

1-a Carnes de origen bovino, porcino o aviar: sembrar muestras de 25 g en 100 ml caldo de enriquecimiento (Agregar suplemento A y B) . Incubar en atmósfera microaerófila a 37° C durante 3-4 horas, luego incubar a 42°C, durante 24-48 horas. Sembrar en placa de agar selectivo (Preston, Skirrow, CDC), Incubar a 42°C durante 48 horas.^(*)

1-b Alimentos congelados: luego de descongelar, sembrar muestras de 25 g en 100 ml de caldo de enriquecimiento, agregar suplemento A, incubar a 32°C durante 3-4 horas en microaerofilia. Agregar suplemento B, incubar a 37°C por 2 horas. Continuar la incubación a 42°C por 24-48 hs.^(*)

1-c Leche: pesar 100 g. de leche en botella para centrifuga. Centrifugar a 16.000 x g durante 20 minutos a 4°C. Descartar la grasa y el sobrenadante. Suspender el pellet en 100 ml de caldo de enriquecimiento. Continuar el procedimiento según 1-a. ^(*)

1-d Hisopados (de ambientes,carcasas de aves,reses,etc).: sembrar los hisopos en 100 ml de caldo de enriquecimiento con agregado de suplementos A y B. Continuar el procedimiento como se indica en 1-a.^(*)

Suplemento antibiótico A (agregar 5 ml de solución cada 1000 ml de medio base)

Vancomicina	0,1 g.
Trimetroprima	0,1 g.
Agua destilada	50 ml

Suplemento antibiotico B (agregar 5 ml de solución cada 100 ml de medio base)

Cefoperazona	0,032 g.
Cicloheximida	0,1 g. (opcional)
Caldo brucella	50 ml

1-e Agua: los métodos para aislar *Campylobacter* no están estandarizados y deben ser considerados como procedimientos de investigación. En aguas de escasa turbidez se deben filtrar varios litros (1 a 4) a través de filtros de 47 mm de diámetro y 0,45 µm de poro. Se coloca el o los filtros en un medio de enriquecimiento selectivo. Se incuba durante 24-48 hs. a 42°C en atmósfera microaerobia. Luego de la incubación se siembra el cultivo en un medio selectivo. Si el agua es clorada se requiere el agregado de 5 ml de solución de tiosulfato de sodio 1M por litro en el momento de la toma de muestra. Si se trata de agua de mar o de agua con alto contenido de sales, lavar el filtrado con 100-1000 ml de buffer fosfato estéril. *Campylobacter* es sensible a altas concentraciones de sal. Para aislar *Campylobacter* de ríos, el uso de la tórula o hisopo de Moore también es recomendable.^(**)

(*) Extraído de: **Isolation of Campylobacter from food**. G. Sanders. Microbiology Research Division Bureau of Microbial Hazards, Food Directorate. Ottawa, Canada. 1998

(**) Extraído de: **“Standard Methods” For the Examination of Water and Wastewater**. 17 edition. APHA,AWWA, WPCF, USA. 1989.

CAMPYLOBACTERIOSIS EN MEDICINA VETERINARIA

Los animales mamíferos y las aves domésticas y silvestres constituyen el gran reservorio de *Campylobacter jejuni* pero muchas veces es difícil incriminar a este agente como causa de enfermedad diarreica ya que se encuentra una alta tasa de infección en animales clínicamente sanos.

Bovinos: la enteritis por *Campylobacter jejuni* en terneros es clínicamente similar a la del hombre. Presentan fiebre moderada y diarrea que puede durar hasta 14 días. También es posible que este agente puede causar mastitis en las vacas, como se demuestra en forma indirecta el hecho de que el hombre puede contraer la enfermedad por consumir leche no pasteurizada.

La vibriosis genital causada principalmente por *C. fetus* subsp. *veneralis* y en menor grado por *C. fetus* subsp. *fetus*, es una de las principales causas de infertilidad debido a una muerte embrionaria temprana. El síntoma principal es la repetición de celo después del servicio.

En un brote, una alta proporción de hembras vuelven al servicio y tan solo de un 25 al 40 % de ellas quedan preñadas después de haber sido cubierta dos veces. Las que quedan finalmente preñadas abortan después de unos 5 meses de gestación.

Una proporción de hembras albergan *C. fetus* subsp. *veneralis* durante toda la gestación y se constituyen una fuente de infección para los toros en la próxima estación de monta.

Luego de la infección inicial, las hembras adquieren inmunidad y recuperan su fertilidad, los embriones se desarrollan normalmente, sin embargo, esta inmunidad es parcial y los animales pueden reinfectarse.

La infección se transmite por el servicio natural o por inseminación artificial, los toros son portadores normales, de manera temporaria. El agente etiológico es sensible a los antibióticos que se agregan al semen en la práctica de inseminación artificial.

