

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

Determinación de resistencia antimicrobiana en cepas
guatemaltecas de *Gampylobacter jejuni*



Wanda Patricia González Pérez

Para optar al título de
QUIMICA BIOLOGA

Guatemala, febrero de 2,001

DL
06
T(2110)

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANA	Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta
SECRETARIO	Lic. Oscar Federico Nave Herrera
VOCAL I	Dr. Oscar Manuel Cobar Pinto
VOCAL II	Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda
VOCAL III	Dr. Federico Adolfo Richter Martínez
VOCAL IV	Br. César Alfredo Flores López
VOCAL V	Br. Manuel Aníbal Leal Gómez

DEDICO ESTA TESIS

A DIOS

A LA VIRGEN MARIA

A MIS PADRES

Vilma Patricia Pérez Mollinedo
Mario Enrique González Monzón

A MI HERMANA

Luisa Fernanda González Pérez

A

Robins Antonio González J

A MI FAMILIA EN GENERAL

A MIS AMIGOS

Juanita, Paola, Osberth, Mariano,
Dalia, Rosario, Mirla, René Miguel,
Sergio, Roberto, Cedric

A MIS COMPAÑEROS DE PROMOCION

ACTO QUE DEDICO

A GUATEMALA

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

A LA ESCUELA DE QUIMICA BIOLOGICA

AL INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTROAMERICA Y PANAMA (INCAP)

A MI MADRE, Vilma Patricia Pérez Mollinedo

AGRADECIMIENTOS

A MIS ASESORES, LICDA. OLGA TORRES DE MATUTE Y LIC. RAFAEL PRATDESABA ZEA

AL PERSONAL TECNICO DEL INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTRO AMERICA Y PANAMA (INCAP)

AL INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTRO AMERICA Y PANAMA (INCAP)

AL HOSPITAL NACIONAL DE SAN MARCOS

AL DR. LOUIS A. BOURGEOIS

A JUANA INES PRATDESABA, KAREN CONTRERAS, MARIA ELISA REYES Y ROSARIO HERNANDEZ

A TODAS LAS PERSONAS QUE HICIERON POSIBLE LA REALIZACION DE ESTA TESIS

INDICE

	<i>No. Pagina</i>
I. Resumen	1
II. Introducción	2-3
III. Antecedentes	4-23
A Generalidades	4
B Epidemiología	4-8
1. Distribución Geográfica	5
2. Estacionalidad	5
3. Fuentes de Transmisión	6
4. Relación con la edad	6-7
5. Incidencia	7-8
C Características Clínicas	8-10
D Fisiopatología	10-11
E Aislamiento e Identificación	11-14
1. Transporte y Almacenamiento	11
2. Preenriquecimiento y Enriquecimiento	12
3. Aislamiento	12-14
4. Identificación	14-15
F Tratamiento	15-19
1. Antimicrobianos de Elección	15-19
G Resistencia Antimicrobiana	19-24
IV. Justificación	25
V. Objetivos	26
VI. Hipótesis	27
VII. Materiales y Métodos	28-41
A Universo de Trabajo	28
B Muestra de Trabajo	28
C Recursos	28-31
1. Humanos	28

2. Institucionales	28
3. Físicos	29-31
D Diseño de Investigación	31-32
1. Tipo de Muestreo	31
2. Proceso de Definición de la Muestra	31
E Procedimiento	32-41
1. Obtención de Cepas	33
2. Aislamiento e Identificación de las Cepas	33-36
3. Recuperación de Cultivos Stock	36
4. Almacenamiento de Antibióticos en Polvo	37
5. Preparación de Soluciones Stock de Antibióticos	37
6. Preparación de las Soluciones Estándar de los Antibióticos a utilizar	37
7. Composición del Medio de Cultivo	37-38
8. Inoculación de los Medios de Cultivo	38
9. Incubación de los Medios de Cultivo	38
10. Interpretación de Resultados	38
11. Evaluación de la recuperación de cepas de <i>C. jejuni</i> autóctonas de Guatemala con 5 diferentes suplementos comerciales y el método de filtración	39-41
F Análisis de Datos	41
VIII. Resultados	42-43
IX. Discusión de Resultados	44-50
X. Conclusiones	51-52
XI. Recomendaciones	53-54
XII. Referencias	55-61
XIII. Anexos	62-85

I. Resumen

En el presente estudio se evaluó la resistencia antimicrobiana de cuatro agentes antimicrobianos de elección para el tratamiento de infecciones causadas por *Campylobacter jejuni*. Se utilizaron 106 cepas de las cuales 100 fueron aisladas durante los años de 1,987 a 1,989 en un estudio de diarrea persistente realizado por el INCAP en el municipio de Santa María de Jesús, Departamento de Sacatepéquez. Las otras seis cepas se aislaron durante 1,998 a 2,000 de estudios realizados en el INCAP.

Se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina y ampicilina; con el fin de establecer la presencia de resistencia antimicrobiana *in vitro* de cepas guatemaltecas de *C. jejuni* y hacer una comparación de los rangos de resistencia de las cepas obtenidas entre 1,987 y 2,000.

Los resultados obtenidos mostraron que las cepas aisladas durante los años de 1,987 a 1,989 no presentan rangos de resistencia tan elevados como los que presentan las cepas aisladas de 1,998 a 2,000. En el primer grupo se encontró un 3 por ciento de cepas resistentes a la eritromicina, 1 por ciento a la ciprofloxacina y tetraciclina y 2 por ciento para la ampicilina. En las cepas aisladas en 1,999 y 2,000 se observó un 16.7 por ciento de resistencia para la eritromicina, 33.3 por ciento para la ciprofloxacina y 50 por ciento para la tetraciclina y ampicilina. De acuerdo con los resultados se puede observar que la eritromicina sigue siendo el agente antimicrobiano de elección para el tratamiento de infecciones causadas por *C. jejuni*, ya que presenta mejor acción antimicrobiana contra el microorganismo.

C. jejuni es un microorganismo fastidioso, por lo que su aislamiento a partir de muestras clínicas es difícil (1, 2). En el presente trabajo el aislamiento de las cepas durante los años de 1,998 al 2,000 fue muy bajo, por lo que se realizó una evaluación de la capacidad de aislamiento de los medios de cultivo disponibles comercialmente y del método de filtración, observándose que el método de filtración por membrana es de gran ayuda para obtener una mejor recuperación del microorganismo a partir de muestras clínicas, y además de ser un método muy sensible, no requiere de medios de cultivo selectivos para efectuarlo, ni tampoco de incubadoras con temperatura de 42°C (1, 3).

II. Introducción

Las infecciones bacterianas y en general, las enfermedades diarreicas son uno de los principales problemas de salud en Guatemala. En el país prevalecen las condiciones necesarias para el desarrollo de estas enfermedades; tanto las condiciones sanitarias como nutricionales en las que se encuentra la población en general y sobre todo la población infantil, son deficientes, y predisponen a infecciones gastrointestinales por diferentes agentes patógenos.

Campylobacter jejuni es un bacilo Gram negativo que se ha reconocido como el principal agente causal de la campilobacteriosis, infección que se adquiere por el consumo de comida y agua contaminada. Las manifestaciones clínicas más importantes de esta infección son la diarrea acuosa con abundante cantidad de leucocitos, dolor abdominal y fiebre; en ocasiones se puede presentar disentería con sangre y moco (1, 2, 5-9).

En el país son pocos los estudios que se han realizado sobre *C. jejuni* y por lo general se enmarcan en características epidemiológicas del microorganismo. En una investigación realizada en el municipio de Santa María de Jesús, Departamento de Sacatepéquez durante los años de 1,988 a 1,989, se aisló del 12.1 por ciento de niños con diarrea, del 8.1 por ciento de niños asintomáticos y fue la causa del 7 por ciento de disenterías (5, 9). De estos casos, el 11 por ciento evoluciona a episodios diarreicos de más de 14 días de duración, conocidos como persistentes. En el 9 por ciento de las muestras de niños sanos se detectan infecciones múltiples; de los niños con diarrea el 20 por ciento presenta diarrea aguda y el 46 por ciento diarrea crónica (9). En otro estudio realizado en una de las áreas marginales de la ciudad de Guatemala, en la colonia "El Limón" zona 18, se le reporta como uno de los cinco agentes etiológicos de diarrea más importantes. En este estudio fue aislado del 9.5 por ciento de muestras de niños con diarrea y en 1.0 por ciento de los controles (10).

En trabajos realizados en diferentes países se ha observado que en los últimos años *C. jejuni* ha desarrollado cierto grado de resistencia a los antimicrobianos de uso común como la eritromicina, ciprofloxacina, ampicilina, gentamicina, cloranfenicol y otros (8 - 12).

Esta infección es autolimitante en la mayoría de los casos, por lo que normalmente no se administran antimicrobianos para su tratamiento; pero en niños y pacientes inmunosuprimidos en quienes la infección puede ser severa, se hace necesaria la terapia con antimicrobianos y es aquí donde el conocimiento de la eficacia que tiene cada antimicrobiano contra *C. jejuni* es sumamente importante (1, 2, 13, 15).

En el presente estudio se analizaron cepas aisladas de 1,987 a 1,989 de niños menores de cinco años con y sin diarrea, habitantes de Santa María de Jesús, Departamento de Sacatepéquez y cepas que fueron aisladas de niños menores de cinco años de las pediatrias de los principales Hospitales Nacionales del país y de los estudios de diarrea que se realizan en el INCAP.

Estas cepas se enfrentaron a los antibióticos de uso común como lo son la eritromicina, tetraciclina, ciprofloxacina y ampicilina para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y establecer el grado de resistencia a antimicrobianos que puede presentar este microorganismo.

En Guatemala el uso de agentes antimicrobianos para contrarrestar los efectos de las infecciones bacterianas es indiscriminado y continuamente se incrementa. Se supone que los patrones de resistencia han variado a través de los años por lo que también se realizó una comparación entre los rangos de resistencia antimicrobiana presentados por los dos grupos de cepas estudiados: el primero, las cepas aisladas durante los años de 1,987 a 1,989 y el segundo grupo, las cepas aisladas durante los años de 1,998 a 2,000.

Además, se evaluó la sensibilidad de los medios de cultivo para el aislamiento de *C. jejuni*. Se comparó el aislamiento obtenido con 5 de los medios de cultivo disponibles comercialmente, entre ellos Butzler, Skirrow, karmali, Blaser Wang, Preston y también el método de filtración por membrana, en diferentes condiciones de cultivo.

III. Antecedentes

A. Generalidades

Campylobacter jejuni es un bacilo delgado, Gram negativo, no formador de esporas, de apariencia curva o en forma de "gaviota". Presenta uno o dos flagelos polares para su movilidad y es microaerófilico. Es un microorganismo fastidioso que para su crecimiento requiere de una baja tensión de oxígeno (3 a 15 por ciento), CO₂ (3 a 5 por ciento) y 85 por ciento de nitrógeno (1, 2). Una característica importante de este microorganismo es que se desarrolla bien a 42°C (1, 2, 6-8).

Esta bacteria es sumamente sensible al peróxido de hidrógeno y a los iones superóxido que aparecen en los medios de cultivo cuando estos se exponen al aire y a la luz; también es sensible a la desecación, a concentraciones de sal mayores del 2 por ciento, a condiciones ácidas (pH menor de 5) y a la presencia de oxígeno (1). No oxida ni fermenta los azúcares (2, 7).

La identificación de *C. jejuni* por lo general se lleva a cabo por sus requerimientos nutritivos y de microaerofilia, tolerancia a temperaturas de 42°C y patrón de susceptibilidad a ciertos agentes antimicrobianos como el ácido nalidíxico y la cefalotina (Tabla No. 1) (1, 2, 17).

B. Epidemiología:

Campylobacter jejuni es una bacteria enteropatógena, a la que se le ha reconocido como uno de los más importantes agentes etiológicos causantes de diarrea aguda en todo el mundo, particularmente en países en desarrollo (1, 2, 5, 9, 10, 12, 17, 19-22). Además, en estudios recientes realizados en áreas marginales de Guatemala, se le ha reconocido como uno de los agentes causales de una importante proporción de enfermedades diarreicas, encontrándosele en el 9.5 por ciento de los especímenes de niños con diarrea, de forma similar a rotavirus, adenovirus, *Salmonella* sp. *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli* enterotoxigénica y *E. coli* enteroadherente (10). Se ha considerado que la duración de los episodios de diarrea causados por *C. jejuni* es de 6 a 7 días (10).

Se ha observado que luego de una infección por *C. jejuni* se desarrollan anticuerpos contra este microorganismo, los cuales son del tipo IgA y sus niveles en suero

aumentan con la edad de la persona. Los antígenos de superficie de esta bacteria son los responsables del desarrollo de estos anticuerpos (2, 5, 8, 20).

Algunos estudios indican que la alta incidencia de infección no asociada con diarrea en niños mayores es un reflejo de la comunidad rural, que adquieren al principio de la vida, asumiendo que la infección en edades tempranas produce un estímulo antigénico a nivel intestinal que previene la diarrea en edades posteriores. Dentro de los microorganismos asociados con este argumento se encuentra *C. jejuni* aunque estos datos todavía no son concluyentes (20, 23).

1. Distribución Geográfica:

Es un microorganismo de distribución cosmopolita, pero se le encuentra con mayor frecuencia en zonas templadas y tropicales (6). Es muy frecuente su aislamiento en países en desarrollo (1, 6, 20, 21). También se le ha reconocido como la bacteria enteropatógena más común en países desarrollados, así se ha podido observar que en estudios recientes se le reporta en Estados Unidos como la causa del 21.7 por ciento de los casos de diarreas en la población en general (1, 12, 24).

2. Estacionalidad:

En los países desarrollados las infecciones aumentan durante la época lluviosa y los meses de otoño, aunque se han reportado aislamientos en los meses de abril a junio. Por lo general, los casos son esporádicos y las infecciones recurrentes y crónicas se presentan con mayor frecuencia en pacientes inmunocomprometidos y en personas que viven en condiciones sanitarias deficientes (1, 2, 11, 19, 25, 26). En países en desarrollo las infecciones son menos estacionales, el microorganismo se aísla durante todos los meses del año y las infecciones aumentan en los meses de invierno (1, 6, 19). En Guatemala durante los años de 1985 y 1986 se aisló únicamente en los meses secos, al igual que *Cryptosporidium* (6).

La variabilidad en la estacionalidad de *C. jejuni* en países en desarrollo, puede deberse a que la población en general está constantemente expuesta al agente causal de la infección (19).

3. Fuentes de Transmisión:

Las infecciones por *C. jejuni* se han asociado con la ingestión de alimentos mal cocidos, especialmente pollo y sus derivados. También se pueden mencionar el agua y leche contaminadas los cuales son vehículos importantes para la transmisión del microorganismo al ser humano (1, 2, 6, 7, 12, 25, 28, 29).

Se han realizado diversos estudios en los que se ha relacionado la presencia de infecciones con la presencia de aves en las viviendas de personas infectadas, así como con el consumo de agua no potable (1, 6, 8). También se ha encontrado en el tracto gastrointestinal y excretas de perros, gatos, ovinos y bovinos, por lo que se considera a estos animales al igual que las aves de corral los reservorios más importantes de la infección en el humano. Por esta razón, a esta enfermedad se le ha considerado una zoonosis (2, 6-8, 25). En Guatemala, en Santa María de Jesús, se analizaron por ribotipia, cepas de *C. jejuni* aisladas en distintas oportunidades del mismo niño. Estos resultados indican que los niños no están persistentemente infectados por una cepa particular, sino que fueron re infectados por cepas distintas, de ribotipos diferentes, en cada ocasión. Esto se debe en gran parte a que en los hogares de estos niños hay fecalismo al aire libre y contaminación con heces de aves y demás animales domésticos (8, 20).

La incidencia de este microorganismo en la carne de pollo y la producción de la misma se ha incrementado en los últimos años, aislándose en un 45.9 por ciento de las carcasas y en los últimos tres años se ha incrementado la resistencia a las quinolonas (18, 27).

4. Relación con la edad:

La infección por especies de *Campylobacter* es frecuente en niños, pacientes inmunosuprimidos y viajeros provenientes de países desarrollados. La incidencia de la enfermedad presenta una distribución etaria bimodal, con la mayor incidencia en niños y un segundo aumento en adultos de 20 a 40 años de edad (1, 2, 10, 15, 19). En Guatemala, una cohorte de 400 turistas en quienes se buscó *C. jejuni* durante su estancia en Antigua Guatemala entre los meses de mayo de 1,998 a septiembre de 1,999, presentó únicamente dos aislamientos de *C. jejuni*.

En Portugal, durante los años de 1984 a 1989, se observó una mayor incidencia en niños menores de un año; en comunidades africanas fue mayor en niños menores de tres años y en regiones de Chengdu, China en niños de uno a dos años pero, en general, se ha reportado que es en los primeros cinco años de vida cuando se da con mayor frecuencia (10, 11, 20, 26, 30).

También se ha observado que los grupos afectados en áreas urbanas son de mayor edad que los grupos de áreas rurales (31). Otro aspecto importante es que se ha aislado con mayor frecuencia de hombres que de mujeres, en una proporción de 2:1 (4, 6, 11, 19).

5. Incidencia:

La incidencia de infecciones por *C. jejuni* en países en desarrollo es mucho mayor que en países desarrollados. En Estados Unidos, según estudios hechos por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC), se estima que el rango de infección es del 1 por ciento, datos que son similares a los reportados en el Reino Unido (1). Otros estudios reportan que en Inglaterra se ha aislado del 5 por ciento de pacientes con diarrea (1, 25).

En los países en desarrollo se han efectuado pocos estudios que establezcan la incidencia de *C. jejuni* pero pueden mencionarse algunas partes de Asia, Africa y Latinoamérica, en donde en general se observan aislamientos del 10 al 20 por ciento en la población en general, siendo especialmente afectada la población infantil (11, 26). En Singapur se ha aislado a *C. jejuni* de un 1.2 por ciento, en Nigeria un 5.2 por ciento, en Harare un 9.3 por ciento y en China un 11.36 por ciento de personas con diarrea (11, 26, 31, 33).

En Guatemala Cruz y colaboradores reportan a *C. jejuni* como causante del 12.1 por ciento de infecciones sintomáticas, 8.1 por ciento de infecciones asintomáticas y 7 por ciento de las disenterías de un área rural del país (5). En otro estudio efectuado por el mismo autor en las áreas marginales de la ciudad de Guatemala, se le reporta como el 9.5 por ciento de los especímenes de niños con diarrea (10). Torres MA, lo reporta como la causa del 10 por ciento de las diarreas en niños menores de cinco años (17). También, Torres OR y colaboradores lo reportan como el 5.6 por ciento de diarreas en áreas

urbano-marginales de Guatemala. El 10.7 por ciento de diarreas agudas y el 18.2 por ciento de diarreas persistentes, estos últimos datos en el área rural del país (5, 10).

