

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

The seal of the Universidad de San Carlos de Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a figure holding a staff, surrounded by various symbols including a crown, a cross, and a banner. The shield is flanked by two columns. The outer ring of the seal contains the Latin motto: "CETERAS ORBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER".

**COMPARACIÓN POR RIBOTIPIA DE CEPAS DE  
*Campylobacter jejuni*, AISLADAS DE NIÑOS DE GUATEMALA Y DE  
VISITANTES EXTRANJEROS**

**Informe de Tesis**

Presentado por  
Mildred Carolina Figueroa Gabriel

Para optar al título de  
Química Bióloga

Guatemala, Julio del 2007

## INDICE

I. RESUMEN		4-5
II. INTRODUCCIÓN		6-8
III. ANTECEDENTES		
<i>A. Campylobacter jejuni</i>		
1. Historia		
		9
2. Características Generales del Microorganismo		
		9
3. Fisiopatogenia		
		9- 10
4. Manifestaciones Clínicas		
		10-11
5. Epidemiología		
		12-13
a. Fuentes de Transmisión		
		12-13
b. Incidencia		
		13- 14
c. Población en riesgo		
		14
6. Tratamiento		
		14-15
7. Aislamiento e Identificación		
		15-18
a. Detección Antigénica		
		16-17
b. Atmósfera de incubación		
		17
b.1 Reemplazo de una atmósfera normal por una mezcla		
de gases apropiada		
		17
b.2 Sobres generadores de gases especiales		
		17
b.3 Utilizando una bolsa plástica		
		17
c. Temperatura de incubación		
		17-18
B. Métodos Moleculares de Diagnóstico		
		18-22

1. Extracción y Purificación del ADN	18
2. Electroforesis en gel	18
3. Desnaturalización de ácidos nucleicos	18 - 19
4. Hibridación	19
5. Endonucleasas de Restricción	19-20
6. Southern Blot	20-21
7. Ribotipos	21
8. Estudios Realizados anteriormente	21-22
IV. JUSTIFICACIÓN	23-24
V. OBJETIVOS	25
VI. HIPÓTESIS	26
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	27-41
1. Universo de Trabajo	27
2. Muestra	27
3. Recursos	27-31
4. Procedimientos	31-40
5. Diseño de Investigación	41
VIII. RESULTADOS	42-50
IX. DISCUSION DE RESULTADOS	51-54
X. CONCLUSIONES	55
XI. RECOMENDACIONES	56
XII. REFERENCIAS	57-60
XIII. ANEXOS	61-74

## I. RESUMEN

En los últimos años se ha observado un incremento de los casos de *C. jejuni* y de resistencia a antibióticos de tratamiento de elección a nivel mundial, causada frecuentemente por la adquisición de nuevos genes por mutación, por transferencia vertical, horizontal y por elementos genéticos móviles tales como plásmidos de resistencia o transposones como respuesta a la presión selectiva que el uso de antibióticos implica (45). La infección por estos microorganismos, también se ha asociado con el desarrollo del Síndrome de Reiter, una artropatía reactiva (44) y Síndrome de Guillain-Barré (43, 44, 45).

En el presente estudio se trabajó con un total de 40 cepas de *C. jejuni* resistentes a uno o más de los antimicrobianos de uso común (eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina y ampicilina), 26 cepas de *C. jejuni* aisladas de niños habitantes de Santa María de Jesús recolectadas durante 2001-2003, y con 14 cepas aisladas de turistas adultos que visitaban Antigua Guatemala durante 1998-2003.

Dichas cepas habían sido previamente aisladas e identificadas, y estaban caracterizadas por el método de Concentración Inhibitoria Mínima según metodología del (CIM), lo que permitió observar diferentes patrones de resistencia entre ambos grupos. Con el fin de comparar a nivel genético las cepas circulantes en niños de Guatemala y en viajeros que visitaban Guatemala, los aislamientos fueron tipificados por medio del método de ribotipia en el Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá. El ADN geonómico fue extraído por medio de proteinasa K y digerido con las enzimas de restricción Pst I y Bgl I.