Campylobacter fetus subsp. *fetus* es causante de abortos esporádicos, se eliminan por la materia fecal.

Ovinos: *C. jejuni* es una importante causa de aborto en ovinos. En la aparición de brotes se le atribuye un papel similar al de *C. fetus* subsp. *fetus* y con menor frecuencia *C. fetus* subsp. *veneralis*.

Las ovejas abortan en el último período de la gestación o dan nacimiento a corderitos muertos o débiles que pueden morir a los pocos días. La infección también origina metritis o placentitis que pueden llevar a septicemia y muerte de las madres.

Es bastante común una pérdida del 10 al 20% de los corderos. Los animales que se infectan adquieren inmunidad y no vuelven a abortar por unos 3 años.

La transmisión de la infección se hace por vía oral, no se ha podido comprobar la transmisión venérea.

Perros y gatos: cachorros con diarrea han constituido la fuente de infección de sus dueños. La diarrea es el síntoma predominante y el vómito es frecuente. La enteritis en gatos por *C. jejuni* es rara. Estos han sido descritos como reservorios de *C. upsaliensis*.

Otros mamíferos: es probable que ocurra enteritis en muchas otras especies. Se describió en monos y también en potrillos.

DIAGNOSTICO

En el hombre el diagnóstico ha sido un hecho fortuito, al encontrar *Campylobacter fetus* en hemocultivos. Esta especie generalmente produce infección sistémica en pacientes inmunodeprimidos o con enfermedades de base debilitantes. Durante el período febril deben tomarse repetidas muestras de sangre. En caso de meningitis se debe realizar cultivo de líquido cefalorraquídeo.

En los bovinos, el diagnóstico de la infertilidad se basa en la historia del rebaño, en el cultivo de la secreción prepucial y semen del toro y de mucus vaginal de vacas y vaquillonas no preñadas, como también en el cultivo de fetos abortados.

Los materiales deben cultivarse dentro de las 6 horas de recogidos

ANEXOS

ANEXO I

CONSERVACION DE CEPAS

Para mantener una cepa por un tiempo breve, tomar una porción importante de cultivo con un hisopo estéril, colocarlo en un tubo con 5 ml de Cary-Blair semisólido. Conservar a 4°C. En estas condiciones el microorganismo se mantiene viable durante una semana. Para recuperarlo, sembrar con un hisopo una placa de agar sangre o agar Brucella con 5% de sangre

CRIOCONSERVACION

CMSOP 008 (Normas Internacionales)

De colonias aisladas sembrar la superficie de una placa agar Brucella con sangre o agar sangre, incubar durante 48 horas a 42 °C en microaerofilia.

Cosechar el desarrollo de la placa en caldo brucella-sangre-FBP con 15% de glicerina. Distribuir la suspensión en alícuotas de 0,5 ml en criotubos. Congelar a una temperatura de -70°C. Las cepas se mantienen viables durante un año.

Pararecuperarlas, transferir el contenido de un vial a un tubo con 10 ml de caldo Brucella-sangre-FBP, incubar 48 horas a 42°C en microaerofilia y a partir de ahí, aislar en placas de agar Campy-sangre, agar Brucella-sangre o agar sangre.

Coservación en Medio con Glicerol^(*)

Una ansada de cultivo fresco se deposita en un vial conteniendo 0,5 ml. de caldo triptosa-fosfato con 5% de suero equino inactivado estéril y 17% de glicerol tindalizado.

Se congela a -70°C o en nitrógeno líquido antes de los 20 minutos.

Para recobrar el microorganismo, se descongela a temperatura ambiente e inmediatamente se siembra en una placa de agar sangre.

Otro medio que se puede utilizar es: Caldo Brucella 85 ml adicionado de Glicerol 15 ml.

El tiempo de sobrevida es de un año a -20°C y tres años a -70°C

^(*) Dr. Horacio Terzolo - INTA, Balcarce

CONSERVACION A TEMPERATURA DE REFRIGERACIÓN

Medio Campy huevo^(*).

Caldo Brucella	28 gr
Agar- agar	1,5 gr
Metabisulfito de sodio	0,05 gr
Sulfato ferroso	0,05 gr
Piruvato de sodio	0,05 gr
Agua destilada c.s.p	100 ml

Preparar 200 ml del medio, autoclavar y adicionar un huevo esteril (lavar bien un huevo, colocar en alcohol por 2-3 horas, cascar sobre un mortero estéril, batir y adicionar al medio) Fraccionar en viales.

Conservar a 4°C durante tres meses. Es necesario controlar esterilidad a 37°C durante 24 – 48 horas.

Medio de Wang

Caldo Brucella con 0,5% de agar y 10% de sangre desfibrinada de oveja.

Inocular el cultivo por punción.

Incubar durante 24 horas a 42°C en microaerofilia.