Un dato importante observado en estudios hechos en Guatemala es que el consumo de grasa se asocia más con el desarrollo de disentería que con diarreas acuosas o asintomáticas por *C. jejuni*. Esto puede deberse a que las grasas favorecen la multiplicación bacteriana en comidas contaminadas o en el intestino humano como sucede con otros microorganismos (5).

Se ha observado que *C. jejuni* se aísla más frecuentemente que otros patógenos entéricos como *Salmonella* sp. y *Shigella* sp., y con la misma frecuencia que Rotavirus y *E. coli* enterotoxigénica (5, 6, 8, 29). Además, se ha observado que es frecuente encontrar a *C. jejuni* en infecciones mixtas en compañía de otros patógenos entéricos como *Shigella* sp., rotavirus y *Giardia lamblia* (10).

Campylobacter jejuni se ha aislado tanto de personas asintomáticas como también de personas que presentan sintomatología característica. Se cree que este aislamiento de la bacteria de personas asintomáticas es una característica importante, ya que quienes no presentan signos clínicos de infección son reservorios del microorganismo. En el caso de los lactantes se encuentran protegidos por la leche materna (2, 23, 34). Las infecciones asintomáticas ocurren por lo general en habitantes de países en desarrollo quienes están expuestos constantemente al vehículo de transmisión, como se ha reportado en México, Bangladesh, Chile, República Centroafricana y la India (8, 32, 34). Mientras que en países desarrollados se observa que la infección está casi invariablemente asociada a enfermedad (8, 34). Se ha reportado una incidencia del 5 al 14 por ciento en pacientes con sintomatología de la infección y de un 1 por ciento en pacientes asintomáticos (6). *C. jejuni* también es una importante causa de diarreas del viajero con similar importancia a *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) (2, 12, 32).

C. Características Clínicas:

Una diarrea invasiva puede definirse como la respuesta del tracto gastrointestinal humano a patógenos entéricos como bacterias (entre las que puede mencionarse *Shigella* sp., *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp. y *E. coli* enteroinvasiva), virus (rotavirus) y parásitos (*Entamoeba histolytica* y *Trichuris trichiura*) que tienen la capacidad de invadir y

dañar la mucosa del intestino delgado y/o el intestino grueso. Solamente aquellos patógenos capaces de invadir y dañar la mucosa del intestino grueso y el recto producen las manifestaciones clínicas de la disentería (28, 35, 36).

Por lo general, la afección causada por *C. jejuni* es una enteritis inflamatoria aguda, aunque en algunos casos de infecciones severas se pueden presentar cuadros clínicos de disentería aguda, con sangre y pus en las heces (19, 20, 35, 36). Los síntomas más prominentes son diarrea secretoria, dolor abdominal y fiebre. La manifestación más característica de la enfermedad es el dolor abdominal (1, 5, 6, 19, 35, 36). Además, pueden presentarse calambres, vómitos y malestar como mialgia, artralgia y cefalea (2, 6, 35).

En el cincuenta por ciento de los pacientes las heces son acuosas, sanguinolentas, de tipo exudativo, siendo esta una de las principales razones por las que se busca asistencia médica (6, 32, 35, 37, 38). La diarrea puede empezar gradualmente o en forma explosiva, la frecuencia de deposiciones puede ser de unas pocas hasta 20 por día (2, 6). Como anteriormente se mencionó, en algunos casos puede haber disentería, la cual implica deposiciones muy frecuentes y escasas, acompañadas de sangre y moco, con tenesmo o dolor al defecar. Estos signos y síntomas implican una invasión inflamatoria de la mucosa colónica por la acción destructiva de bacterias o citotoxinas liberadas por *C. jejuni* (2, 6). Los vómitos pueden ocurrir en una tercera parte de las personas afectadas, no son intensos ni se asocian con deshidratación (6).

El período de incubación de la infección es de 1 a 7 días, y tanto este como la gravedad de la enfermedad dependen de la dosis infecciosa ingerida. La infección dura aproximadamente de 1 a 3 días, aunque puede durar de una hasta tres semanas (2, 7, 8, 37, 39). La dosis infecciosa mínima para adquirir la enfermedad es de 500 a 1,000 células bacterianas; algunos autores sugieren que son suficientes 400 a 500 células bacterianas para causar la infección (1, 2, 8, 39). La excreción del microorganismo en el período de convalecencia por lo general es corta de dos a tres semanas y se disminuye con la administración de tratamiento en dos o tres días (37, 39). Los pacientes infectados excretan de 10^6 - 10^9 bacterias por gramo de heces por 2 a 3 semanas, en algunas ocasiones aún cuando se ha administrado el tratamiento (8, 39).

En países en desarrollo la enteritis por *C. jejuni* puede ser muy severa y se ha sugerido que la enfermedad tiene una epidemiología y manifestaciones clínicas completamente diferentes a las observadas en países desarrollados debido a los diferentes patrones serológicos que presenta la bacteria (19, 21).

En estudios recientes se ha puesto en evidencia una asociación entre una infección previa por el microorganismo y el desarrollo del Síndrome de Guillain-Barré como una de las secuelas de la infección (1, 12, 19).

D. Fisiopatología:

Las enteritis pueden presentarse clínicamente de diferentes formas dependiendo de los signos clínicos observados durante la infección. La presencia de diarrea aguda, dolor abdominal, fiebre y la presencia de sangre y leucocitos en las heces son características de la infección por un microorganismo invasivo (1, 28). La diarrea no inflamatoria y acuosa es característica de un microorganismo productor de enterotoxinas (28). Se ha demostrado que *C. jejuni* tiene una naturaleza invasiva por la inducción de diarrea secretoria y producción de toxinas, que se presentan como importantes factores de virulencia (1, 2, 6, 8, 21, 38).

Se ha sugerido que son tres los factores de virulencia que se presentan: la invasividad, producción de enterotoxinas y producción de citotoxinas. Los signos clínicos de la enfermedad y las evidencias experimentales indican que la patogenicidad del microorganismo surgen de la combinación de los tres factores de virulencia y no de la acción de uno sólo (2, 8, 38). Para la colonización son cruciales los flagelos, los cuales incrementan la adherencia del microorganismo y gracias a su motilidad permiten que los microorganismos atraviesen la capa mucosa que cubre la superficie del intestino. Con relación a la producción de enterotoxinas, se ha observado que en cepas aisladas de pacientes con diarrea acuosa, producen una enterotoxina termolábil que está muy relacionada con la enterotoxina colérica, tanto estructural como inmunológicamente. La toxina causa una diarrea secretora por la estimulación de la adenilato ciclasa en la mucosa intestinal y por la alteración del transporte normal de los iones en los enterocitos. La citotoxina producida por algunas cepas de *C. jejuni* provoca una lesión en una variedad de

células de los mamíferos, pero su papel en la enfermedad diarreica en humanos aún no se conoce (1, 2).

La enteritis causada por *C. jejuni* da como resultado la invasión de la mucosa, que se caracteriza por ulceración, formación de abscesos en las criptas y necrosis hemorrágica de íleon y yeyuno. También invade la lámina propia, lo que puede dar como resultado infección de los ganglios linfáticos regionales y ocasionalmente la diseminación de la infección. El examen general de heces durante la infección revela una diarrea hemorrágica en una gran proporción de casos y en general es evidente la presencia de leucocitos (1, 2, 38, 28).

Aunque *C. jejuni* se ha reportado como una de las mayores causas de enfermedad entérica en el mundo, sus mecanismos de patogenicidad no están bien definidos (21, 38). Algunos autores han reportado la producción de una toxina termolábil similar a la producida por *Vibrio cholerae* y otra termoestable a temperaturas de 100°C; por lo que se ha sugerido la posibilidad de que algunas cepas producen ambas enterotoxinas además de una citotoxina. La producción de enterotoxinas indudablemente causa la diarrea líquida sin moco ni sangre, lo cual sería una particularidad de las infecciones causadas por cepas carentes de propiedades invasivas. Por otra parte, se considera que la producción de citotoxinas es la responsable de la diarrea inflamatoria (1, 2, 21, 38).

E. Aislamiento e identificación:

1. Transporte y almacenamiento:

El transporte de muestras en las que se sospecha la presencia de *C. jejuni* implica los siguientes aspectos: esta bacteria muere lentamente a temperaturas entre 10 y 30°C, es susceptible a la desecación excepto cuando se encuentra en refrigeración; se inhibe con concentraciones de sal mayores del 2 por ciento, ambientes ácidos con un pH menor de 5 y la presencia de oxígeno (Tabla No. 1) (1, 2).

El medio de transporte apropiado es el de Cary-Blair y es de utilidad cuando: *C. jejuni* se encuentra en cantidades pequeñas, el paciente ha sido tratado con antibióticos o la muestra no puede procesarse dentro de las primeras 24 horas luego de su recolección. También se hace necesario cuando se utiliza un hisopo rectal para tomar la muestra (1, 39).

2. Preenriquecimiento y enriquecimiento:

El enriquecimiento con sangre de carnero al 7 por ciento es necesario cuando se sospecha que la cantidad de microorganismos presentes en las heces es pequeña; de lo contrario, un cultivo directo sobre un medio de cultivo selectivo como el medio de Butzler o Skirrow es adecuado para muestras de heces (1, 39).

3. Aislamiento:

Campylobacter jejuni es un microorganismo fastidioso, por lo que se requiere de condiciones especiales para su cultivo. Los medios adecuados para su aislamiento incluyen Butzler, Skirrow, Preston, Karmali, Blaser-Wang, medios selectivos que no contengan sangre y Campy-BAP, los cuales contienen suplementos y antibióticos para inhibir el crecimiento excesivo de la microbiota rectal competitiva (1, 2, 3, 8, 39, 40). Algunas cepas de *C. jejuni* también pueden ser inhibidas por antimicrobianos como la cefalotina, colistina y Polimixina B, los cuales pueden estar presentes en los medios selectivos que se utilizan de rutina (Tablas No. 2 y 3) (1, 2).

El medio selectivo de Skirrow fue el primero en utilizarse; este consiste en una base de nutrientes, sangre lisada, trimetoprim, polimixina B y vancomicina (7, 16, 40). Este medio tiene la desventaja de tener poca acción inhibitoria sobre la microbiota fecal permitiendo así el crecimiento de microorganismos como *Proteus* sp., que tiene un crecimiento difuso sobre la superficie de las placas de agar, por lo que el crecimiento de sus colonias dificultan el aislamiento e identificación de *C. jejuni* (7, 16, 40). Otra desventaja del medio Skirrow, es que utiliza 7 por ciento de sangre de caballo lisada, la cual es un poco difícil de obtener, mientras que el medio Campy-BAP utiliza 10 por ciento de sangre de carnero, la cual es más accesible (16). Los antibióticos adicionados a este medio de cultivo son trimetoprim, polimixina B y vancomicina que se usan en concentraciones finales de 10 ug/ml, 5 ug/ml y 250 U/ml respectivamente (7, 16, 40). La polimixina B y el trimetoprim inhiben a las bacterias Gram-negativo y la vancomicina a las bacterias Gram positivo presentes (Tablas No. 2 y 3) (39).

El medio de cultivo Karmali se utiliza para el aislamiento de *C. jejuni* y contiene piruvato sódico, cefoperazona, vancomicina y cicloheximida. Preston, es otro medio de

cultivo que contiene polimixina B, rifampicina, lactato de trimetoprim y cicloheximida, se utiliza agar base para *Campylobacter* y sangre de caballo lisada como enriquecimiento (Tabla No. 3). Este medio selectivo se recomienda para especímenes que se consideran altamente contaminados o con pequeñas cantidades de unidades formadoras de colonias de *C. jejuni* (40).

El medio Blaser-Wang, contiene vancomicina, polimixina B, trimetoprim, anfotericina B y cefalotina. La inclusión de anfotericina B inhibe el crecimiento de *C. albicans* y la cefalotina incrementa la selectividad del medio (Tabla No. 2 y 3) (40).

El medio selectivo Butzler es uno de los que más se utiliza actualmente en Guatemala para el aislamiento de *C. jejuni*. Contiene bacitracina, cicloheximida, sulfato de colistín, cefazolina sódica y novobiocina. Utiliza 7 por ciento de sangre de camero como enriquecimiento y como agar base el agar Columbia (40).

El medio selectivo para *Campylobacter* sp. sin sangre, se prepara a partir de una base de agar con suplementos como caldo nutritivo, desoxicolato de sodio, sulfato ferroso, piruvato de sodio, hidrolizado de caseína, carbón vegetal, y como suplemento inhibitorio cefoperazona. Se recomienda para el aislamiento selectivo de *C. jejuni*, *C. coli* y *C. laridis* de muestras fecales humanas. A este medio de cultivo se le conoce como Agar Desoxicolato Carbón Cefoperazona modificado (CCDA) y se ha desarrollado para reemplazar a la sangre de caballo o de camero (lisada o entera). Se ha observado que el carbón vegetal, el sulfato ferroso y el piruvato de sodio incrementan el crecimiento y aerotolerancia de las especies de *Campylobacter* sp. La modificación a la que se hace referencia en el nombre del medio, es el reemplazo de cefoperazona por cefazolín en el medio original (CCD), debido a que la cefoperazona incrementa la inhibición de contaminantes (Tabla No. 2 y 3) (1, 40).

Los medios de cultivo se incuban a 42°C para evitar el aislamiento de otras especies del género *Campylobacter*, pues *C. jejuni* es el único termófilo capaz de crecer a altas temperaturas y en ambiente microaerófilico con 5 por ciento de O₂, 10 por ciento de CO₂ y 85 por ciento de N₂ (1, 2, 6, 8).

La mayoría de especies de *Campylobacter* requieren de una atmósfera microaerófila, que contenga 5 por ciento de O₂, 10 por ciento de CO₂ y 85 por ciento de

N₂ para su óptima recuperación, para lo cual se pueden utilizar generadores de ambiente microaerofílico, que están disponibles comercialmente (1, 2, 8)

También se utiliza el método de filtración para el aislamiento de este microorganismo; en esta técnica se utiliza un medio no selectivo para su aislamiento. Este método se basa en la capacidad del *Campylobacter* sp. de atravesar una membrana de filtración (con diámetro de aproximadamente 0.45-0.65 μm) con relativa facilidad, gracias a la movilidad del microorganismo, mientras que el resto de la microbiota fecal es retenida sobre la membrana (1, 3). Entre las desventajas de esta técnica se puede mencionar el procedimiento laborioso que requiere, la sensibilidad relativamente baja que tiene comparado con los medios selectivos convencionales y el sobrecrecimiento en las placas de agar de microorganismos de la microbiota fecal como *Proteus* spp. y *Enterococcus* spp. Como consecuencia, se recomienda utilizar un agar selectivo y el método de filtración en combinación para obtener una mejor recuperación de este microorganismo (1, 3).

A pesar de los inconvenientes de este método, en estudios comparativos de aislamiento del microorganismo, se ha observado que los porcentajes de recuperación son similares a los obtenidos con los medios selectivos convencionales, 82 por ciento con el medio de Skirrow, 89 por ciento con el medio mCCDA y 86 por ciento con el método de filtración (3).

4. Identificación:

La identificación de *C. jejuni* se basa en características bioquímicas, patrones de resistencia antimicrobiana, temperatura de crecimiento, movilidad y apariencia microscópica (1, 2, 16). La identificación puede ser difícil por ser un microorganismo fastidioso y asacarolítico, además, son muy pocas las pruebas bioquímicas disponibles para su caracterización. Las pruebas recomendables para la identificación de *C. jejuni* son oxidasa, catalasa, reducción de nitratos y nitritos, ureasa, producción de H₂S, hidrólisis del hipurato y de indoxi-acetato, crecimiento a 15, 25 y 42°C, susceptibilidad al ácido nalidíxico y cefalotina (Tabla No. 1). Aunque hay reportes que indican que se ha presentado resistencia al ácido nalidíxico, por lo que el esquema de identificación se altera (1, 2, 14, 16, 41-43).

La morfología colonial característica del microorganismo puede facilitar su identificación. Las colonias son de aproximadamente 0.5 mm de diámetro, grises y de apariencia húmeda y mucosa que se extienden sobre la superficie del agar. Su crecimiento se lleva a cabo en 24 a 48 horas (1, 2, 6, 8).

También la coloración de Gram puede ser de utilidad para la identificación del microorganismo; se realiza utilizando el Gram modificado con fuchsina carbónica como colorante de contraste (fuchsina de Kinyoun, dilución 1:5) o dejando la safranina por 15 a 30 minutos lo que ayuda a observar su morfología característica (1, 2, 6).

F. Tratamiento:

Los agentes antimicrobianos son químicos de bajo peso molecular que inhiben a las bacterias, al enlazarse a proteínas u organelos bacterianos esenciales. Una característica importante de los antimicrobianos es que son más tóxicos para las bacterias que para los humanos y los animales. Esta diferencia en la toxicidad, se debe a que los sitios de ataque del antibiótico en los humanos y animales son diferentes a los de las bacterias; aunque esto no significa que no tengan efectos tóxicos (47).

1. Antimicrobianos de elección:

La gastroenteritis por *C. jejuni* en personas adultas y sin inmunosupresión es autolimitante, es decir, no requiere terapia con antimicrobianos. Por lo general, sólo se administra un tratamiento de sostén para restablecer el equilibrio hidroelectrolítico y malabsorción intestinal que son manifestaciones propias de la enfermedad (1, 2, 6-8, 15, 22). Los pacientes con gastroenteritis severa, prolongada o reincidente sí deben ser tratados con antimicrobianos y en estos casos la eritromicina, ciprofloxacina y algunas veces las tetraciclinas se utilizan como antimicrobianos de elección (1, 2, 6, 8, 15, 22).

Otros casos en los que la gastroenteritis también debe tratarse son infecciones severas en niños, pacientes que presentan fiebre alta, diarrea sanguinolenta o más de ocho deposiciones diarias (6, 22, 45).

En las infecciones severas se utiliza la eritromicina como antimicrobiano de elección, luego la ciprofloxacina, tetraciclina y en infecciones muy severas o causadas por microorganismos multiresistentes se administra cloranfenicol, cefotaxime o

aminoglucósidos (1, 2, 6, 15, 45). Otro esquema de tratamiento propuesto es el siguiente: primer tratamiento de elección la ciprofloxacina o norfloxacina, luego la eritromicina y por último tetraciclina o clindamicina aunque, las quinolonas no están aprobadas por la FDA para pacientes menores de 18 años excepto en casos en que el tratamiento alternativo no funcione (37).

1.1. Eritromicina:

Es el antimicrobiano de elección en el tratamiento de enteritis causadas por *C. jejuni* (1, 2, 15, 44, 46). Por lo general, se recurre al tratamiento con este antimicrobiano, debido a su baja toxicidad, su facilidad de administración a los niños y la susceptibilidad de *C. jejuni* a este antimicrobiano (15, 45).