El estudio permitió identificar 12 ribotipos en cepas aisladas de niños y 11 ribotipos en cepas aisladas de adultos, el 16% de cepas aisladas en adultos

presentan más del 90% de similitud con respecto a las cepas provenientes de niños.

El 85% de cepas aisladas en adultos presentaron menor del 70% de similitud con respecto a las cepas provenientes de niños, esto debido a que presentan diferencias genéticas significativas.

El 100% de cepas presentan resistencia a ciprofloxacina, al realizar el análisis se puede observa que el 100% de cepas presenta una característica en común siendo esta la presencia de una banda en común a nivel de 1974kb.

## II. INTRODUCCIÓN

En Guatemala, las infecciones gastrointestinales son uno de los principales problemas de salud, especialmente en niños menores de tres años. Entre los agentes etiológicos causantes de estas infecciones se encuentra *Campylobacter*; siendo *Campylobacter jejuni* la causa más frecuente de campilobacteriosis (1, 2), principalmente en el área rural de Guatemala, donde es responsable de hasta el 18% de los casos en preescolares y donde habita el 60% ó más de la población guatemalteca.

Actualmente se estima que *C. jejuni* afecta unos dos millones de personas en el mundo, aproximadamente 1% de la población mundial (3). Las manifestaciones clínicas se caracterizan por diarrea profusa, que se acompaña de dolor abdominal, muscular, cefalea, malestar y fiebre (4,5). Sin embargo la infección puede presentar complicaciones inmunorreactivas tales como síndrome de Guillain Barré (SGB) o artritis reactiva (6). En Guatemala, cada año se investigan alrededor de 200 casos de SGB, condición muy seria que provoca gran sufrimiento a la familia del enfermo y alto costo de atención de estos pacientes llega alrededor de seis mil quetzales diarios por paciente, y su estancia hospitalaria puede ser desde quince días hasta años. El SGB requiere hospitalización en unidades de cuidados intensivos e incluso puede causar la muerte de los pacientes<sup>1</sup>. Además, el incremento de la resistencia de *C. jejuni* a antibióticos de uso común como eritromicina, ciprofloxacina, ampicilina, gentamicina y otros, es una emergencia que se está registrando en diferentes partes del mundo (7) y constituye un serio problema para la salud pública global.

En Guatemala W. González y col. en un estudio realizado durante 1998-2000 demostró que *C. jejuni*, incrementó su resistencia antimicrobiana a un 50% para ampicilina y tetraciclina y a 33.3% para ciprofloxacina (8).

---

<sup>1</sup> Fuente: Hospital Roosevelt

A nivel molecular en el año de 1990 en Guatemala, se realizó un estudio utilizando cepas de *C. jejuni* aisladas de niños con y sin diarrea, se categorizaron ocho diferentes ribotipos. Los resultados sugirieron reinfecciones por diferentes cepas de esta bacteria en un mismo niño, a lo largo de los dos años de seguimiento (9).

En los últimos años, se encontró *C. jejuni* en 18% de los casos de diarrea aguda en niños de Santa María de Jesús, Sacatepequez, por lo tanto, es muy importante investigar las características de infección por *C. jejuni* y compartirlas con las autoridades de salud para que se promuevan políticas públicas para prevenir la enfermedad diarreica por *C. jejuni*.

En Guatemala, resultados de estudios recientes conducidos por la universidad de Johns Hopkins y el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, demostraron que los turistas que visitan Guatemala desde los EE.UU. sufren de diarrea del viajero. Un grupo de los casos estudiados, presentó diarrea por *C. jejuni* (8).

En el presente estudio se analizaron cepas de *C. jejuni* aisladas durante 2001 a 2003 de niños con y sin diarrea de la comunidad de Santa María de Jesús, Departamento de Sacatepéquez y cepas aisladas de adultos que visitaron Antigua Guatemala y participaron en proyectos realizados por el INCAP y la Universidad de Jonhs Hopkins en los años 1998 a 2003.

Se determinó y comparó los patrones de ribotipos de *C. jejuni* circulantes en niños de Guatemala y se observó que presentan diferencias entre los patrones encontrados en viajeros que visitan Guatemala.