Ajustar las tapas y sellar, los cultivos. Se mantienen viables durante 3 semanas a temperatura ambiente. Mayor tiempo por refrigeración.

^(*) Dr. Heriberto Fernandez - Univ. Austral de Chile

ANEXO II

MEDIOS DE CULTIVO Y CALDOS DE ENRIQUECIMIENTO

MEDIOS DE CULTIVO

PREPARACION DE ALGUNAS DROGAS ANTIMICROBIANAS PARA ADICIONAR A LOS MEDIOS DE CULTIVO

CEFALOTINA (Puede usarse cefazolina o cefoperazona)

Concentración final: 15 µg/ml

Disolver 500 mg de la droga en 50 ml de agua destilada o solución tamponada.

Adicionar 1,5 ml de solución madre por litro de medio.

RIFAMPICINA

Concentración final: 10 µg/ml

Disolver 500 mg de rifampicina en 5 ml de dimetilformamida o metanol y adicionar 45 ml de agua destilada o solución tamponada (buffer fosfato).

Adicionar 1 ml de solución madre por litro de medio.

COLISTIN

Concentración final: 1 µg/ml (10000 U.I./ml)

Disolver 100 mg de Alficetin son solución al 505 de glicerina.

Adicionar 0,1 ml de solución madre por litro de medio.

VANCOMICINA

Concentración final: 20 µg/ml

Disolver 500 mg de vancomicina en 50 ml de agua destilada.

Adicionar 2 ml de solución madre por litro de medio.

Las soluciones se pueden fraccionar en tubos con el volumen que se va adicionar al medio de cultivo; agregar a cada tubo 5 a 6 gotas de glicerol estéril. Mantener a -20°C hasta el momento de su uso.

MEDIO DE SKIRROW (para 1000 ml)

Agar Brucella	43 gr
Mezcla antibiótica:	
Vancomicina	10 mg
Polimixina B	2500 U.I.
Trimetropin	5 mg

MEDIO SKIRROW MODIFICADO (para 1000 ml)

Agar Brucella 43 gr

Mezcla antibiótica:

Vancomicina 10 mg
Polimixina B 2500 U.I.
Trimetroprim 5 mg
Cefalotina 10 mg

Suplemento FBP:

Sulfato ferroso 0,5 gr
Metasulfito de Na 0,5 gr
Piruvato de Na 0,5 gr
Sangre: 50 ml

Nota: El suplemento FBP se puede agregar al medio antes de autoclavar, pesándolo en el momento (0,5 gr por litro de cada componente), o bien preparar una solución madre pesando 5 gr de cada componente en 100 ml de agua destilada. Se esteriliza por filtración y se guarda en frasco oscuro hasta 3 meses. Agregar 10 ml de solución por litro de medio.

MEDIO DE BUTZLER

Caldo tioglicolato 30 gr
Agar agar 12 gr

Mezcla antibiótica:

Bacitracina 25000 U.I.
Novobioncina 5 mg
Cicloheximina 50 mg
Colistin 10000 U.I.
Cefazolina 15 mg
Sangre 150 mg

MEDIO DE PRESTON

Caldo nutritivo N° 2 (OXOID)

Agar agar 12.0 gr

Mezcla antibiótica:

Polimixina B 2500 U.I.
Trimetroprim 10 mg
Actidiona 100 mg
Rifampicina 10 mg
Sangre 50 ml

MEDIO CAMPY-BAP (BLASER)

Agar Brucella	43 gr	
Mezcla antibiótica:		
Vancomicina	10 mg	
Polimixina B	2500 U.I.	
Anfotericina	2 mg	
Trimetroprim		5 mg
Cefalotina	15 mg	
Sangre	50 ml	
Otra mezcla antibiótica:		
Vancomicina	10 mg	
Cefoperazona	32 mg	

MEDIO CDC (Blood-free agar) (para 1000 ml)

Caldo nutritivo N° 2	2,5 g.
Carbón	4 g.
Caseina hidrolizada	3 g.
Desoxicolato de sodio	1 g.
Sulfato ferroso	0,25 g.
Piruvato de sodio	0,25 g.
Agar	12 g.
Mezcla antibiótica:	
Cefoperazona	0,032 g.
Anfotericina B	0,010 g.

MEDIO DE TRANSPORTE

CARY BLAIR

Tioglicolato de sodio	1,5 gr
Fosfato disódico	1,1 gr
Cloruro de sodio	5 gr
Agar	5 gr
Cloruro de Calcio (sol 1%)	9ml
Agua destilada	991 ml
Ph	8,4

MEDIOS PARA TIPIFICACION

MEDIO PARA DETECCION DE SH₂

Caldo nutritivo N° 2 (OXOID)	2,5 gr
Agar agar	0,12 gr
Sulfato ferroso	0,5 gr
Metabisulfito de sodio	0,05 gr
Piruvato de sodio	0,05gr
Agua destilada	100 ml

AGAR BRUCELLA 1% GLYCINA

Caldo brucella	28 gr
Citrato de sodio	0,1 gr
Agar	1,8 gr
Glycina	10 gr
Solución 0,2 % rojo neutro	10 ml
Agua destilada	1000 ml
PH	7,0

AGAR BRUCELLA CINA 3,5%

Fórmula similar al medio con glycina. En lugar de glycina agregar 30 gr de cloruro de sodio.