La actividad antibacteriana de la eritromicina es esencialmente bacteriostática, porque su mecanismo de acción es inhibir la transpeptidación y la síntesis proteica mediante la unión reversible con las subunidades ribosómicas 50S de los microorganismos susceptibles. Algunos microorganismos resistentes con cambios mutacionales en los componentes de estas subunidades ribosómicas no pueden unirse con este fármaco, lo cual les confiere resistencia (45-48). Esta actividad puede ser bactericida dependiendo del microorganismo o sitio de la infección y la concentración de la droga. Una concentración de 0.12 µg/ml es bacteriostática y cuando se aumenta a 2 µg/ml es bactericida (45, 46). La dosis pediátrica recomendada es: 20-50 mg/Kg/día (Tabla No. 4) (37, 44, 45, 49).

Cuando este medicamento se administra rápidamente al inicio de la infección, disminuye la duración de la enfermedad y previene recaídas (2, 15, 37, 50).

Entre los beneficios observados con este tratamiento está la erradicación del microorganismo de las heces de pacientes tratados con este antimicrobiano, cuya excreción disminuye de 10 días en pacientes no tratados a 2 ó 3 días en pacientes tratados (15, 45).

Se han realizado varios estudios en los que el tratamiento con eritromicina no altera el curso clínico de la enfermedad, pero cuando el tratamiento se inicia en la fase inicial de la infección sí se han observado beneficios clínicos en los pacientes tratados (15, 45).

1.2. Ciprofloxacina:

Es una de las nuevas quinolonas fluorinadas que se han desarrollado en los últimos años. Tiene un amplio espectro contra microorganismos Gram negativo (44-46). Es un antimicrobiano efectivo que se utiliza como alternativa en el tratamiento de gastroenteritis por *C. jejuni* aunque no está completamente aprobada su administración a pacientes menores de 18 años (1, 37).

El primer blanco de acción de todas las quinolonas es la enzima DNA girasa, que es esencial para la replicación del DNA; por lo tanto, su actividad bactericida se basa en la inhibición de la síntesis de DNA de las bacterias (45-47, 49). Su efecto antibacteriano disminuye con valores bajos de pH y la presencia de cationes divalentes como Mg^{2+} y Ca^{2+} (46). Se sabe que la mayoría de microorganismos Gram negativo enteropatógenos son susceptibles a este antimicrobiano, entre ellos *C. jejuni* (45, 46).

Los efectos secundarios más comunes son náusea, vómitos, diarrea y malestar abdominal. Debido a que en estudios realizados en animales se ha demostrado que este antimicrobiano produce un daño irreversible al cartilago y anomalías esqueléticas no se recomienda su uso en pacientes menores de 18 años (44-46). Aún así, se ha reportado que en humanos el uso de fluoroquinolonas en pediatría no causa artropatías y son bien toleradas. Se recomienda su uso cuando no hay antimicrobianos orales disponibles y en infecciones causadas por bacterias Gram negativo multiresistentes y otros patógenos como *Pseudomonas* sp. y *Mycobacterium tuberculosis* (37).

En infecciones severas las dosis recomendadas en pediatría son 30 mg en dos dosis durante el día y para infecciones poco severas o moderadas 20-30 mg dos veces al día (Tabla No. 4) (37, 45).

1.3. Tetraciclina:

Es un antimicrobiano bacteriostático de amplio espectro que inhibe la síntesis de proteínas en microorganismos susceptibles (44-47, 49). Posee un amplio rango de actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativo y Gram positivo. Actúa sobre el ribosoma bacteriano y se ha sugerido que necesita por lo menos de dos procesos para que tenga acción contra las bacterias Gram negativo: el primero es la difusión pasiva a través de los canales hidrófilos formados por proteínas de la membrana celular externa,

cuales digieren el peptidoglican existente de la pared celular. Esto desestabiliza la integridad de la pared celular y provoca la ruptura de la célula bacteriana (46, 47).

Otros antibióticos que son útiles en el tratamiento de la infección por *C. jejuni* son la doxicilina, minociclina y furazolidona. La gentamicina es el tratamiento de elección en las septicemias, aunque la eritromicina, tetraciclina o cloranfenicol pueden ser buenas alternativas (1, 6, 51).

G. Resistencia Antimicrobiana:

La susceptibilidad hacia algún agente antimicrobiano, indica la capacidad de éste, para erradicar a un microorganismo infeccioso, con las dosis normalmente recomendadas, de acuerdo al tipo de infección y las especies infecciosas. La resistencia antimicrobiana indica que el crecimiento de un microorganismo no puede ser inhibido por cierto antimicrobiano a las concentraciones usualmente recomendadas. Un resultado intermedio indicaría que el crecimiento no es inhibido por las concentraciones utilizadas de rutina y debe de administrarse una dosis mayor para que el antimicrobiano sea efectivo (52).

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana son importantes porque ayudan a delimitar el tratamiento adecuado de enfermedades infecciosas, así como el agente más conveniente. Las dos funciones más importantes de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana son la detección de resistencia y la medición cuantitativa de la susceptibilidad a algún agente antimicrobiano para ciertas especies en las que tienen relevancia terapéutica directa (52).

La resistencia a antimicrobianos puede ser intrínseca o adquirida. La resistencia intrínseca es especie o género específica mientras que la resistencia adquirida se presenta solamente en ciertas cepas de determinada especie o género y delimita el espectro de actividad del antibiótico. La resistencia adquirida se presenta solamente en ciertas cepas de una especie o género bacteriano y los resultados posteriores pueden ser una mutación en un gen localizado en el cromosoma del hospedero, en un plásmido o la adquisición de nueva información genética por la bacteria, ya sea por conjugación o por transformación (48).

Las bacterias pueden presentar resistencia a antibióticos por cuatro formas diferentes: alteración del sitio blanco, desactivación enzimática del antibiótico, disminución en la acumulación de la droga y sustitución de pasos susceptibles al antibiótico (48).

Los primeros tres mecanismos pueden deberse a mutaciones cromosómicas o mediadas por plásmidos. La última puede deberse a que la bacteria adquiera un plásmido de resistencia o trasposición (48).

Campylobacter jejuni puede presentar un amplio número de determinantes de resistencia, incluyendo varios genes mediados por plásmidos (2). La mayoría de cepas de *C. jejuni* son susceptibles a eritromicina, aminoglucósidos, tetraciclina, cloranfenicol, quinolonas, nitrofuranos, apramicina, neomicina, gentamicina y clindamicina (1, 6, 51, 54).

El desarrollo de resistencia antimicrobiana en el tratamiento de infecciones entéricas, particularmente en microorganismos como *C. jejuni*, *Shigella* sp., *V. cholerae*, *E. coli* enterotoxigénica, *Yersinia* sp. y *Salmonella typhi* se ha incrementado durante los últimos años (54, 55). Se ha reportado un importante incremento en la resistencia de *C. jejuni* especialmente para las quinolonas (1 a 82 por ciento) y la tetraciclina (23 a 72 por ciento) de 1985 a 1998 (13). El mayor rango de resistencia antimicrobiana se presenta en países en desarrollo, en donde el uso de agentes antimicrobianos no está controlado (12-14). Se ha observado que el uso de pequeñas dosis subterapéuticas de antimicrobianos, como aditivos alimenticios los cuales son utilizados como promotores de crecimiento en la industria alimentaria, incrementa el desarrollo de resistencia antimicrobiana en las bacterias que colonizan estos alimentos, entre estas *C. jejuni* (12, 54, 58). Para *C. jejuni* se considera que debido a que el desarrollo de resistencia antimicrobiana es a nivel cromosomal, el patrón de desarrollo de resistencia antimicrobiana no se altera rápidamente, aunque debido al reporte de diversos estudios realizados es conveniente analizar a dicho microorganismo ya que sí se ha observado variación en los patrones de resistencia de la bacteria (1, 13). Así, se ha reportado cepas de *E. coli* multiresistentes como parte de la microbiota intestinal normal en un 1.4 por ciento de personas sanas y en mayor porcentaje en pacientes bajo tratamiento antimicrobiano, como por ejemplo: con cloranfenicol en un 61 por ciento y estreptomina en un 20 por ciento. También se ha observado que en personas que fueron tratadas con tetraciclina, a la siguiente semana de

iniciado el tratamiento, la *E. coli* de la microbiota fecal normal presentaba multiresistencia (56).

Varios estudios han reportado el incremento de resistencia a antimicrobianos en cepas de *C. jejuni*, tanto en países desarrollados como en países en desarrollo, aunque considerando que en estos últimos no hay control ni restricción de los antimicrobianos, aquí los rangos de resistencia son mucho mayores que en países desarrollados (1).

No solamente es importante el incremento de resistencia que se ha observado en cepas de *C. jejuni* hacia los antimicrobianos de elección como la eritromicina, ciprofloxacina y tetraciclina, también es muy importante la resistencia que se pueda observar en los antibióticos que se utilizan como terapia alternativa, entre estos la ampicilina, cloranfenicol y gentamicina. Además, debido a que para la identificación de este microorganismo se utiliza la prueba de susceptibilidad al ácido nalidíxico es muy importante el incremento de resistencia que se ha observado (1, 14, 63).

Para la eritromicina se han reportado rangos de resistencia desde 1.3 hasta 6.0 por ciento, observándose que este incremento se ha dado a partir del año de 1,987 y se ha mantenido relativamente estable hasta 1,991 (14, 30, 33, 57-60). Aun así, se han reportado varios estudios en los que no se ha observado desarrollo de resistencia antimicrobiana contra la eritromicina (14). En Finlandia se observó un 3 por ciento de resistencia, en Lagos, Nigeria se hicieron dos estudios; en el primero había un 82 por ciento de cepas susceptibles al antimicrobiano, posteriormente estos datos cambiaron, observándose solamente un 20.8 por ciento de cepas susceptibles a la eritromicina (11, 57, 58). En el norte de India, se aisló un 1.3 por ciento de cepas resistentes a la eritromicina y en Riyadh, Arabia Saudita se encontró un 6.0 por ciento de cepas resistentes aisladas del hospital de la localidad (30, 61). En Tokio y en Canadá se observaron rangos menores de resistencia a la eritromicina con un 0.6 por ciento y 1 por ciento respectivamente (62, 63). No se ha observado variabilidad considerable en los patrones de resistencia a la eritromicina según reportes obtenidos hasta el año de 1995 (60, 62).

La resistencia a la eritromicina se debe a tres factores mediados por plásmidos: disminución de la permeabilidad del fármaco a través de la membrana celular, modificación de los sitios blanco en el ribosoma y la hidrólisis de la eritromicina por una

estearasa que producen las Enterobacterias (47, 48). La resistencia intrínseca a los macrólidos en las bacterias Gram negativo se debe a la baja permeabilidad de la membrana externa a estos compuestos hidrofóbicos. La resistencia adquirida, ocurre frecuentemente por alteraciones a nivel ribosomal, inactivación del antimicrobiano así como bombas de eflujo (46-48).

Como anteriormente se menciona, se ha propuesto que la resistencia observada en cepas de *C. jejuni* a la eritromicina está mediada cromosomalmente, pues no se han encontrado plásmidos de DNA en la bacteria. *Ery* es el gen que codifica la resistencia a la eritromicina y está asociado con la transformación del fragmento 3 *Sma*I con 240-kb, de UA585 a UA417. Es importante hacer notar que la resistencia a la eritromicina se observa más frecuentemente en cepas de *C. coli* que de *C. jejuni*. El mecanismo por el que *C. jejuni* adquiere resistencia a la eritromicina aún es incierto; se han efectuado varios estudios buscando la presencia de diversos mecanismos por los que pueda adquirir esta resistencia, como genes de RNA metilasas, enzimas activadoras de la eritromicina, bombas de eflujo y evidencia de mutaciones en genes de proteínas ribosomales o del RNA. Uno de los mecanismos más aceptados a la fecha es que la resistencia a la eritromicina se adquiere al nivel de la síntesis de proteínas, pero se necesitan más estudios que lo confirmen (47, 48, 64).

La ciprofloxacina es uno de los antibióticos relativamente nuevos, a los que *C. jejuni* ha desarrollado resistencia muy rápidamente y en rangos muy grandes hasta de 34.3 por ciento (59, 60, 65). En el norte de India y en la península Ibérica se han observado rangos bajos de 2.7 y 4.1 por ciento respectivamente, en Tokio un 7.3 por ciento y Finlandia un 9 por ciento (57, 61, 62, 66, 67). En Barcelona, Prats y colaboradores, han reportado un incremento de la resistencia de los años de 1,985 a 1,998 de 1 al 82 por ciento (13). También Gaudreau reporta un incremento del 0 al 12.7 por ciento a partir de los años de 1,985 a 1,997 (14). Sin embargo, en otros países se ha reportado que no hay resistencia a este antimicrobiano como es el caso de Egipto (68, 69).

Varios autores reportan que el ácido nalidíxico puede ser considerado como un marcador de susceptibilidad antimicrobiana para la ciprofloxacina cuando se evalúa la susceptibilidad de *C. jejuni*. Además, reportan un alto porcentaje de resistencia

antimicrobiana hacia este antimicrobiano, dato que es muy importante ya que se utiliza como prueba de identificación para este microorganismo (14, 41-43).

Se considera que la resistencia a las quinolonas está relacionada con una mutación simple en una topoisomerasa la cual puede conferir resistencia tanto a fluoroquinolonas como a quinolonas no fluoradas (13, 46-48, 65). También se han propuesto otros mecanismos de resistencia a la ciprofloxacina. Estos mecanismos sugieren una reducción del acceso del antimicrobiano a la célula bacteriana, como en el caso de la alteración de las porinas de la membrana externa o las bombas de eflujo, especialmente cuando estos mecanismos están en combinación con la enzima DNA girasa modificada (47, 48, 65, 70).

La tetraciclina es uno de los antimicrobianos al que *C. jejuni* ha desarrollado mayor resistencia. En lugares donde la resistencia es baja se han encontrado rangos de 9.3 por ciento como es el caso del norte de India, 11 por ciento en Dinamarca y 20 por ciento en Canadá (54, 58, 61, 63). Se presentan rangos mayores del 43 por ciento como es el caso de Tokio con 43.2 a 55 por ciento y 70 por ciento en Israel (59, 62, 68, 72, 73). Otro estudio más reporta un 100 por ciento de resistencia en cepas de *Campylobacter* sp. (74). Prats y colaboradores reportan un aumento de los rangos de resistencia de 23 a 72 por ciento de los años de 1985 a 1998 (13). Gaudreau reporta un incremento en los rangos de resistencia del 19.1 al 55.7 por ciento de 1,985 a 1,997 (14).

La resistencia a la tetraciclina en cepas de *C. jejuni* está mediada por un plásmido transferible, el plásmido pUA466 de 45 kilobases, el cual al estar presente disminuye notablemente la acción de la tetraciclina sobre la síntesis proteica de la bacteria (22, 47, 73, 75). Otro mecanismo de resistencia a este antimicrobiano es la presencia de bombas de eflujo. Normalmente, la tetraciclina se difunde a través de la membrana celular, se concentra en el citoplasma y adopta una forma iónica que no le permite pasar nuevamente a través de la membrana celular. Las bombas de eflujo permiten el paso de la tetraciclina al citoplasma de la célula pero, regresan el antibiótico fuera de la célula tan rápido como entró. Las bombas de eflujo controlan los niveles de tetraciclina en la célula, para que ésta no interfiera en la función ribosomal (47, 48).

La ampicilina es un antibiótico que no es muy utilizado en el tratamiento de gastroenteritis por *C. jejuni* por lo que no se reportan muchos datos sobre él, pero se han hecho estudios en los que se presentan rangos de resistencia desde 12.5 por ciento hasta

18.6 por ciento. En el norte de la India se reporta un 16 por ciento de resistencia hacia la ampicilina y en Lagos, Nigeria un 12.5 por ciento (11, 13, 61). Reina reporta un 51.8 por ciento de resistencia a este antimicrobiano (43). En Barcelona, se observó un incremento de las cepas que producían beta-lactamasa de un 23 por ciento en 1,985 a un 83 por ciento en 1,998 (13). Varios estudios reportan que las cepas que producen beta-lactamasa son más resistentes que las que no la producen, a antimicrobianos como la amoxicilina, ampicilina y ticarcilina (53, 71).

Las bacterias pueden adquirir resistencia a la ampicilina alterando la estructura de las proteínas que se enlazan a las penicilinas evitando así el enlace con el antibiótico; inactivando al antibiótico o evitando que el antibiótico tenga acceso a las proteínas que se enlazan a las penicilinas. Las bacterias cambian estas proteínas por mutaciones genéticas o adquiriendo nuevas proteínas de enlace a la penicilina, provenientes de otras bacterias (47, 48).

La inactivación del antibiótico se lleva a cabo por la producción de la enzima β -lactamasa que hidroliza un enlace del anillo β -lactámico, lo cual evita la acción antimicrobiana de la ampicilina. Las mutaciones en los genes de las porinas provocan cambios en estas proteínas, que las hace menos accesible a los antibióticos β -lactámicos; aunque este mecanismo de resistencia es poco común en bacterias Gram negativo (22, 47, 48).

IV. Justificación

Campylobacter jejuni es uno de los principales agentes causantes de diarrea en el humano, especialmente en niños menores de cinco años. En la actualidad ha adquirido particular interés, ya que se le ha reconocido como el segundo agente causal de diarrea aguda en países en vías de desarrollo y se ha aislado principalmente de zonas templadas y tropicales. En las personas más susceptibles de adquirir la infección los cuadros clínicos pueden ser severos, por lo que es necesaria la administración de antimicrobianos.

Para el tratamiento de gastroenteritis por *C. jejuni* por lo general se recurre a la eritromicina como antimicrobiano de elección y a la tetraciclina, cloranfenicol, ciprofloxacina y ampicilina como alternativas.

Actualmente, se ha observado en varios estudios efectuados en países desarrollados, que *C. jejuni* ha desarrollado cierta resistencia a estos antimicrobianos, los cuales se utilizan comúnmente. Por esta razón es necesario determinar la presencia de cepas resistentes en Guatemala, con el fin de establecer si los tratamientos que se utilizan son aún efectivos contra este microorganismo. También, es importante comparar los patrones de resistencia que presentan los dos grupos de cepas en estudio, ya que en Guatemala el uso de antimicrobianos es indiscriminado y este microorganismo desarrolla resistencia fácilmente a diversos antimicrobianos que se utilizan para contrarrestar las infecciones por *C. jejuni*.

En Guatemala la población en general vive en condiciones sanitarias y nutricionales deficientes, en particular la población infantil. Estos dos aspectos predisponen la susceptibilidad a la infección, por lo que deben administrarse antimicrobianos con mayor frecuencia para contrarrestar los efectos de las infecciones gastrointestinales que son muy frecuentes; y es aquí donde se hace sumamente importante la determinación de resistencia de los diferentes agentes antimicrobianos para orientar hacia la terapéutica más conveniente.

V. Objetivos

A. General:

- Determinar la presencia de resistencia antimicrobiana *in vitro*, de cepas guatemaltecas de *C. jejuni* a la eritromicina, tetraciclina, ampicilina y ciprofloxacina.