Esto se logró comparando los resultados de la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima de las cepas de ambos grupos y utilizando el

método de ribotipaje. Este consiste en la agrupación de bacterias usando sondas de genes que codifican el ARN ribosomal, estableciendo patrones de la región de ADN que codifica para la síntesis de ARN ribosomal. Estos son marcadores genómicos valiosos sumamente conservados, que permiten comparar cepas de la misma especie, con fines de epidemiología molecular.



### III. ANTECEDENTES

#### A. *Campylobacter jejuni*

##### 1. Historia

Las primeras observaciones bacterianas semejantes a *Campylobacter* fueron realizadas por Escherich en 1936 a partir de material fecal de niños con diarrea, denominándolas *Vibrio*, en 1931 Jones y Little aislaron a partir de bovinos un vibrión microaerofílico al que denominaron *Vibrio jejuni* (2, 10).

La primera asociación entre estas bacterias curvas y diarrea en el hombre fue surgida por Levy en 1946, el que realizó un estudio en un brote de gastroenteritis en 357 pacientes en dos establecimientos penales en Illinois (10).

##### 2. Características Generales del Microorganismo:

*Campylobacter jejuni* es una bacteria Gram negativa con forma de tirabuzón, delgada, curva y móvil, pequeña (0.3-0.6  $\mu\text{m}$  de diámetro, 0.5-5  $\mu\text{m}$  de ancho), no esporulada. Presenta un flagelo no envainado en uno o dos de sus extremos (2,11). Es un organismo microaerofílico, oxidasa positivo, que no fermenta ni oxida los carbohidratos (7). Es relativamente frágil y sensible al medio ambiente (2). Debido a sus características microaerófilas, este organismo requiere de 3 a 5% de oxígeno, 10% de dióxido de carbono y 85% de nitrógeno gaseoso como condiciones óptimas de crecimiento. Actualmente, esta bacteria es reconocida como un enteropatógeno de gran importancia (4, 12).

##### 3. Fisiopatogenia:

*C. jejuni* es una de las especies de patógenos entéricos clínicamente más importantes en la actualidad para el hombre (13, 14, 15).

El microorganismo se adquiere por vía oral (ingestión de comidas o bebidas contaminadas), o por contacto con animales infectados. *C. jejuni* es sensible al pH gástrico, por lo que debe ingerirse un inóculo de 500 a 1000 células bacterianas para que se establezca una infección (10, 13). El período de incubación es de 1 a 7 días. El daño al huésped y las manifestaciones clínicas dependen principalmente

de dos factores: el inóculo ingerido y el estado inmunológico del huésped (3). El principal mecanismo de patogenicidad es la invasión de la mucosa intestinal. La infección afecta tanto al intestino delgado como al intestino grueso (16). Estas bacterias no poseen fimbrias pero, se ha demostrado que el flagelo y el lipopolisacárido actúan como adhesinas que le permiten adherirse a la célula epitelial y al mucus intestinal (10, 17).

Muchas cepas pueden invadir las células epiteliales, provocando infiltrados inflamatorios de la lámina propia y abscesos en las criptas, apareciendo eritrocitos y leucocitos en las heces (diarreas inflamatorias) (14, 16).

También pueden atravesar mucosa intestinal y proliferar en la lámina propia y ganglios, generando infecciones extraintestinales.

La diarrea acuosa se debe a que *C. jejuni* produce una enterotoxina termolábil, semejante a la colérica (4, 14).

#### **4. Manifestaciones Clínicas:**

El período diarreico o agudo se caracteriza por la aparición de una diarrea profusa, que se acompaña de dolor abdominal y muscular, cefalea, malestar y fiebre (4, 5). Las heces son líquidas o acuosas y a los 2 ó 3 días pueden contener sangre. En adultos, pueden existir vómitos, y en los niños la fiebre y el dolor pueden ser menos frecuentes (17, 18).

La enfermedad es autolimitante, alcanzando su mayor expresión entre el segundo y cuarto día, remitiendo completamente al séptimo día. La presentación puede ser variable, desde una forma de corta duración a un cuadro más severo y prolongado, con características similares a shigellosis (10, 16).