CALDOS DE ENRIQUECIMIENTO

CALDO PRESTON

Peptona	10 gr
Cloruro de sodio	5 gr
Piruvato de sodio	0,25 gr
Metabisulfito de Na	0,25 gr
Sulfato ferroso	0,25 gr
Polimixina B	5000U.I.
Trimetroprim	10 mg
Rifampicina	10 mg
Cicloheximida	100 mg
Agua destilada	1000 ml
Sangre equina	50 ml

CALDO BOLTON

Peptona de carne	10 gr
Lactoalbúmina	5 gr
Extracto de levadura	5 gr
Cloruro de sodio	5 gr
Hemina	10 mg
Ac. Alfa cetoglutámico	1 gr
Piruvato de sodio	0,5 gr
Metabisulfito de Na	0,5 gr
Carbonato de sodio	0,6 gr
Cefoperazona	20 mg
Vancomicina	20 mg
Cicloheximida	50 mg
Agua destilada	1000 ml
Sangre equina	50 ml

CALDO HUNT

Caldo nutritivo N°2	25 gr
Extracto de levadura	6 gr
Agua destilada	950 ml
Suplemento FBP	4 ml
Vancomicina	10 mg
Trimetroprima	12,5 mg
Cefoperazona	15 mg
Anfotericina	2 mg
Sangre equina	50 ml

CALDO PARK and SANDERS

Medio base:

Triptona	10 gr
Peptona P	10 gr
Glucosa	1 gr
Extracto de levadura	2 gr
Citrato de sodio	1 gr
Cloruro de sodio	5 gr
Metabisulfito de Na	0,1 gr
Agua destilada	1000 ml

Solución antibiótica A:

Trimetroprima	0,1 gr
Caldo brucella	50 ml
Vancomicina	0,1 gr

Medio completo:

Medio base	950 ml
Sangre equina	50 ml
Solución antibiótica A	5 ml

BIBLIOGRAFIA

Fernandez H., Martin T., Thibaut J., *Campylobacter* y *Campylobacter coli* resistentes a fluoroquinolonas en animales domésticos. Arch Med. Vet. XXVIII, N° 1, 1996

Fernandez H., Trabulsi L. Invasive and enterotoxic properties in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from humans and animals. Biol. Res. 28: 205-210. 1995

Fernandez H., Thermotolerant *Campylobacter* species associated with human diarrhea in Latin America. Journal of the Brazilian Association for the advancement of science. Volume 44(1) January/February 1992

Hubert P., Gijs J., Zwinderman A., Reijden T., Comparison of six media. including a semisolid agar for isolation of various *Campylobacter* species from stool specimens. J. of Clin Microbiol. p 1007-1010. May 1991

Lastovica A., Roux E. Penner J. "*Campylobacter upsaliensis*" isolated from blood cultures of pediatric patients. Journal of clin. Microbiol. p 657-659. Apr. 1989

Nachamkin I., Barbagallo S., Culture confirmation of *Campylobacter* spp. by latex agglutination. J. of Clin. Microbiol. p 817-818. 1990.

Pinto, A. M., Aplicación del método de filtración para la detección de *Campylobacter* spp en heces. Fundación Instituto de Tecnología de Alimentos, Agosto de 1999, Sucre-Bolivia

Rosef O., Gondrosen B., Kapperud G., Underdal B., Isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from domestic and wild mammals in Norway. Applied and Environmental Microbiology. p 855-859. Oct. 1983

Reina J., Análisis de los mecanismos de patogenicidad y virulencia descritos en las campilobacterias, Enferm Infec. Microbiol. Clin. Volumen 11. Número 9. Nov 1993.

Sanchez R., Fernandez V., Diaz M., Muñoz P., Evolution of susceptibilities of *Campylobacter* spp. to quinolones and macrolides. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. p 1879-1882. Sept 1998

Wempe J., Genigeorgis C., Farver T., Yusufu H., Prevalence of *Campylobacter jejuni* in two California chicken processing plant. Applied and Environmental Microbiology. p 355-359. Feb 1983

Yusufu H., Genigeorgis C., Farver T., Wempe J. Prevalence of *Campylobacter jejuni* at different sampling sites in two California Turkey processing plants. Journal of Food Protection, vol 46 No 10 pag. 868-872. Oct. 1983