B. Específicos:

- Establecer la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) de la eritromicina, tetraciclina, ampicilina y ciprofloxacina en cepas guatemaltecas de *C. jejuni*.
- Comparar los patrones de resistencia de las cepas aisladas durante los años de 1,988 y 1,989 con las que se aíslan durante los años de 1,998 a 2,000.
- Establecer qué antibiótico es más efectivo contra cepas de *C. jejuni* en Guatemala.
- Determinar cómo es el crecimiento de diferentes Ribotipos de *C. jejuni* en diversos medios de cultivo para su aislamiento.

VI. Hipótesis

Debido a que el presente estudio es de tipo descriptivo, no se incluye la hipótesis.

VII. Materiales y Métodos

A. Universo de Trabajo:

Cepas guatemaltecas de *Campylobacter jejuni*.

B. Muestra de Trabajo:

Para el presente estudio se utilizaron 106 cepas de *C. jejuni*. Cien de estas cepas, fueron aisladas de niños con y sin diarrea de la comunidad de Santa María de Jesús, Departamento de Sacatepéquez en un estudio longitudinal de diarrea persistente realizado por el INCAP en los años de 1,988 a 1,989. Las cepas recolectadas fueron aisladas e identificadas por el personal de los laboratorios de Microbiología y Virología del INCAP, y se conservan en cultivos stock en leche descremada a -70°C.

También se utilizaron 6 cepas aisladas de un total de 2,221 muestras de heces, que fueron analizadas durante los años de 1,998, 1,999 y los primeros seis meses del 2,000. De estas muestras 155 provenían de niños que asistieron a la Pediatría del Hospital Nacional de San Marcos y 2,066 de los estudios realizados en el INCAP durante los años 1,998 hasta los primeros seis meses de 2,000.

C. Recursos

1. Humanos

- Br. Wanda Patricia González Pérez (Tesisista)
- Lic. Olga Torres de Matute (Asesor)
- Lic. Rafael Antonio Pratdesaba Zea (Asesor)
- Dr. Louis A. Bourgeois, Universidad de Johns Hopkins (Colaborador)

2. Institucionales

- Laboratorios de Microbiología y Virología, Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP).
- Hospital Nacional de San Marcos, "Dr. Moisés Villagran Mazariegos".

3 Físicos

3.1 *Materiales*

3.1.1. Equipo

- Balanza analítica
- Balanza semianalítica
- Replicador
- Pipetas automáticas de 200 a 1000 μL y de 50 a 250 μL
- Tips
- Campana bacteriológica
- Congeladores a -20°C y -70°C
- Autoclave
- Incubadoras a 37°C y 42°C
- Refrigeradora
- Microscopio de luz
- Vortex
- Potenciómetro
- Mechero Bunsen
- Estufa

3.1.2 *Materiales de Laboratorio*

- Standar de McFarland 0.5
- Cajas de Petri de 15 cm de diámetro
- Viales Eppendorf
- Filtros de membrana de 0.65 μm de diámetro
- Asas bacteriológicas
- Pipetas serológicas
- Pipetas pasteur
- Bolsas plásticas
- Servilletas de papel
- Papel parafinado
- Papel aluminio

- Espátulas de metal
- Cinta adhesiva
- Guantes de látex

3.1.3 *Cristalería*

- Erlenmeyer de 250, 500 y 1000 mL
- Beakers de 10, 25 y 100 mL
- Probetas de 50, 100, 500 y 1000 mL
- Balones de 10 mL
- Botellas con tapón de rosca de 250 y 500 mL
- Viales de vidrio con tapón de rosca de 4.0 mL
- Viales de vidrio con tapón de rosca de 8.0 mL
- Tubos de vidrio con tapón de rosca de 10 mL

3.1.4 *Medios de cultivo*

- Agar Columbia
- Caldo Tripticasa Soya
- Agar Butzler
- Agar Preston
- Agar Karmali
- Agar Skirrow
- Agar Blasser-Wang
- Medio de transporte Cary-Blair
- Factores de crecimiento V y X
- Caldo Tripticasa Soya
- Caldo Tripticasa Soya con suplementos XV al 1 por ciento
- Caldo Tripticasa Soya con glicerol
- Sangre de camero
- Discos de susceptibilidad de ácido nalidíxico
- Discos de susceptibilidad cefalotina
- Cepa control *Campylobacter jejuni* ATCC 33291

- Cepa control *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- Cepa control *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- Cepa control *Streptococcus pyogenes* ATCC 12384
- Cepa control *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- Cepa control *Escherichia coli* ATCC 25922
- Cepa control *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

3.1.5 *Requerimientos especiales de cultivo*

- Sobres Campy-pak
- Jarras Gas-pak

3.1.6 *Reactivos*

- Agua destilada estéril
- Reactivo de oxidasa
- Etanol al 70 por ciento
- Antibióticos en polvo
- Etanol al 95 por ciento
- Peróxido de Hidrógeno al 3 por ciento
- Hipurato de sodio
- Solución de nihidrina

D. Diseño de Investigación

1. Tipo de muestreo:

Muestreo probabilístico o aleatorio simple.

2. Proceso de definición de la muestra:

2.1. Universo:

689 cepas de *C. jejuni* provenientes de niños con diarrea habitantes de Santa María de Jesús. Además, todas las cepas que se aislaron de muestras de heces de niños que asistieron a la Pediatría del Hospital Nacional de San Marcos durante el año 1,999. También las cepas que se aislaron de estudios efectuados

en el INCAP durante los años de 1,998, 1,999 y los primeros seis meses del año 2,000.

2.2. Muestra:

Número de cepas que se estudiaron de acuerdo a la fórmula:

$$n = \frac{\frac{p q z^2}{L E^2}}{1 + \frac{1}{N} \left(\frac{p q z^2}{L E^2} - 1 \right)}$$

Donde, n	=	número de cepas analizadas
p	=	50%
q	=	50%
NC	Nivel de confianza	= 95% = 1.96
LE		= 10%
N	Total de cepas	= 689 cepas

2.3. Método de selección de la muestra

Aleatorio simple, en el cual todas las muestras tuvieron la misma oportunidad de ser escogidas.

2.4. Análisis de resultados

Se hizo una comparación de los resultados obtenidos de las cepas aisladas en los años de 1,988 y 1,989 con las aisladas en los años de 1,998, 1,999 y 2000; con el fin de establecer la diferencia que puede existir en los patrones de resistencia de los dos grupos de cepas.

E. Procedimiento

Para la determinación de resistencia a antimicrobianos en las cepas de *C. jejuni* se utilizó el método de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) (52, 76, 77). El método de

refrigeraron hasta llegar al Laboratorio del INCAP. Estas muestras fueron inoculadas en el medio de cultivo Butzler y se incubaron en la jarra Gas-Pak a 42°C por 48 horas.

Para el aislamiento de las cepas que se obtuvieron de 1,998 al 2,000, también se inoculó una caja con el medio de cultivo Butzler, con una porción de heces del hisopo que fue transportado en Cary Blair. Las cajas de agar se incubaron en una jarra Gas pak en ambiente microaerofílico (5 por ciento de O₂, 10 por ciento de CO₂ y 85 por ciento de N₂, para obtener ésta atmósfera de microaerofilia, se utilizó un sobre CampyPack). La incubación se efectuó a 42°C por 48 horas. En cada jarra utilizada se incluyó una cepa control (*C. jejuni* ATCC 33291) (1).

2.2 Identificación

La identificación y caracterización de las colonias sospechosas se realizó por medio la coloración de Gram modificado, oxidasa, catalasa, pruebas bioquímicas, reducción de nitratos, hidrólisis del hipurato, susceptibilidad al ácido nalidíxico y a la cefalotina y otras pruebas (Tabla No. 1) (1, 2, 6, 8).

2.2.1 Morfología:

A partir de las cajas con agar Butzler, se observaron las características morfológicas del crecimiento obtenido: si se observaban colonias características del microorganismo, es decir, colonias grises o incoloras, no hemolíticas, planas con bordes irregulares o redondas y convexas con bordes regulares, también pueden ser pequeñas o grandes y presentar swarming (1, 2, 6, 8)

2.2.2 Tinción de Gram:

A partir de las colonias sospechosas, se preparó un frote a partir de una colonia característica y se fijo con calor. Para hacer la tinción se procedió de la siguiente forma:

- Sé cubrió el frote con solución de cristal violeta por 60 segundos.
- Sé lavo con agua del chorro.
- Sé cubrió el frote con solución de Lugol para Gram por 60 segundos
- Sé lavo nuevamente con agua del chorro

- Sé cubrió el frote con solución de carbol fucsina por 30 segundos
- Sé lavo con agua de chorro
- Sé deajo secar
- Por último, se observó el frote con un aumento de 1000 X, con el fin de observar bacterias con la morfología característica del microorganismo. Se utilizó una cepa de *C. jejuni* ATCC 33291 como control (1, 6).

2.2.3 Aislamiento de una colonia en agar Columbia:

Del agar Butzler se tomó una colonia y se estrió en una caja con agar Columbia + 7.5 por ciento de sangre de carnero. El propósito de este procedimiento es purificar e incrementar el crecimiento bacteriano ya que en agar Butzler es difícil obtener colonias aisladas en abundancia.

Esta caja con agar Columbia se incubó a 36°C por 48 horas en microaerofilia.

2.2.4 Prueba de Oxidasa:

Para la realización de esta prueba, se añadió una gota de reactivo de oxidasa a una tira de papel filtro Whatman y con un palillo de madera estéril, se tomaron unas colonias de la caja con agar Columbia y se frotaron sobre la tira de oxidasa.

Para la interpretación de resultados, el desarrollo inmediato de una coloración púrpura o azul oscuro es una prueba positiva y cuando no hay cambio de color o el cambio es muy débil después de 10 segundos es una prueba negativa.

Se utilizó *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 como control positivo y *Escherichia coli* ATCC 25922 como control negativo. (Tabla No. 1) (1, 78).

2.2.5 Prueba de Catalasa:

Se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 3 por ciento en un portaobjetos. Se tomaron algunas colonias y se mezclaron suavemente con el peróxido de hidrógeno. La producción inmediata de burbujas se tomó como una prueba positiva. Como control positivo se utilizó *S. aureus* ATCC 25923 y *S. pyogenes* ATCC 12384 como control negativo. (Tabla No. 1) (1, 78).

2.2.6 Prueba de Hidrólisis del Hipurato:

Se tomaron varias colonias del agar Columbia y se colocaron en un tubo con 0.4 mL de Hipurato de sodio. Se incubaron en un baño de maría a 36°C por 2 horas. Posteriormente se añadieron 4 gotas de solución de nihidrina resbalándolas por las paredes y se incubó en baño de maría a 36°C por 10 minutos.

El desarrollo de un intenso color púrpura se tomó como reacción positiva y una coloración púrpura débil como reacción negativa. Se utilizó *C. jejuni* ATCC 33291 como control positivo y *S. pyogenes* ATCC 12384 como control negativo (Tabla No. 1) (1, 78).

2.2.7 Prueba de Susceptibilidad:

Para esta prueba se hizo una suspensión 0.5 de McFland a partir de las colonias de la caja de agar Columbia a un tubo con caldo tripticasa soya. Se inoculó con un hisopo estéril una caja con agar Columbia con 7.5 por ciento de sangre de camero. Después de 2 minutos, en una mitad de la caja se colocó un disco de susceptibilidad con ácido nalidíxico y en la otra mitad se colocó uno de cefalotina.

Las cajas con agar se incubaron a 42°C por 24 horas. Para los controles se utilizó *C. jejuni* ATCC 33291 y *E. coli* ATCC 25922 (Tabla No. 1) (1, 76, 78).

3. Recuperación de cultivos stock:

Los cultivos en leche descremada de las cepas obtenidas en el estudio hecho en Santa María de Jesús que se encuentran congelados a -70°C se sacaron por grupos de diez viales cada vez. De cada uno de los viales se tomó una asada con un asa bacteriológica estéril y se estrió en una caja con agar Columbia adicionado de 7.5 por ciento de sangre de camero. Estos subcultivos se incubaron a 36°C por 24 a 48 horas y posteriormente se observó si había crecimiento bacteriano. De las cepas que no se obtuvo crecimiento, se reincubaron las cajas de agar por 24 horas más y si no se observaba crecimiento se tomó una nueva asada de los viales congelados a -70°C y se incubaron en nuevas cajas de agar. De las cepas que si se obtuvo crecimiento se determinó la CIM enseguida, ya que se deben utilizar cultivos jóvenes. Los viales se devolvieron a los congeladores inmediatamente después de ser utilizados, debido a que

los cambios de temperatura pueden disminuir significativamente la concentración bacteriana en los cultivos stock (8, 78).

4. Almacenamiento de antibióticos en polvo:

Los antimicrobianos en polvo se almacenaron de acuerdo con las instrucciones provista por la casa productora. En general, se almacenaron en refrigeración a temperatura de -20°C protegidos de la luz solar directa, por lo que se almacenaron en frascos de vidrio oscuro (76, 79).

5. Preparación de soluciones stock de antibióticos:

Los antibióticos se pesaron en una balanza analítica y se disolvieron de acuerdo con la concentración requerida reportada en la literatura (Tabla No. 6) (76).

Para disolver la eritromicina se utilizó etanol al 95 por ciento, los otros antimicrobianos se disolvieron con agua destilada estéril, de esta forma se logró obtener soluciones stock con una concentración de $5,120 \mu\text{g/ml}$ para cada antibiótico las cuales se almacenaron a una temperatura de -70°C en viales eppendorf estériles (Tabla No. 7) (49, 76, 79).

6. Preparación de las soluciones estándar de los antibióticos a utilizar:

Las soluciones estándar se prepararon a partir de las soluciones stock en los diluyentes reportados en la literatura.

Las soluciones de eritromicina, se efectuaron con etanol al 70 por ciento ya que la solubilidad de este agente antimicrobiano en agua destilada es muy baja y luego de hacer la dilución con agua destilada se observó precipitación del antimicrobiano, por lo que se decidió hacerlas con etanol (Tabla No. 6 y 7) (76).

7. Composición del medio de cultivo:

Para la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima se utilizó el método de dilución en agar (1, 14, 76, 77).

Para este procedimiento se utilizó el agar Columbia adicionado de 7.5 por ciento de sangre de camero en placas de Petri. Los medios se prepararon de acuerdo con las

indicaciones de la casa comercial. Previo a verter el medio (temperatura no mayor de 45°C) se adicionaron los antibióticos a ensayar en las concentraciones requeridas y la sangre de camero en la proporción antes mencionada. Los antibióticos que se adicionaron al medio de cultivo son ampicilina, tetraciclina, ciprofloxacina y eritromicina. A cada placa de agar se le agregó una concentración y antimicrobiano diferente (Tabla No. 6). Luego se vertió el medio en las cajas de Petri, se dejó enfriar y por último se incubó por 16 a 24 horas a 36°C para comprobar su esterilidad (76, 77, 79). Después de comprobar su esterilidad las cajas se almacenaron en refrigeración en bolsas plásticas selladas por no más de cinco días (76, 77, 79).

8. Inoculación de los medios de cultivo:

Las diluciones en caldo Tripticasa Soya de cada una de las cepas a estudiar. Se realizaron de acuerdo con la turbidez de McFarland 0.5 (10^8 UFC/mL), posteriormente se efectuó una dilución 1:10 (10^7 UFC/mL). Cada dilución de las cepas se depositó en cada uno de los pozos del replicador y con este se aplicó el inóculo (76, 77, 79).

9. Incubación de los medios de cultivo:

Las cajas de Petri ya inoculadas permanecieron a temperatura ambiente hasta que el agar absorbió el inóculo, luego se incubaron en posición invertida a 36°C por 48 horas en jarra Gas-pak en ambiente microaerofílico, para obtener esta atmósfera de microaerofilia se utilizaron sobres Campy-pak de la casa Becton Dickinson (76, 77).

10. Interpretación de resultados:

Para la validación de los resultados obtenidos se analizaron cepas ATCC de referencia de igual forma que las cepas problema (Tabla No. 8). Las placas de Petri se observaron bajo una luz clara y sobre una superficie oscura para determinar el punto final. La CIM que se tomo en cuenta, fue la concentración más baja del antimicrobiano en la que no hubo crecimiento del microorganismo (Tabla No. 5) (76, 77).

11. Evaluación de la recuperación de cepas de *C. jejuni* autóctonas de Guatemala con 5 diferentes suplementos comerciales y el método de filtración:

En la comparación del aislamiento obtenido con diferentes medios de cultivo y el método de filtración se utilizaron 8 cepas de *C. jejuni*, cada una con un Ribotipo diferente y una cepa de *C. jejuni* ATCC 33291.

Para este procedimiento fue necesario infectar heces que no presentaban características de infección por este microorganismo, es decir, no eran diarreicas, no presentaban moco, sangre, leucocitos, etc. Se utilizó un gramo de heces para cada dilución que se efectuó (10^8 UFC/ mL, 10^6 UFC/ mL, 10^5 UFC/ mL, 10^4 UFC/ mL y 10^2 UFC/ mL). Para la realización de estas diluciones se sacaron las cepas con diferente Ribotipo que se conservan almacenadas en leche descremada a -70°C en los Laboratorios de Microbiología y Virología del INCAP. Se inocularon en agar Columbia con 7.5 por ciento de sangre de camero y se incubaron por 48 horas a 36°C en atmósfera microaerofílica. Luego de este tiempo se observó su crecimiento y se hicieron diluciones en caldo Tripticas Soya con los suplementos V y X al 1 por ciento. Estos suplementos se agregaron al caldo de cultivo, debido a que este microorganismo no permanecía viable durante el período de realización de las diluciones.

La primera dilución, se hizo de acuerdo a la turbidez del estándar de McFarland 05. (con una concentración de 10^8 UFC/ mL). A partir de esta dilución se hicieron las siguientes diluciones, tomando 1 mL de la primera dilución e inoculando en 9 mL de caldo Tripticas Soya con los suplementos V y X al 1 por ciento para obtener una dilución con 10^7 UFC/ mL. Luego de la segunda dilución se tomó nuevamente 1 mL y se inoculó en 9 mL de caldo Tripticas Soya con los suplementos V y X al 1 por ciento y así se obtuvo una dilución con 10^6 UFC/ mL, de igual forma se realizaron las diluciones posteriores y para obtener las cinco diluciones que se utilizaron en este procedimiento.

Para infectar las heces con *C. jejuni* se rotularon tubos con tapón de rosca de acuerdo a la dilución correspondiente, se introdujo un gramo de heces (se pesó un gramo de heces y luego se tomó aproximadamente la misma cantidad para las demás diluciones necesarias) en cada uno de los tubos y se agregó 1 mL de cada dilución al tubo correspondiente. Estas diluciones se homogenizaron en un agitador manual.

Posteriormente, de cada dilución se tomaron 100 μ L y se inocularon y distribuyeron en una caja de agar conteniendo los diferentes suplementos comerciales (Butzler, Blaser-Wang, Karmaly, Preston y Skirrow). Las cajas de agar se incubaron a 36°C en atmósfera microaerofílica por 48 horas. Luego se observó si había crecimiento de colonias con morfología característica de dicho microorganismo y si este era el caso, se hizo un frote y se confirmó con las pruebas necesarias para su identificación (Tabla No. 1).