En pacientes inmunocomprometidos pueden presentarse complicaciones como una colitis aguda, las complicaciones son consecuencia de extensión local, como colecistitis, pancreatitis, cistitis, artritis reactiva, peritonitis, puede surgir bacteremia cuya incidencia no se conoce (13, 14). Las infecciones producidas por este género se presentan con una frecuencia 39 veces más alta en pacientes con infección VIH que en la población general. En un estudio realizado en la ciudad de Los

Ángeles entre los años 1983 a 1987, el 10% de los episodios diarreicos que acontecen en pacientes con infección por VIH se aísla como agente causal a *C. jejuni* (13, 14). Además, se incrimina como posible responsable del Síndrome de Guillain Barré (SGB), un desorden desmielinizante que afecta nervios periféricos causando una parálisis progresiva cuya recuperación tarda de 6 semanas a 2 años; este síndrome se relaciona con anticuerpos contra componentes del lipopolisacárido de *C. jejuni* que reaccionan con los gangliósidos GM1 del tejido nervioso (20, 22). Se calcula que el SGB se presenta en 1 de cada 1000 pacientes que sufren infecciones por *Campylobacter* (10, 15, 20). Rees, en un estudio que incluyó 103 pacientes con la enfermedad (SGB), encontró que el 26% de los afectados tenían evidencias de infección reciente por *C. jejuni* y de ellos el 70% reportó una enfermedad diarreica hasta 12 semanas antes del inicio de los síntomas neurológicos (6). Los datos provenientes de estudios serológicos y de cultivo muestran que entre el 20 y el 40% de los pacientes con SGB se infectaron con *C. jejuni* entre una y tres semanas antes de la aparición de los síntomas neurológicos (19, 21). En Guatemala, cada año se investigan alrededor de 200 casos de SGB. El costo de atención de estos pacientes llega a ser muy elevado, pues requieren hospitalización con unidades de cuidados intensivos e incluso puede causar la muerte de los pacientes. Es por lo tanto muy importante conocer las características de infección por *C. jejuni* y compartirlas con las autoridades de salud para que se promuevan políticas públicas para prevenir la enfermedad diarreica por *C. jejuni*.

De 12 pacientes japoneses con SGB se les confirmó infección por *C. jejuni* a 10 de estos pacientes (83%) (15).

Aspinal y Jacobs en su estudio demostraron títulos muy elevados de anticuerpos antigangliósidos GM1b y GQ1b, los cuales están presentes en los nervios periféricos y nervios craneales de pacientes con SGB asociados a *C. jejuni* (22).

## 5. Epidemiología

La infección por *C. jejuni* constituye una zoonosis de distribución mundial, que afecta con mayor incidencia los países en vías de desarrollo, estas bacterias constituyen la principal causa de gastroenteritis en el hombre (10, 14).

*C. jejuni* se asocia en la mayoría de casos de disentería en niños (17, 23).

### 5. a. Fuentes de Transmisión:

En Canadá se estima que el 20% de la enfermedad causada por *C. jejuni* son debidas a consumo de agua y comida contaminada (24). La fuente de infección esta constituida de la siguiente manera.

#### 5.a.1 Reservorios animales:

Los principales reservorios los constituyen el ganado bovino, ovino, roedores, aves de corral, perros y gatos. El amplio reservorio animal es probablemente la fuente de la mayoría de las infecciones humanas. La vía de infección más frecuente, con relación a este reservorio, es el consumo de carne obtenida de animales infectados. La leche no pasteurizada también constituye un vehículo frecuente de infección (3, 16, 20).

Otra vía de infección humana menos frecuente es el contacto con animales infectados o excremento, ya sea de animales domésticos o como accidente ocupacional en personas expuestas al ganado (2, 10).

Los animales y sus productos derivados han sido identificados de forma precisa como fuente de infección de *C. jejuni*, así como de la resistencia a antimicrobianos de *C. jejuni* (13).

#### 5.a.2 Reservorios Humanos:

La vía de transmisión es fecal-oral entre individuos, en especial entre niños sin control esfinteriano o en ambientes con malas condiciones sanitarias. La transmisión a partir de personas infectadas asintomáticas es extremadamente rara, pero es frecuente cuando la infección es sintomática (16).