Para el método de filtración se hicieron las diluciones de igual forma. Para realizar la filtración se colocó un filtro de 47 mm de diámetro y poros de 0.65 μ m sobre la superficie de agar Columbia con 7.5 por ciento de sangre de carnero. De cada dilución se tomaron de 8 a 10 gotas y se dejaron caer una tras otra sobre el filtro. No se aplicaron más de 10 gotas ya que esta cantidad se salía de la superficie del filtro y no permitía la filtración de toda la materia fecal.

Estas cajas se incubaron en posición invertida a 36°C en aerobiosis durante una hora y luego se sacaron de incubación para retirar el filtro. Luego se reincubaron a 36°C en microaerofilia por 48 horas más. Después de pasado este período de tiempo se observó si habían colonias con morfología característica y se procedió a su identificación.

También se hizo un estudio alterno para evaluar el transporte de *C. jejuni* en PBS a dos temperaturas diferentes 4 y 25°C. Se realizaron las mismas diluciones que fueron hechas para la comparación de los suplementos y el método de filtración, con la diferencia de que se utilizaron 5 gr de heces y 5 mL de la dilución de caldo Tripticasa Soya que contenía al microorganismo. De estas diluciones se agregaron 3 mL a cada tubo con 5 mL de PBS. A las 24, 48, 72 y 96 horas se tomaron 100 μ L de cada dilución que se evaluó y se inoculó en agar Butler, se incubó a 36°C en microaerofilia por 48 horas. Luego se observó el crecimiento de colonias sospechosas del microorganismo.

En el INCAP se realizó un estudio alterno para evaluar la efectividad del medio de transporte Cary-Blair. Para este estudio se utilizó una cepa de *C. jejuni* ATCC 33291 y se probaron 5 diluciones; 10^8 UFC/ mL, 10^7 UFC/ mL, 10^6 UFC/ mL, 10^5 UFC/ mL y 10^4 UFC/ mL. Estas diluciones se hicieron con solución salina estéril. La primera dilución se hizo de acuerdo a la turbidez del estándar de McFarland 0.5 (10^8 UFC/ mL), de esta dilución se tomó 1 mL y se inoculó en 9 mL de solución salina, para obtener una dilución con 10^7

UFC/ mL, luego a partir de esta dilución se hizo la siguiente y de igual forma se realizaron las diluciones subsecuentes.

De cada dilución se inoculó 1 mL en tubos que contenían el medio de transporte Cary-Blair (las cinco diluciones) a las 24, 48, 72 y 96 horas. Los medios de transporte que se analizaron fueron el medio comercial COPAN y el medio de transporte elaborado en el INCAP.

F. Análisis de datos

Las muestras se analizaron como resistentes o susceptibles a los antibióticos que se enfrentaron. Así también se realizó una comparación de los resultados obtenidos de los dos grupos de cepas estudiadas.

VIII. Resultados

Para el presente estudio se analizaron 155 muestras de niños menores de cinco años con y sin diarrea provenientes del Departamento de San Marcos. Ochenta muestras fueron recolectadas en dos escuelas de pre-primaria de la localidad y 75 de niños que asistieron a la Pediatría del Hospital Nacional de San Marcos durante los meses de enero a julio de 1,999. De estas muestras no se obtuvo ningún aislamiento del microorganismo.

Debido a que no se obtuvo ningún aislamiento del muestreo anterior durante los años de 1,998 al 2,000, se realizó un estudio de comparación de medios de cultivo y métodos de aislamiento de *C. jejuni*. Para esto, se analizaron 8 ribotipos diferentes y una cepa ATCC (*C. jejuni* 33291). Los ribotipos fueron tipificados de cepas de *C. jejuni* que se encuentran almacenadas a -70°C en el INCAP (8).

Para determinar cuál de los métodos de cultivo para *C. jejuni* rinde porcentajes de aislamiento más elevados, se utilizaron 5 diluciones, 10^8 UFC/mL, 10^6 UFC/mL, 10^5 UFC/mL, 10^4 UFC/mL, y 10^2 UFC/mL y 5 medios de cultivo disponibles comercialmente, entre ellos Blaser-Wang, Butzler, Karmali, Preston, Skirrow y también se evaluó el método de filtración con membrana. Los resultados de este análisis mostraron que el medio de cultivo Butzler y el método de filtración con membrana presentaron mayor porcentaje de recuperación de *C. jejuni* a partir de muestras clínicas, especialmente el método de filtración. Con este método de filtración se observaron aislamientos bacterianos hasta en la dilución 10^2 UFC/mL, en el medio de cultivo Butzler hasta 10^7 UFC/mL. En los otros medios de cultivo (Blaser-Wang, Karmali y Preston) el crecimiento observado fue muy escaso en la dilución 10^8 UFC/mL. Para el medio de cultivo Preston, el crecimiento fue un poco más abundante, aunque en la dilución 10^8 fue en la única que hubo crecimiento. En el medio de cultivo Skirrow no se logró ningún aislamiento (Tabla No. 9).

Durante 1,998, 1,999 y los primeros seis meses del año 2,000 se analizaron 2,066 muestras de heces de varios estudios que se realizan en el INCAP. De estas muestras se obtuvieron seis aislamientos de *C. jejuni*.

Para la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima, se evaluaron 106 cepas de *C. jejuni*, las cuales se enfrentaron a cuatro agentes antimicrobianos: eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina y ampicilina.

Al determinar la susceptibilidad se encontró que el porcentaje de resistencia total a los antimicrobianos ensayados, para las cepas aisladas durante 1,987 a 1,989 fue de: ampicilina 2 por ciento (2 cepas), ciprofloxacina 0 por ciento, eritromicina 3 por ciento (3 cepas) y tetraciclina 1 por ciento (1 cepas) (Tablas No. 10 y 11, Gráficas No. 1 a 4).

Para las cepas aisladas en 1,998, 1,999 y 2,000 el porcentaje de resistencia fue de: ampicilina 50 por ciento (3 cepas), ciprofloxacina 33.3 por ciento (2 cepas), éritromicina 16.7 por ciento (1 cepas) y tetraciclina 50 por ciento (3 cepas). (Tablas No. 10 y 12, gráficas 1 a 4).

IX. Discusión de Resultados

Campylobacter jejuni es uno de los principales agentes etiológicos de infecciones gastrointestinales. Durante los años de 1,987 a 1,989 se tenía conocimiento que este microorganismo era susceptible a los agentes antimicrobianos de elección para su tratamiento entre los que se pueden mencionar la gentamicina, eritromicina, aminoglucósidos, tetraciclina etc.

Actualmente, estos patrones de susceptibilidad han variado y se ha observado un incremento en el desarrollo de resistencia a los mismos agentes antimicrobianos de elección y a aquellos que se utilizan como tratamiento alternativo, entre ellos: ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina y tetraciclina que fueron los 4 agentes antimicrobianos evaluados en el presente estudio (Tabla No. 10 y gráfica No. 5) (1).

En nuestro medio el incremento de resistencia antimicrobiana, se ve influenciado por la falta de control de los tratamientos administrados, por la falta de información sobre el uso de medicamentos y la carencia de implementación de la legislación apropiada para la venta y receta de antibióticos. La persistencia de estos factores favorece el desarrollo de resistencia e incrementa los rangos de resistencia ya existentes (80, 81).

La eritromicina es el agente antimicrobiano de elección en el tratamiento de infecciones por *C. jejuni*, en el presente estudio no se encontraron cepas resistentes aunque la susceptibilidad a este antimicrobiano sí ha disminuído. (Tabla No. 10).

En el primer grupo de cepas estudiado (aislamientos de 1,987 a 1,989) se observó un 97 por ciento de cepas susceptibles a la eritromicina y un 3 por ciento de cepas con susceptibilidad intermedia, mientras que en el segundo grupo de cepas (aislamientos de 1,998 al 2,000) la susceptibilidad disminuyó significativamente a un 83.3 por ciento con un 16.7 por ciento de cepas con susceptibilidad intermedia a la eritromicina. Aunque este agente antimicrobiano puede considerarse activo contra este microorganismo su susceptibilidad se ha reducido considerablemente y no sería raro que en otros ambientes y poblaciones como lo es la población hospitalaria, sí se encuentre resistencia de este microorganismo al antimicrobiano (Gráfica No. 3).

La ciprofloxacina es una fluoroquinolona que ha sido utilizada para el tratamiento de infecciones gastrointestinales y a pesar de ser un agente antimicrobiano relativamente

nuevo se ha observado el desarrollo de resistencia rápidamente. En el estudio se observó un incremento del 33.3 por ciento en cepas resistentes. En 1,987 a 1,989 no se observaron cepas resistentes y solamente uno de los aislamientos mostró susceptibilidad intermedia al antimicrobiano, mientras que durante los años de 1,998 a 2,000 se obtuvo un 33.3 por ciento de cepas resistentes a la ciprofloxacina y no se observaron cepas con susceptibilidad intermedia (Gráfica No. 2).

La ampicilina y la tetraciclina son dos agentes antimicrobianos que en años anteriores se utilizaron muy amplia e indiscriminadamente en nuestro país y que a la fecha se siguen utilizando. Actualmente, debido a la resistencia que han desarrollado diferentes microorganismos, los profesionales de la medicina prefieren no utilizarlo. Con este antecedente, podemos observar que en el presente estudio las cepas analizadas presentan porcentajes de resistencia altos para ambos antimicrobianos (Tabla No. 10).

Para la tetraciclina se incrementó el porcentaje de resistencia de las cepas aisladas durante los años ochenta comparado con las aisladas durante 1,998 al 2,000 del 4 por ciento al 50 por ciento y un porcentaje de cepas con susceptibilidad intermedia del 2 al 33.3 por ciento respectivamente. Para la ampicilina, los rangos son similares de 2 por ciento en 1,987 a 1,989 a un 50 por ciento en 1,998 al 2,000. Para este antimicrobiano no se presentaron cepas con susceptibilidad intermedia (Gráfica No. 1 y 4).

Los mecanismos de resistencia que las bacterias pueden desarrollar contra estos dos antimicrobianos son fáciles de adquirir. Para la tetraciclina la resistencia se adquiere por una alteración en un gen. Este mecanismo de resistencia, aunque se desarrolla a nivel genético, es fácilmente transferido mediante un plásmido o transposon de una bacteria a otra durante el proceso de conjugación o transposición.

Por otra parte, la ampicilina sufre una inactivación provocada por la enzima β -lactamasa, la cual se lleva a cabo por la hidrólisis de un enlace del anillo β -lactámico. Esta hidrólisis evita la acción antimicrobiana del antibiótico. Este mecanismo también es fácilmente adquirido por las bacterias (47, 48).

El mecanismo por el que las bacterias adquieren resistencia a la eritromicina es mucho más complicado, ya que se desarrolla a nivel cromosomal y no se transfiere por plásmidos (47, 64). Esta podría ser una de las causas por la que los rangos de resistencia a este antimicrobiano son mucho menores.

Otro dato importante de observar es que las cepas aisladas durante los años de 1,987 a 1,989 no presentan multiresistencia, mientras que en las cepas aisladas durante el período de 1,998 al 2,000 sí se observó multirresistencia. En el primer grupo de cepas analizadas, no se encontraron cepas que fueran resistentes a dos o más antimicrobianos a la vez; mientras que en el segundo grupo de cepas analizadas, una cepa fue resistente a ciprofloxacina, tetraciclina y ampicilina, otra de las cepa a la tetraciclina y ampicilina. Dos cepas más, fueron resistentes a un antimicrobiano y presentaron susceptibilidad intermedia a otro (Tabla No. 11).

Estos datos hacen suponer que de mantenerse el uso inadecuado, la venta sin prescripción médica, prescripción médica indiscriminada y la venta de antimicrobianos genéricos que no cuentan con los requerimientos básicos, en Guatemala se seguirán incrementando los rangos de resistencia a antimicrobianos de uso común, así como se empezará a evidenciar la resistencia a otros agentes antimicrobianos nuevos. Esto puede traer consigo problemas de salud, dificultad en el manejo de infecciones con los antimicrobianos que actualmente se utilizan de rutina, mayores costos de los tratamientos antimicrobianos, períodos de hospitalización mayores con tratamientos más severos y más costosos así como el desarrollo de antimicrobianos nuevos de mayor precio que, en el país son difíciles de adquirir. Además, es necesario que la prescripción de medicamentos se realice basándose en el antibiograma de susceptibilidad antimicrobiana, debería monitorearse continuamente lo que ayudaría a construir información epidemiológica de mucha importancia para el país.

A pesar de que las condiciones de vida de los pobladores del Departamento de San Marcos son similares a las de la mayoría de la población de nuestro país y de Santa María de Jesús, lugar de donde provenían las cepas aisladas durante 1,987 a 1,989 y que aquí se obtuvo una recuperación muy buena de la bacteria, en nuestro estudio no se obtuvieron aislamientos de *C. jejuni* de las muestras que se analizaron provenientes del servicio de Pediatría del Hospital Nacional de San Marcos, así como tampoco de las muestras de los niños que asisten a escuelas de pre-primarias en donde se realizó el muestreo. En el país, la población en general vive en condiciones que favorecen el desarrollo de infecciones por *C. jejuni*, como por ejemplo: inaccesibilidad al agua potable,

carencia de excretas, presencia de animales domésticos adentro de las casas, etc. por lo que se esperaba poder aislar al microorganismo de esta comunidad.

El aislamiento de este microorganismo se puede ver afectado por las condiciones de transporte de la muestra, el clima frío característico de este departamento y la distancia para ser transportadas a los laboratorios de Microbiología del INCAP. En un estudio efectuado en los laboratorios de Microbiología del INCAP, se observó que la recuperación de este microorganismo a partir del medio de transporte Cary-Blair, es muy bueno. En las primeras 24 horas luego de la obtención de la muestra, se obtuvieron aislamiento a partir de heces hasta en una concentración de 10^4 UFC/mL; a las 48 horas solamente se obtuvo crecimiento en las diluciones de 10^8 y 10^7 UFC/mL y a las 72 y 96 horas no se obtuvo aislamiento. A pesar de que se utilizó el medio Cary Blair, que es el indicado para el transporte, podrían existir otros factores que impidieron el aislamiento del microorganismo de estas muestras; entre estos que la concentración de bacterias en la muestra fuera poca, mala calidad del medio de cultivo disponible comercialmente, la temperatura de transporte o que realmente no estuviera presente la bacteria en estas muestras.

Debido a estas dificultades en el aislamiento, se decidió hacer una comparación de los medios de cultivo utilizados para su aislamiento selectivo y del método de filtración por membrana, el cual también se utiliza para aislar al microorganismo (Tabla No. 9).

De este experimento se observó que los principales medios de cultivo disponibles comercialmente; entre ellos el Butzler, Skirrow, Blaser Wang, Preston y Karmali son muy inhibitorios para el crecimiento del microorganismo. Se obtuvo muy poca recuperación en la dilución que contenía 10^8 UFC/mL. Para el medio Preston se obtuvo mejor recuperación que con el Blaser Wang, Karmali y Skirrow, pero solamente en la dilución 10^8 UFC/mL hubo crecimiento. Los suplementos antimicrobianos para estos medios de cultivo fueron donados al estudio por el Dr. Louis A. Bourgeois de la Universidad de Johns Hopkins, quien los trajo personalmente al INCAP a las temperaturas adecuadas.

El medio de cultivo Blaser-Wang es muy similar en su composición al medio de cultivo Skirrow, con la diferencia de que contiene dos antibióticos más en el suplemento. De acuerdo con la Tabla No. 9, se observa que en el medio de cultivo Blaser-Wang sí se obtuvo crecimiento, aunque fue muy poco; mientras que en el medio de cultivo Skirrow no

se observó crecimiento. Esto puede deberse, a que los otros dos antimicrobianos presentes en el medio Blaser-Wang pueden inhibir el crecimiento de bacterias contaminantes de la microbiota fecal que interfieren en el crecimiento del microorganismo y que son inhibidas por la presencia de cefalotina y anfotericina en este medio de cultivo (Tablas No. 2 y 3).

El medio de cultivo Butzler, también se ha utilizado ampliamente para el aislamiento de este microorganismo y ha sido el método utilizado en los estudios del INCAP desde 1,985. Como se puede observar en los resultados, se obtuvo recuperación en las diluciones con 10^8 y 10^7 UFC/mL. Estos datos indican que este medio de cultivo selectivo es una mejor alternativa para el aislamiento de *C. jejuni* que los otros medios evaluados; sin embargo, en muestras clínicas que presenten una baja concentración del microorganismo no puede garantizarse un buen aislamiento (Tablas No. 3 y 9).

Para el medio de cultivo Butzler se hizo una evaluación extra, se agregó al medio de cultivo la mitad de la cantidad recomendada del suplemento selectivo y se utilizaron las mismas diluciones. Los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos con la concentración recomendada del suplemento, pero se obtuvo crecimiento en la dilución 10^6 UFC/mL y en una cepa de los 8 Ribotipos utilizados se obtuvo crecimiento hasta en la dilución que tenía 10^5 UFC/mL (solamente se observó crecimiento de dos unidades formadoras de colonia) (Tabla No. 9). Con estos datos se confirma que, a pesar de que la concentración de antimicrobianos es menor, el método no garantiza aislamientos a concentraciones bajas del microorganismo, por lo debe haber otros factores que afecten el crecimiento del microorganismo. Entre estos factores se puede mencionar la presencia de las bacterias de la microbiota fecal que interfieren y enmascaran el crecimiento de *C. jejuni*.

En general los medios de cultivo selectivos tienden a inhibir el crecimiento del microorganismo, ya sea por la presencia de antimicrobianos, por la concentración de los mismos o por permitir el crecimiento de bacterias contaminantes que también inhiben a *C. jejuni* o lo enmascaran, impidiendo su identificación y crecimiento masivo. El método de filtración no utiliza medios selectivos ni temperaturas altas y se recomienda utilizarlo como método alterno para el aislamiento del *Campylobacter*, ya que gracias al tamaño y la movilidad del microorganismo, éste puede atravesar la membrana de filtración de $0.65 \mu\text{m}$

de diámetro. La membrana utilizada a la vez retiene a otras bacterias propias de la microbiota fecal que son, en su mayoría, incapaces de atravesarla, ya sea por el tamaño del poro de esta membrana o porque estas bacterias no son móviles (1, 3).

Se obtuvo muy buena recuperación del *Campylobacter* por este método, observándose muy buen crecimiento en las diluciones de 10^8 , 10^7 y 10^6 UFC/mL, mientras que en las diluciones posteriores (10^5 UFC/mL y 10^4 UFC/mL) el crecimiento fue menor (se recuperaron aproximadamente de 8 a 10 UFC por caja) y en la dilución 10^2 UFC/mL crecieron de 1 a 3 UFC. Es importante agregar que estas diluciones se hicieron y analizaron por duplicado. Debe tomarse en cuenta que cuando la muestra es demasiado líquida, ésta puede sobrepasar la capacidad de absorción del filtro y salirse por los bordes lo que ocasionaría que el crecimiento de las bacterias de la microbiota fecal fuera abundante y no se pudiera observar crecimiento de *C. jejuni*.

Con estos resultados se puede observar la influencia que ejerce la microbiota fecal sobre el crecimiento de *C. jejuni*. Debido a que en este método se realiza una filtración de la materia fecal se evita el paso de estas bacterias al medio de cultivo y se favorece el crecimiento y aislamiento del microorganismo.

También se realizó el método de filtración por membrana utilizando los agares Preston, Skirrow, Karmali, Blaser Wang y Butzler; en las diluciones 10^8 , 10^6 , 10^4 y 10^2 UFC/mL (Tabla No. 12). Solamente se obtuvo crecimiento en la primera dilución (10^8 UFC/mL) de Preston, Skirrow, Karmali, Blaser Wang y en el medio de cultivo Butzler en la dilución 10^8 y 10^6 UFC/mL. Esto confirma que estos medios de cultivo inhiben considerablemente el crecimiento de *C. jejuni*.

Además, se realizó un experimento para evaluar la efectividad del PBS como medio de transporte de muestras para el aislamiento de *C. jejuni*. En la tabla No. 13 se observan los resultados evaluando el transporte a dos temperaturas (4 y 25°C). Aquí se puede observar que esta no es una buena alternativa como medio de transporte, ya que posiblemente el medio no contiene los requerimientos necesarios para *C. jejuni* o el pH afecta su viabilidad.

Entre otros datos observados en este estudio se puede mencionar que la recuperación de *C. jejuni* de muestras clínicas no varía significativamente con el tiempo de incubación de los medios de cultivo. Se hicieron observaciones del crecimiento bacteriano

a las 24, 48 y 72 horas. El crecimiento a las 72 y 48 horas fue bueno pero muy similar entre ellos, mientras que a las 24 horas el crecimiento fue muy poco.

Con el método de filtración la recuperación a las 24 horas es buena aunque el crecimiento es mucho mejor a las 48 horas. No se observó una diferencia significativa en el crecimiento luego de 72 horas de incubación.

Otro ensayo que se realizó fue utilizar bolsas de plástico selladas para la incubación de *C. jejuni*. De esta forma se sustituyen las jarras gas-pak que son muy costosas y no están disponibles en la mayoría de laboratorios. Se obtuvo muy buenos resultados, ya que no hubo variación en el crecimiento del microorganismo con la incubación en las jarras gas-pak o con las bolsas plásticas.

X. Conclusiones

1. La resistencia de *C. jejuni* a los agentes antimicrobianos utilizados como tratamientos de elección se ha incrementado continuamente a través de los últimos años.
2. Para las cepas aisladas durante los años de 1,987 a 1,989, se encontraron los siguientes rangos de resistencia para los cuatro antibióticos ensayados: ampicilina 2 por ciento, tetraciclina 1 por ciento y para la ciprofloxacina y eritromicina no se encontró resistencia.
3. Para las cepas aisladas durante los años de 1,998 al 2,000, se encontraron los siguientes rangos de resistencia para los cuatro antibióticos ensayados: ampicilina y tetraciclina 50 por ciento, ciprofloxacina 33.3 por ciento y para la eritromicina no se observó resistencia.
4. La eritromicina puede seguir siendo considerada el tratamiento de elección para infecciones causadas por *C. jejuni*.
5. La ciprofloxacina es una buena alternativa para el tratamiento de *C. jejuni*, aunque debe usarse apropiada y juiciosamente.
6. La ampicilina y tetraciclina, presentan porcentajes de resistencia altos por lo que debe evaluarse su patrón de susceptibilidad antes de utilizarse como tratamientos para esta infección.
7. Es importante el monitoreo de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas aisladas de infecciones diarreicas, para administrar un tratamiento efectivo.
8. Los medios de cultivo convencionales pueden ser muy inhibitorios para el microorganismo y así dificultar su aislamiento.

9. Entre los medios de cultivo selectivos para el aislamiento de *C. jejuni* se puede considerar que el Butzler es una de las mejores alternativas.

10. El método de filtración por membrana es el mejor método para el aislamiento de *C. jejuni*, ya que no requiere una incubadora adicional en el laboratorio y permite el crecimiento de diferentes cepas de *C. jejuni* a partir de muestras clínicas en las que se encuentre tanto en concentraciones bajas como altas.

XI. Recomendaciones

1. Realizar estudios consecutivos en los que se investiguen los patrones de susceptibilidad a otros agentes antimicrobianos, en especial a aquéllos que se utilizan como pruebas especiales para tipificar al microorganismo, como es el caso del ácido nalidíxico y la cefalotina.
2. Realizar estudios en los que se evalúen poblaciones de alto riesgo y personas que se encuentren más expuestas al microorganismo.
3. Establecer en los laboratorios de la red de Hospitales Nacionales del país, las condiciones necesarias para el aislamiento y cultivo de *C. jejuni*; además, considerar la implementación del método de filtración por membrana para el aislamiento de *C. jejuni*.
4. Realizar estudios a nivel molecular con el fin de investigar los factores genéticos que codifican los patrones de resistencia antimicrobiana.
5. Promover el uso apropiado de agentes antimicrobianos a nivel popular y profesional.
6. Normar el uso de antimicrobianos y establecer un control de cumplimiento de estas normas.
7. Implementar registros y estadísticas sobre patrones de resistencia en la red de Hospitales Nacionales del país.
8. Evaluar el uso de agentes antimicrobianos utilizados como aditivos alimenticios que se utilizan como promotores de crecimiento en la industria alimentaria.

9. Se recomienda evaluar la prevalencia actual de *C. jejuni* como agente causal de diarrea y disentería y monitorearse el patrón de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas aisladas de infecciones diarreicas.

XII. Referencias

1. Nachamkin I. *Campylobacter* and *Arcobacter*. Pp xxiii+1482. (En: Manual of Clinical Bacteriology. 6th ed. Ed. ASM Press. Washington, 1995).
2. Joklik WK, et al. *Campylobacter, Helicobacter y Spirillum*. Pp 916-920. (En: Zinsser Microbiología). 20^a ed. Ed. Médica Panamericana. Argentina, 1995.
3. Engberg J. Prevalence of *Campylobacter, Arcobacter, Helicobacter* and *Sutterella* spp. in human fecal samples as estimated by a reevaluation of isolation methods for *Campylobacters*. J Clin Microbiol 2000;38:286-291.
4. Cruz JR, et al. Epidemiology of persistent diarrhea among Guatemalan rural children. Acta Paediatr 1992;381:22-26.
5. Cruz JR, et al. Infection, diarrhea, and dysentery caused by *Shigella* species and *Campylobacter jejuni* among Guatemalan rural children. Pediatr Infect Dis J 1994;13:216-223.
6. Pérez CE. *Campylobacter jejuni* y *Cryptosporidium* como agentes etiológicos de diarrea infantil en Guatemala. Tesis. Facultad C.C.Q.Q. y Farmacia, USAC. 1989.
7. Zanuncini RM. *Campylobacter fetus* ssp. *jejuni* probable nuevo agente de gastroenteritis en Guatemala. Tesis. Facultad de CCQQ y Farmacia. USAC. 1981.
8. López Ruano, JV. Infecciones por *Campylobacter jejuni* en niños: ¿infecciones recurrentes o persistentes? Comparación de cepas por Ribotipia. Tesis. USAC Facultad de C.C.Q.Q. y Farmacia.
9. Torres OR, et al. Infecciones recurrentes por *Campylobacter jejuni* en niños de Santa María de Jesús: Tipificación por Ribotipia. INCAP. Nota técnica.
10. Cruz JR, et al. Etiología de diarrea aguda en infantes de areas marginales de Guatemala. Memorias del III Congreso Nacional de Microbiología. Guatemala, 1986.
11. Coker AO, Adefeso AO. The changing of *Campylobacter jejuni/coli* in Lagos, Nigeria after ten years. East Afr Med J 1994;71:437-440.
12. Fields PI, Swerdlow DL. *Campylobacter jejuni*. Clin Lab Med 1999;19:489-504.
13. Prats, G et al. Antibiotic resistance trends in enteropathogenic bacteria isolated in 1985-1987 and 1995-1998 in Barcelona. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:1140-1145.

14. Gaudreau C, Gilbert H. Antimicrobial resistance of clinical strains of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* isolated from 1985 to 1997 in Quebec, Canada. *Antimicrob Agent Chem* 1998;42:2106-2108
15. Williams D, *et al.* Early treatment of *Campylobacter jejuni* enteritis. *Anti Agen Chem* 1989; 33:248-250.
16. Stokes EJ, Ridgway GL. *Clinical Bacteriology*. 5th. Ed. Yearbook medical. Chicago, 1980.
17. Torres MF. Coprocultivo para *Campylobacter jejuni*. 71-74 Pp. (En: Manual Práctico de Bacteriología Médica. 1^a. Edición. Guatemala 1996).
18. Lee CY, *et al.* Occurrence of plasmids and tetracycline resistance among *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from whole market chickens and clinical samples. *Int J Food Microbiol* 1994;24:161-170.
19. Chung HI. Incidence and clinical manifestations of *Campylobacter* enteritis in central Taiwan. *Medline Jun* 1998;61:339-345.
20. Torres O, Cruz, JR. Protection against *Campylobacter*-diarrhea: role of milk IgA antibodies against bacterial surface antigens. *Acta Pediatr* 1993;82:835-838.
21. Mahajan S, Rodgers FG. Isolation, characterization, and host-cell-binding properties of a cytotoxin from *Campylobacter jejuni*. *J Clin Mic* 1990;28:1314-1320.
22. Page WJ, *et al.* Characterization of the porins of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and implications for antibiotic susceptibility. *Antimicrob Agents Chem* 1989;33:297-303.
23. Villafán H, *et al.* Infección por *Campylobacter jejuni* en niños de una comunidad rural. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1991,48:458-462.
24. Shallow S, *et al.* Incidence of Foodborne Illnesses: Preliminary data from the Foodborne Diseases active surveillance network (FoodNet)—United States, 1,998. *CDC MMWR March 12, 1999/48(09);189-194.*
25. Wassenaar TM, Newell DG. Genotyping of *Campylobacter* spp. *Applied Enviro Microb* 2000;66:1-9.
26. Chen Z, Lu D, Wan S. Epidemiological investigation of *Campylobacter jejuni* infection in children. *Chung Hua Yu Fang I Jhsueh Tsa Chih* 1995;29:144-146.

27. Atanassova V, Ring C. *Campylobacter* spp. in the surroundings of poultry meat production—incidence and chinolone resistance. Zentralbl Hyg Umweltmed 1998;200:542-552.
28. Guerrant R. Enteritis Inflammatorias. Pp 916-922. (En: Enfermedades Infecciosas principios y prácticas. 3ª. ed. Ed..Médica panamericana, Argentina, 1991).
29. Peterson MC. Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* infections in adults. West J Med 1994;161:148-152.
30. Chowdhury MN. Antibiotic sensitivity pattern; experience at University Hospital, Riyadh, Saudi Arabia. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol 1991;35:289-301.
31. Simango C, Nyahanana M. *Campylobacter* enteritis in children in an urban community. Cent Afr J Med 1997;43:172-175.
32. Glass RI, et al. Epidemiologic and clinical features of endemic *Campylobacter jejuni* infection in Bangladesh. J Infect Dis 1983;148:292-296.
33. Lim YS, Tay L. A one-year study of enteric *Campylobacter* infections in Singapore. J Trop Med Hyg 1992;2:119-123.
34. Calva J. *Campylobacter jejuni*: reflexiones sobre la infección entérica en los niños mexicanos. Bol Med Hosp Infant Mex 1991,48:455-457.
35. Mandel GL, Douglas RG, Bennett JE. Enfermedades infecciosas Principios y prácticas. Tomos I y III. 3ª ed. Edit. Médica Panamericana. Argentina, 1991.
36. Mathan VI, Mathan MM. Intestinal manifestations of invasive diarrheas and their diagnosis. Rev Infect Dis 1991;13:S311-S313.
37. Committee of Infectious Disease American Academy of Pediatrics. Summaries of infectious Disease. (En: Report of the committee on infectious disease. 24th. Ed. Red Book. 1997. 160-161, 605-619 Pp.
38. Konkel ME, Babkhaní F, Joens LA. Invasion-relate antigens of *Campylobacter jejuni*. J Infect Dis 1990;162:888-895.
39. Quan LM. Aislamiento de *Campylobacter jejuni* y *C. coli* en carne de pollo. Tesis. USAC. Facultad C.C.Q.Q y Farmacia. Guatemala, 1989.
40. Bridson EY. The Oxoid Manual.6th. Ed. 1990. Alpha Print Alton, Hants. 2.65-2.73.
41. Reina J, Borrel N, Serra A. Emergence of resistance to erythromycin and fluoroquinolones in thermotolerant *Campylobacter* strains isolates from feces 1987-1991. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992;11:1163-1166.

42. Gaudreau C, Gilbert H. Comparison of disc diffusion and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* susp. *jejuni* and *Campylobacter coli*. J Antimicrob Chem 1997;39:707-712.
43. Reina J, Ros MJ, Serra A. Susceptibilities to 10 antimicrobial agentes of 1,220 *Campylobacter* strains isolated from 1987 to 1993 from feces of pediatric patients. Antimicrob Agents Chem 1994;38:2917-2920.
44. Nichols WK. Drogas Antimicrobianas. Pp 1919-241. (En: Remington Farmacia. Tomo II. 19^a. ed. Ed. Médica Panamericana Argentina, 1995).
45. Goodman A, *et al.* Las bases farmacológicas de la terapeútica. 8a ed. Edit. Médica Panamericana. México. 1991.
46. Yao J, Moellering JR RC. Antibacterial agents. (En: Manual of Clinical Bacteriology. 6th ed. Ed. ASM Press. Washington. 1995).
47. Salyers, A. How antibiotics work and how bacteria manage their action. Pp 171-178. (En: Antibiotic resistance transfer in the mammalian intestinal tract: implications for human health, food safety and Biotechnology. 49^a. ed. Ed. R.G. Landes Company. United States, 1995).
48. Quintillani JR R, Cuorvalin P. Mechanism of resistance to antimicrobial agents. (En: Manual of Clinical Bacteriology. 6th ed. Ed. ASM Press. Washington. 1995).
49. Beers MH, Berkow R. Fármacos antibacterianos. Pp 1107-1133. (En: El Manual Merck. 10^a. ed. España, 1999).
50. Pitkänen T, *et al.* Effect of erythromycin on the fecal excretion of *Campylobacter fetus* subspecies *jejuni*. J Infect Dis 1982;145:128.
51. Gosciniak G, Przondo-Mordarska A, Sobieszczanka B. Resistance to chemotherapy of *Campylobacter jejuni* strains. Przegl Epidemiol 1991;45:171-174.
52. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices. Clin Infect Dis 1998;26:973-980.
53. Lachance N, *et al.* Role of the beta-lactamase of *Campylobacter jejuni* in resistance to beta-lactam agents. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:813-818.
54. Aarestrup FM, *et al.* Antimicrobial susceptibility patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. from humans, pigs, cattle, and broilers in Denmark. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:2244-2250.

55. Sack RB, *et al.* Antimicrobial resistance in organisms causing diarrheal disease. *Clin Infect Dis* 1997;24:S102-S105.
56. Maldonado AP. Determinación de resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* patógena (enteropatógena y adherente) y de la microbiota intestinal normal. Tesis. USAC. Facultad de C.C.Q.Q. y Farmacia. 1990.
57. Rautelin H, Renkonen OV, Kosunen TU. Emergence of fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in subjects from Finland. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;10:2065-2069.
58. Ansary A, Radu S. Conjugal transfer of antibiotic resistances and plasmides from *Campylobacter jejuni* clinical isolates. *FEMS Microbiol Lett* 1992;7:125-128.
59. Velásquez JB, *et al.* Incidence and transmission of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Antimicrob Chemother* 1995;1:173-178.
60. Sanchez R, *et al.* Evolution of susceptibilities of *Campylobacter* spp. to quinolones and macrolides. *Antimicrob Agents Chem* 1994;38:1879-1882.
61. Prasad KN, *et al.* Antimicrobial susceptibilities and plasmid analysis of *Campylobacter jejuni* isolated from diarrhoeal patients and healthy chickens in northern India. *J Diarrhoeal Dis Res* 1994;12:270-273.
62. Tadano K, *et al.* Evolution of susceptibilities of *Campylobacter jejuni* isolated from diarrhoeal cases to fluoroquinolones in Tokyo. *Kansenshogaku Zasshi* 1996;12:1227-1233.
63. Karmali MA, De Grandis S, Fleming PC. Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* with special reference to resistance patterns of Canadian isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1981;19:593-597.
64. Yan W, Taylor DE. Characterization of erythromycin resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1989-1996.
65. Gibreel A, *et al.* Rapid emergence of high-level resistance to quinolones in *Campylobacter jejuni* associated with mutational changes in *gyrA* and *parC*. *Antimicrob Agent Chem* 1998;42:3276-3278.
66. Gaunt PN, Piddock LJ. Ciprofloxacin resistant *Campylobacter* spp. in humans: an epidemiological and laboratory study. *J Antimicrob Chemother* 1996;37:747-757.

67. Kuschner A, *et al.* Use of azithromycin for the treatment of *Campylobacter* enteritis in travelers to Thailand an area where ciprofloxacin resistance is prevalent. Clin Infect Dis 1995; 21:536-541.
68. Schwartz D, *et al.* Plasmid profiles and antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* isolated from Israeli children with diarrhea. Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis 1993;3:368-376.
69. Pazzaglia G. *et al.* *Campylobacter*-associated diarrhoea in Egyptian infants: epidemiology and clinical manifestations of disease and high frequency of concomitant infections. J Diarrhoeal Dis Res 1993;11:6-13.
70. Wiedemann B, Heisig P. Mechanisms of quinolone resistance. Infection 1994;22:S73-S79.
71. Bradbury WC, Munroe DL. Occurrence of plasmids and antibiotic resistance among *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from healthy and diarrheic animals. J Clin Microbiol 1985;22:339-346.
72. Sagara H, *et al.* Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* with special reference to plasmid profiles of Japanese clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 1987;31:713-719.
73. Tremblay C, Gaudreau C. Antimicrobial susceptibility testing of 59 strains of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. Antimicrob Agents Chem 1998;42:1847-1849.
74. Tenover FC, Elvrum PM. Detection of two different kanamycin resistance genes in naturally occurring isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Antimicrob Agents Chemother 1988;8:1170-1173.
75. Tenover FC, *et al.* Survey of plasmids and resistance factors in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Antimicrob Agents Chemother. 1985;27:137-141.
76. NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically- fourth edition; approved standard. 1997;17:4-25.
77. Woods GL, Washington JA. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. Pp 1327-1341. (En: Manual of Clinical Bacteriology. 6th edition. ASM Press. Washington. 1995.
78. Paik G, Suggs MT. Reagents, stains and miscellaneous test procedures. Pp930-950. (En: Manual of Microbiology 2nd. Ed. Ed.American Society for Microbiology. Washington1974).

79. Chávez MJ. Determinación de resistencia antimicrobiana en bacterias asociadas con infección respiratoria aguda. Tesis. USAC. Facultad de C.C.Q.Q. y Farmacia. 1989.
80. Gustafsson LL, Wide K. Marketing of obsolete antibiotics in Central America. *Lancet* 1981;1:31-33.
81. Kunin CM. Report from the Antimicrobial Agents Committee. *J Infect Dis* 1987;156:700-704.

Tabla No. 1
PROPIEDADES FENOTÍPICAS DE ESPECIES DE *Campylobacter* sp.

Microorganismo	Catalasa	Reducción de Nitratos	Reducción de Nitritos	Requisitos de H ₂	Ureasa	H ₂ S (TSI)	Hidrólisis del Hipurato	Hidrólisis de Indoxil Acetato	Crecimiento a:			Crecimiento en:			Susceptibilidad a:	
									15°C	25°C	42°C	NaCl al 3.5%	Glicina al 1%	Agar MacConkey	Acido Nalidixico	Cefalotina
<i>C. jejuni</i> subsp <i>jejuni</i>	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	S	R
<i>C. jejuni</i> subsp <i>doylei</i>	V	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	S	R
<i>C. coli</i>	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	S	R
<i>C. fetus</i> subsp <i>fetus</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	V	S
<i>C. fetus</i> subsp <i>venerealis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	R	S
<i>C. lari</i>	+	+	-	-	V	-	-	-	-	+	-	+	+	-	R	R
<i>C. upsallensis</i>	D	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	V	-	-	S	S
<i>C. mucosalis</i>	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	R	S
<i>C. concisus</i>	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	R	R
<i>C. curvus</i>	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	S	ND
<i>C. rectus</i>	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	S	ND

D, reacción débil; S, susceptible; R, resistente; V, variable.
Referencia: Murray PR, et al. Manual of Clinical Bacteriology. 6th edition. ASM Press. Washington. 1995.

Tabla No. 2
MEDIOS DE CULTIVO EVALUADOS PARA EL AISLAMIENTO DE *Campylobacter jejuni*

MEDIO DE CULTIVO	BASE	ENRIQUECIMIENTO	SUPLEMENTO
BUTZLER	Agar Columbia	Sangre de carnero al 7 por ciento	Bacitracina Cicloheximida Sulfato de colistín Cefazolina sódica Novobiocina
SKIRROW	Agar Columbia	Sangre de carnero al 7 por ciento	Vancomicina Polimixina B Lactato de Trimetroprim
PRESTON	Agar Columbia	Sangre de carnero al 7 por ciento	Polimixina B Rifampicina Trimetroprim Cicloheximida
KARMALI	Agar Columbia	Sangre de carnero al 7 por ciento	Piruvato sódico Cefoperazona Vancomicina Cicloheximida
BLASER-WANG	Agar Columbia	Sangre de carnero al 7 por ciento	Vancomicina Polimixina B Trimetroprim Anfotericina B Cefalotina
FILTRACION	Agar Columbia	Sangre de carnero al 7 por ciento	- - - - -

Referencia: Bridson EY. The Oxoid Manual. 6th. Ed. 1990. Alpha Print Alton, Hants. 2.65-2.73.

Tabla No. 3
AGENTES ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS EN LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO SELECTIVO DE
Campylobacter jejuni

Antibióticos (mg/L)	Butzler	Blaser-Wang	CCDA	Preston	Skirrow	Karmali
Anfotericina	-	2	-	-	-	-
Bacitracina	25,000*	-	-	-	-	-
Cefalotina	-	15	-	-	-	-
Cefazolin	15	-	-	-	-	-
Cefoperazona	-	-	32	-	-	32
Colistin	10,000*	-	-	5,000*	-	-
Ciclohexamida	50	-	-	100	-	100
Novobiocina	5	-	-	-	-	-
Polimixina	-	2,500*	-	-	2,500*	-
Rifampicina	-	-	-	10	-	-
Trimetoprim	-	5	-	10	5	-
Vancomicina	-	10	-	-	10	20
Piruvato sódico	-	-	-	-	-	100

El Método de Filtración no contiene ningún agente antimicrobiano inhibitorio en su composición.
Referencia: Bridson EY. The Oxoid Manual. 6th Ed. 1990. Alpha Print Alton, Hants. 2.65-2.73.
Nachamkin I. *Campylobacter and Arcobacter*. Pp xxiii+1482. (En: Manual of Clinical Bacteriology. 6th ed. Ed. ASM Pres: Washington, 1995).

Tabla No. 4

CONCENTRACIONES APROXIMADAS DE AGENTES

ANTIMICROBIANOS EN SUERO

Agente Anti microbiano	Vida Media en Suero (H)	Dosis Unitaria	Concentración más alta alcanzada en Suero ($\mu\text{g/mL}$)		
			Vía Oral	Intra muscular	Intra venoso
Ampicilina	1.1	500 mg	2.5-5	8-10	-
Ciprofloxacina	3.5	500 mg	2.5	-	4.6
	-	400 mg	-	-	-
Eritromicina	1.5	500 mg	2.3	-	-
	-	1 g	-	-	10
Tetraciclina	8	500 mg	4	-	8

Referencia: Nachamkin I. *Campylobacter and Arcobacter*. Pp xxiii+1482. (En: Manual of Clinical Bacteriology. 6th ed. Ed. ASM Press. Washington, 1995).

Tabla No. 5

Valores para interpretación de Susceptibilidad Antimicrobianos
Método de Concentración Inhibitoria Mínima

Agente Antimicrobiano	Susceptible (µg/mL)	Intermedio (µg/mL)	Resistente (µg/mL)
Ampicilina	≤8	16	≥32
Ciprofloxacina	≤1	2	≥4
Eritromicina	≤0.5	1-4	≥8
Tetraciclina	≤4	8	≥16

Referencia: NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically- fourth edition; approved standard. 1997;17:4-25.

Tabla No. 6

Esquema de Diluciones de Antimicrobianos utilizadas en el
Método de Concentración Inhibitoria Mínima (MIC)

Solución Antimicrobiana			Volu men (mL)	Diluyen te (mL)	Concen tración Intermedia ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. Final, dilución 1:10 en agar ($\mu\text{g/mL}$)
Paso No.	Concentrac ión ($\mu\text{g/mL}$)	Fuente				
1	5120	Stock	-	-	5120	512
2	5120	Paso 1	1	1	2560	256
3	5120	Paso 1	1	3	1280	128
4	1280	Paso 3	1	1	640	64
5	1280	Paso 3	1	3	320	32
6	1280	Paso 3	1	7	160	16
7	160	Paso 6	1	1	80	8
8	160	Paso 6	1	3	40	4
9	160	Paso 6	1	7	20	2
10	20	Paso 9	1	1	10	1
11	20	Paso 9	1	3	5	0.5
12	20	Paso 9	1	7	2.5	0.25
13	2.5	Paso 12	1	1	1.25	0.125

Referencia: NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically- fourth edition; approved standard. 1997;17:4-25.

Tabla No. 7

SOLVENTES Y DILUYENTES UTILIZADOS PARA LA PREPARACION DE SOLUCIONES STOCK Y DILUCIONES DE AGENTES ANTIMICROBIANOS

Antimicrobiano	Solvente	Diluyente
Ampicilina	Buffer de fosfatos, pH 8.0, 0.1 mol/L	Buffer de fosfatos, pH 6.0, 0.1 mol/L
Ciprofloxacina	Agua	Agua
Eritromicina	Etanol al 95%	Agua
Tetraciclina	Agua	Agua

Referencia: NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically- fourth edition; approved standard. 1997;17:4-25.

Tabla No. 8

Concentración Inhibitoria Mínima de Cepas de Referencia utilizadas para el Control de Calidad en Ensayos de Susceptibilidad Antimicrobiana

Agente Antimicrobiano	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 ($\mu\text{g/MI}$)
Ampicilina	0.25-1	0.5-2	2-8
Ciprofloxacina	0.12-0.5	0.25-2	0.004-0.015
Eritromicina	0.25-1	1-4	-
Tetraciclina	0.25-1	8-32	1-4

Referencia: NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically- fourth edition; approved standard. 1997;17:4-25.

Tabla No. 9

**COMPARACION DEL CRECIMIENTO DE DIFERENTES RIBOTIPOS DE
Campylobacter jejuni EN DIVERSOS MEDIOS DE CULTIVO PARA SU AISLAMIENTO**

MEDIO DE CULTIVO UFC/gr HECES	BLASER-WANG	KARMALI	PRESTON	SKIRROW	METODO DE FILTRACION	BUTZLER
10 ⁸	X	X	X	--	XXXX	X
10 ⁶	--	--	--	--	XXX	--
10 ⁵	--	--	--	--	XX	--
10 ⁴	--	--	--	--	X	--
10 ²	--	--	--	--	X	--

X: Sí hubo crecimiento bacteriano.

--: No hubo crecimiento Bacteriano.

X: Escaso.

XXX: Abundante

XX: Regular cantidad.

XXXX: Muy abundante

Referencia: López Ruano, JV. Infecciones por *Campylobacter jejuni* en niños: ¿infecciones recurrentes o persistentes? Comparación de cepas por Ribotipia. 1994. Tesis USAC Facultad de C.C.Q.Q y Farmacia

Tabla No. 10

**SENSIBILIDAD OBSERVADA EN LAS CEPAS DE *C. jejuni* A LOS
4 AGENTES ANTIMICROBIANOS ESTUDIADOS**

	1,987-1,989			1,999-2,000		
	Susceptible (%)	Intermedio (%)	Resistente (%)	Susceptible (%)	Intermedio (%)	Resistente (%)
Ampicilina	98	0	2	50	0	50
Ciprofloxacina	99	1	0	66.7	0	33.3
Eritromicina	97	3	0	83.3	16.7	0
Tetraciclina	97	2	1	16.7	33.3	50

Resultados obtenidos por el método de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) interpretados de acuerdo a los puntos de corte reportados en la Bibliografía (12, 77).

Tabla No. 11

Resultados de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de las Cepas de *C. jejuni* Analizadas en el presente estudio

Página 1 de 6

Cepa No.	Ampicilina			Ciprofloxacina			Eritromicina			Tetraciclina		
	Susceptible (µg/mL)	Intermedio (µg/mL)	Resistente (µg/mL)	Susceptible (µg/mL)	Intermedio (µg/mL)	Resistente (µg/mL)	Susceptible (µg/mL)	Intermedio (µg/mL)	Resistente (µg/mL)	Susceptible (µg/mL)	Intermedio (µg/mL)	Resistente (µg/mL)
1	0.250			0.125			0.125			< 0.125		
2	0.500			< 0.125			< 0.125			< 0.125		
3	8.			0.250			< 0.125			4		
4			32	< 0.125			< 0.125			1		
5	0.500			< 0.125			< 0.125					
6	0.125			< 0.125			< 0.125			< 0.125		
7	0.500			< 0.125			< 0.125			< 0.125		
8	1			< 0.125			< 0.125			< 0.125		
9	< 0.125			< 0.125			< 0.125			< 0.125		
10	0.125			< 0.125			< 0.125			0.500		
11	0.125			< 0.125			< 0.125			0.125		
12	0.125			< 0.125			< 0.125			< 0.125		
13	0.250			0.125			< 0.125			< 0.125	2	
14	< 0.125			< 0.125			< 0.125			< 0.125		
15	< 0.125			< 0.125			< 0.125			< 0.125		
16	0.125			< 0.125			< 0.125			1		
17	0.250			< 0.125			< 0.125		2	< 0.125		

González WP.

Tabla No. 11
Página 2 de 6

Cepa No.	Ampicilina			Ciprofloxacina			Eritromicina			Tetraciclina		
	Susceptible ($\mu\text{g/mL}$)	Intermedio ($\mu\text{g/mL}$)	Resistente ($\mu\text{g/mL}$)	Susceptible ($\mu\text{g/mL}$)	Intermedio ($\mu\text{g/mL}$)	Resistente ($\mu\text{g/mL}$)	Susceptible ($\mu\text{g/mL}$)	Intermedio ($\mu\text{g/mL}$)	Resistente ($\mu\text{g/mL}$)	Susceptible ($\mu\text{g/mL}$)	Intermedio ($\mu\text{g/mL}$)	Resistente ($\mu\text{g/mL}$)
18	8			0.125			0.500					
19	1			< 0.125			< 0.125					
20	0.125			0.125			< 0.125					
21	0.250			< 0.125			< 0.125					
22	0.500			0.125			< 0.125					
23	< 0.125			< 0.125			< 0.125					
24	0.250			< 0.125			< 0.125					
25	0.500			< 0.125			< 0.125					
26	2			< 0.125			< 0.125					
27	0.500			0.250			< 0.125					
28	0.500			< 0.125			< 0.125					
29	0.500			< 0.125			< 0.125					
30	0.250			0.250			< 0.125					
31	0.500			< 0.125			< 0.125					
32	0.125			1			< 0.125					
33	< 0.125			< 0.125			< 0.125					
34	0.500			< 0.125			< 0.125					
33	0.125			< 0.125			< 0.125					
34	0.250			< 0.125			< 0.125					
35	0.250			0.125			< 0.125					

González WP.

Tabla No. 11
Página 3 de 6

Cepa No.	Ampicilina			Ciprofloxacina			Eritromicina			Tetraciclina		
	Susceptible ($\mu\text{g/mL}$)	Intermedio ($\mu\text{g/mL}$)	Resistente ($\mu\text{g/mL}$)	Susceptible ($\mu\text{g/mL}$)	Intermedio ($\mu\text{g/mL}$)	Resistente ($\mu\text{g/mL}$)	Susceptible ($\mu\text{g/mL}$)	Intermedio ($\mu\text{g/mL}$)	Resistente ($\mu\text{g/mL}$)	Susceptible ($\mu\text{g/mL}$)	Intermedio ($\mu\text{g/mL}$)	Resistente ($\mu\text{g/mL}$)
36	0.250			< 0.125			< 0.125			< 0.125		
37	1.25				2		< 0.125			< 0.125		
38	0.500			< 0.125			< 0.125			0.250		
39	0.500			0.250			< 0.125			2		
40	0.125			0.250			< 0.125			0.125		
41	1			0.125			< 0.125			4		
42	0.125			< 0.125			< 0.125			0.125		
43	0.250			< 0.125			< 0.125			0.125		
44	0.250			< 0.125			0.250			< 0.125		
45	0.250			0.250			< 0.125			2		
46	0.250			< 0.125			< 0.125			< 0.125		
47	< 0.125			< 0.125			< 0.125			< 0.125		
48	< 0.125			< 0.125			< 0.125			0.125		
49	1			< 0.125			0.125			< 0.125		
50	0.250			0.500			< 0.125			0.125		
51	0.500			< 0.125			< 0.125			< 0.125		
52	< 0.125			< 0.125			< 0.125			< 0.125		
53	0.125			< 0.125			< 0.125			2		
54	1			0.250			< 0.125			< 0.125		
55	0.250			< 0.125			< 0.125			< 0.125		

González WP.

Tabla No. 11
Página 4 de 6

Cepa No.	Ampicilina			Ciprofloxacina			Eritromicina			Tetraciclina		
	Susceptible (µg/mL)	Intermedio (µg/mL)	Resistente (µg/mL)	Susceptible (µg/mL)	Intermedio (µg/mL)	Resistente (µg/mL)	Susceptible (µg/mL)	Intermedio (µg/mL)	Resistente (µg/mL)	Susceptible (µg/mL)	Intermedio (µg/mL)	Resistente (µg/mL)
56	0.125			< 0.125			< 0.125			< 0.125		
57	1			< 0.125			< 0.125			0.125		
61	58	0.250			< 0.125			< 0.125			< 0.125	
62	59	0.125			< 0.125			< 0.125			< 0.125	
63	60	0.125			< 0.125			< 0.125			< 0.125	
64	0.250			< 0.125			< 0.125			1		
65	0.125			< 0.125			< 0.125			0.500		
66	0.250			< 0.125			< 0.125			< 0.125		
67	< 0.125			0.250			< 0.125			< 0.125		
68	8			0.250				1		2		
69	1			0.250			< 0.125			0.250		
70	0.125			< 0.125						< 0.125		
71	0.125			0.500			< 0.125			0.125		
72	0.125			< 0.125			< 0.125			< 0.125		
73	0.250			< 0.125			< 0.125			< 0.125		
74	2			0.250			< 0.125			< 0.125		
75	0.250			< 0.125			< 0.125			< 0.125		
76	0.125			< 0.125			< 0.125			< 0.125		
77	2			< 0.125			< 0.125			< 0.125		
78	0.125			< 0.125			< 0.125			< 0.125		

González WP.

Tabla No. 11
Página 5 de 6

Cepa No.	Ampicilina			Ciprofloxacina			Eritromicina			Tetraciclina		
	Susceptible ($\mu\text{g/mL}$)	Intermedio ($\mu\text{g/mL}$)	Resistente ($\mu\text{g/mL}$)	Susceptible ($\mu\text{g/mL}$)	Intermedio ($\mu\text{g/mL}$)	Resistente ($\mu\text{g/mL}$)	Susceptible ($\mu\text{g/mL}$)	Intermedio ($\mu\text{g/mL}$)	Resistente ($\mu\text{g/mL}$)	Susceptible ($\mu\text{g/mL}$)	Intermedio ($\mu\text{g/mL}$)	Resistente ($\mu\text{g/mL}$)
79	0.250			< 0.125			< 0.125					< 0.125
80	< 0.125			< 0.125			< 0.125					< 0.125
81	0.125			< 0.125			< 0.125					0.500
82	2			< 0.125			< 0.125					< 0.125
83	< 0.125			< 0.125			< 0.125		2			< 0.125
84	0.250			< 0.125			< 0.125					< 0.125
85	< 0.125			< 0.125			< 0.125					< 0.125
86	< 0.125			< 0.125			< 0.125					0.125
87	< 0.125			< 0.125			< 0.125		2			< 0.125
88	1			< 0.125			< 0.125					0.125
89	2			< 0.125			< 0.125					< 0.125
90	0.250			< 0.125			< 0.125					< 0.125
91	0.500			0.125			< 0.125					< 0.125
92	0.500			< 0.125			< 0.125					< 0.125
93			32	1			< 0.125					< 0.125
94	< 0.125			0.500			< 0.125				1	
95	0.500			0.250			< 0.125					16
96	0.250			< 0.125			< 0.125					< 0.125
97	0.125			< 0.125			< 0.125					0.500
98	2			0.125			< 0.125					0.125

González, WP.

Tabla No. 11
Página 6 de 6

Cepa No.	Ampicilina			Ciprofloxacina			Eritromicina			Tetraciclina		
	Susceptible ($\mu\text{g/mL}$)	Intermedio ($\mu\text{g/mL}$)	Resistente ($\mu\text{g/mL}$)	Susceptible ($\mu\text{g/mL}$)	Intermedio ($\mu\text{g/mL}$)	Resistente ($\mu\text{g/mL}$)	Susceptible ($\mu\text{g/mL}$)	Intermedio ($\mu\text{g/mL}$)	Resistente ($\mu\text{g/mL}$)	Susceptible ($\mu\text{g/mL}$)	Intermedio ($\mu\text{g/mL}$)	Resistente ($\mu\text{g/mL}$)
99	< 0.125			< 0.125			< 0.125			< 0.125		
100	< 0.125			< 0.125			0.125			0.125		
101			32									32
102			64	1				1				16
103	1					8	< 0.125				8	
104			64	0.500			0.250				8	
105	8			< 0.125			< 0.125			1		
106	1			< 0.125								32

González, WP.

Tabla No. 12

**COMPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS PARA EL
AISLAMIENTO DE *Campylobacter jejuni*
POR MEDIO DEL METODO DE FILTRACION**

Medio de Cultivo	Dilución 10⁸ (µg/mL)	Dilución 10⁶ (µg/mL)	Dilución 10⁴ (µg/mL)	Dilución 10² (µg/mL)
Blaser Wang	x	NC	NC	NC
Butzler	x	X	NC	NC
Butzler con la mitad de los suplementos	xx	X	x	NC
Karmali	x	NC	NC	NC
Preston	x	X	NC	NC
Skirrow	x	NC	NC	NC

NC: No se observó crecimiento de *C. jejuni*.

X: Sí hubo crecimiento de *C. jejuni*.

- En este estudio se analizó una cepa de *C. jejuni* ATCC 33291 por duplicado y 2 de los Ribotipos que fueron los más aislados en Guatemala (Ribotipos 3 y 4) por el método de filtración utilizando como medio de cultivo los diferentes agares disponibles comercialmente.

Tabla No. 13

Resultados del Estudio de PBS como Medio de Transporte para el Cultivo de *Campylobacter jejuni*

Tiempo de Transporte	Dilución 10 ⁸ (µg/mL)		Dilución 10 ⁶ (µg/mL)		Dilución 10 ⁴ (µg/mL)		Dilución 10 ² (µg/mL)	
	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
0 horas	X	X	X	X	NC	X	NC	NC
24 horas	X	X	NC	NC	NC	NC	NC	NC
48 horas	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
72 horas	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
96 horas	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

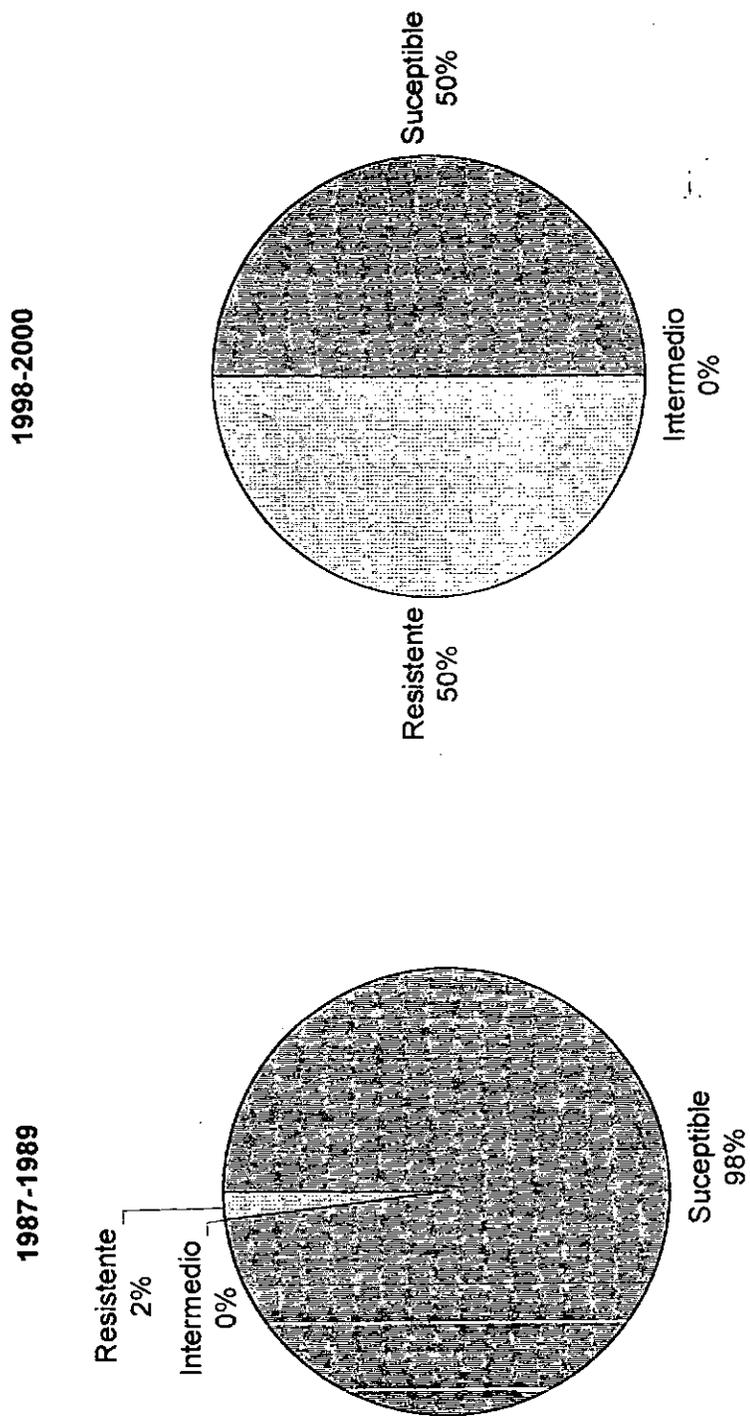
NC: No se observó crecimiento de *C. jejuni*.

X: Sí hubo crecimiento de *C. jejuni*.

- En este estudio se analizó una cepa de *C. jejuni* ATCC 33291 y una cepa de cada uno de los Ribotipos que fueron aislados en Guatemala (Ribotipos 1 al 8).

Gráfica No. 1

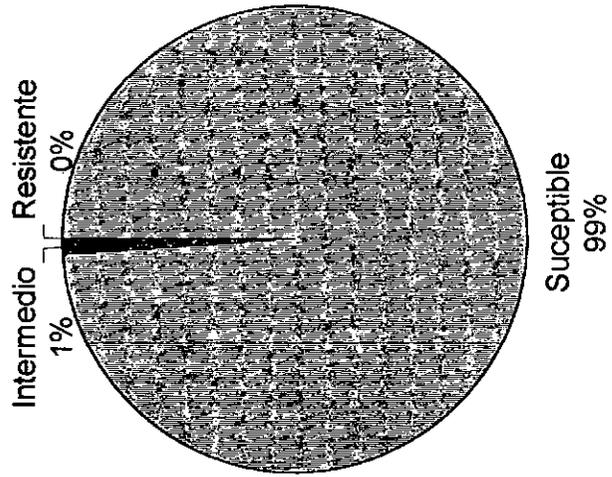
Rangos de Resistencia encontrados para la Ampicilina



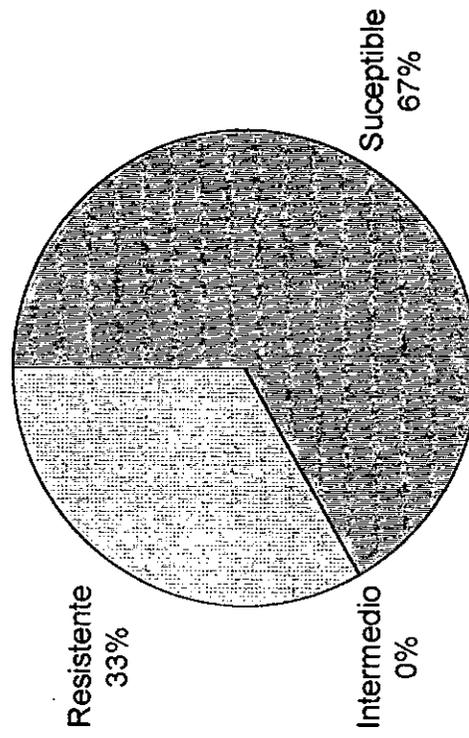
Gráfica No. 2

Rangos de Resistencia encontrados para la Ciprofloxacina

1987-1989

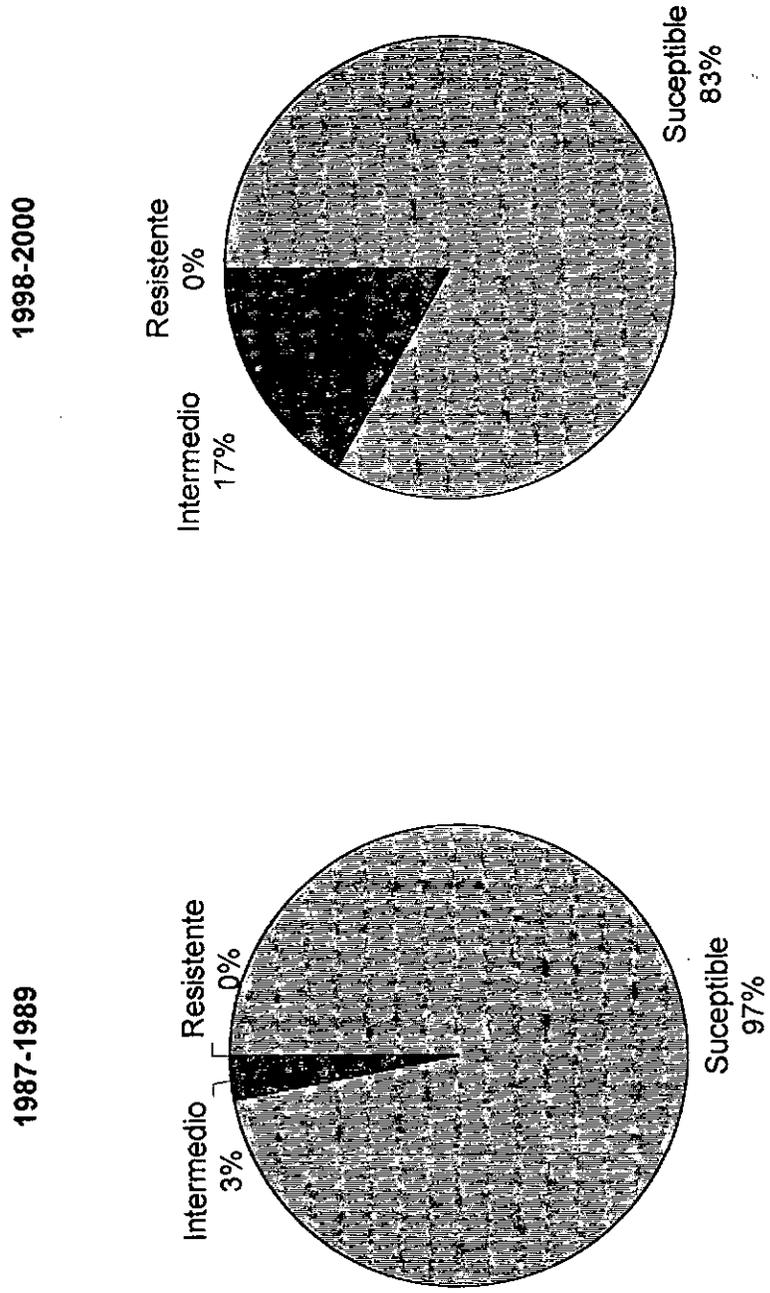


1998-2000



Gráfica No. 3

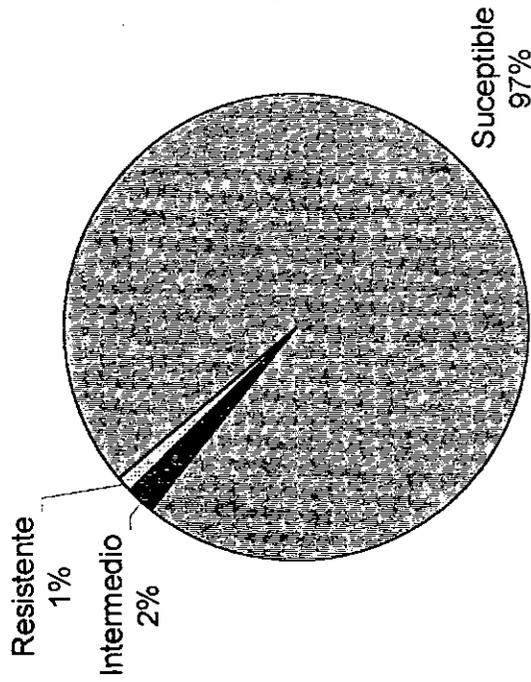
Rangos de Resistencia encontrados para la Eritromicina



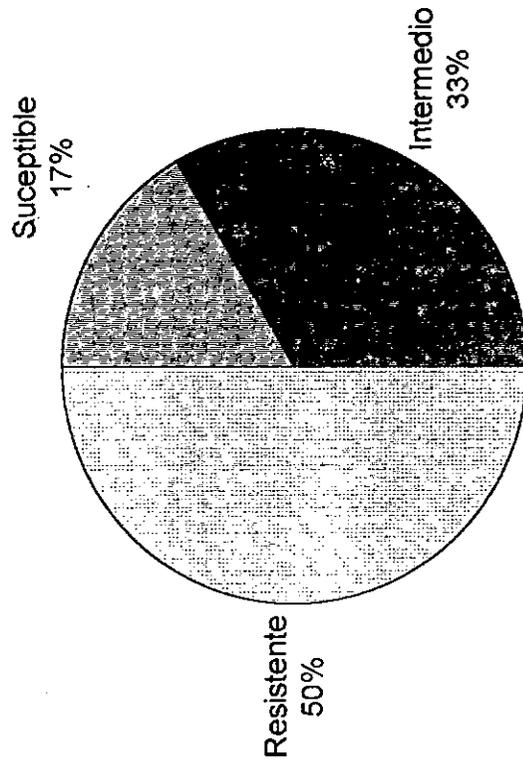
Gráfica No. 4

Rangos de Resistencia encontrados para la Tetraciclina

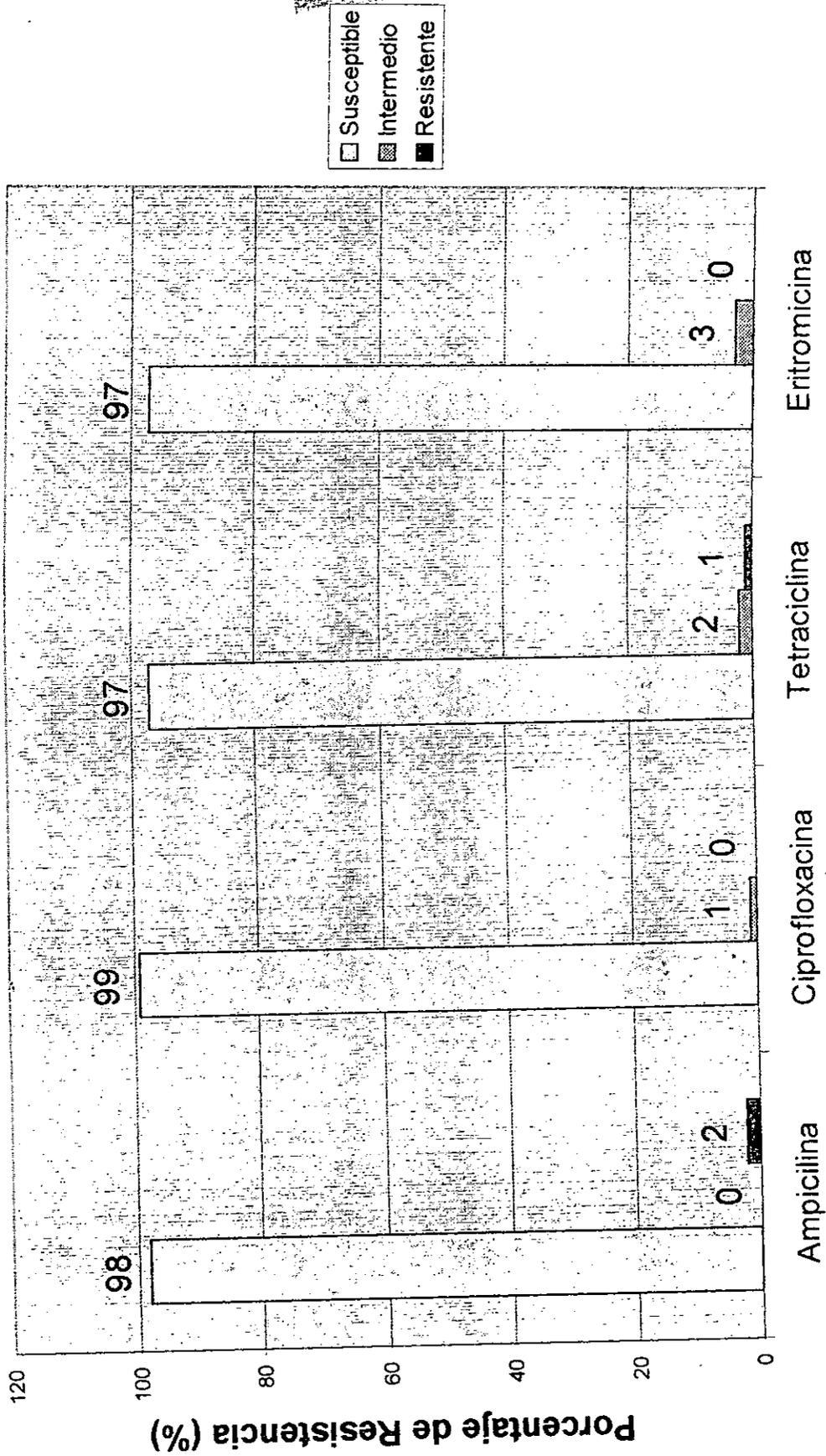
1987-1989

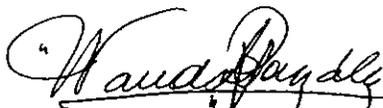


1998-2000



Gráfica No. 5
 Porcentajes de Susceptibilidad en los aislamientos de 1,987 a 1,989





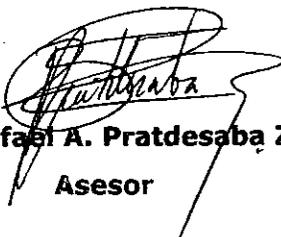
Br. Wanda Patricia González Pérez

Tesista



Licda. Olga Torres de Matute

Asesora



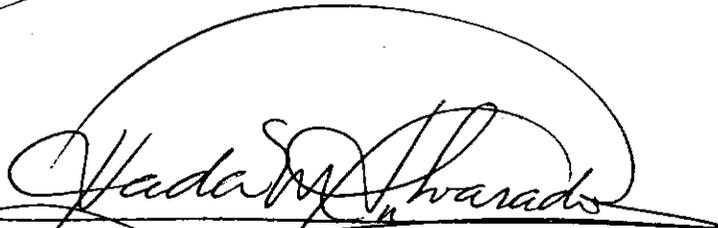
Lic. Rafael A. Pradesaba Z.

Asesor



Licda. Heidi Elke Logemann Lima

DIRECTORA



Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta

DECANA