Muy raramente se han reportado: infecciones adquiridas por transmisión perinatal in útero, durante el pasaje a través del canal del parto o durante los primeros días de vida (un caso documentado) (11).

### **5.a.3 Reservorios ambientales:**

El agua contaminada puede ser la fuente de brotes de Campylobacteriosis, sobre todo por el consumo de la misma y en vinculación con actividades recreacionales. La contaminación fecal del suelo, principalmente por el consumo de vegetales cosechados en ellas, es una fuente de contaminación por *C. jejuni* (3).

En los países industrializados el microorganismo se transmite principalmente a través de alimentos de origen animal (el consumo de carne de ave de corral mal cocida es responsable del 50-70% de las infecciones esporádicas) (25). Mientras que en los países en vías en desarrollo predomina la transmisión por alimentos y aguas contaminadas, así como el contacto directo con personas o con animales enfermos (3, 24).

### **5.b. Incidencia**

Se estima que afecta a unos dos millones de personas en el mundo, aproximadamente 1% de la población mundial (3).

En los Estados Unidos, infecta entre dos y cuatro millones de personas cada año, siendo la principal causa de diarrea a nivel mundial y la segunda causa más común en los Estados Unidos (2, 26).

En Gran Bretaña la incidencia de infección reporta 58,000 casos de Campylobacteriosis en 1998, siendo superior a los casos de *Salmonella* (18, 26).

En Dinamarca constituye la causa más común de enfermedad zoonótica transmitida por alimentos, con 82 casos/100,000 habitantes (14, 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, África y Latinoamérica, en donde en general se observan aislamientos del 10

al 20% en la población en general, especialmente en niños. En Singapur se ha aislado a *C. jejuni* de un 1.2%, en Nigeria un 5.2%, en China un 11.3% de personas con diarrea (8).

En Guatemala son pocos los estudios que se han realizado sobre *C. jejuni*, sin embargo en una investigación realizada en el municipio de Santa María de Jesús en el Departamento de Sacatepéquez durante los años 1988 a 1989 se reporta como causante del 12.1% de niños con diarrea y del 7% de las disenterías (12). En las áreas marginales de la ciudad de Guatemala, se le reporta en el 9.5% de los niños con diarrea (27). Torres MF, lo reporta como la causa del 10% de las diarreas en niños menores de 5 años; y Torres OR y colaboradores lo reportan como el causante del 5.6% de diarreas en áreas urbano-marginales de Guatemala (7, 12, 27).

En estudios recientes *C. jejuni* se asoció con el 24% de diarreas severas en niños hospitalizados y con el 15% de diarreas en niños de un área urbana indígena, en un estudio de tres años de duración realizado en menores de 36 meses de edad en Santa María de Jesús (8).

### **5.c. Población en riesgo**

Aunque cualquier individuo puede ser infectado por *C. jejuni*, los niños menores de 5 años y los adultos jóvenes (15-29 años) son los grupos de mayor vulnerabilidad en comparación con otras edades (7, 18). En los países desarrollados, la enfermedad surge en gente joven entre 10 y 30 años. En tanto que en los países en vías de desarrollo aparece a lo largo de los primeros 5 años de vida (13, 14).

### **6.Tratamiento**

El cuadro clínico es autolimitante en personas adultas, es decir, se recuperan espontáneamente sin necesidad de tratamiento, excepto rehidratación y reposición hidroelectrolítica. En aquellos pacientes con disenterías graves, heces sanguinolentas, duración superior a los 7 días, infecciones severas en niños o

pacientes inmunocomprometidos se recomienda dar tratamiento antibiótico. El medicamento de elección es la eritromicina (2,4). En adultos se utiliza la ciprofloxacina, tetraciclina (2, 14). Sin embargo se ha observado resistencia a estos antimicrobianos, por lo cual se recomienda realizar una vigilancia activa de la susceptibilidad de *C. jejuni* (3).

El aumento de la resistencia se asocia con el uso de antibióticos en la cría de animales, así como a un tratamiento inadecuado en el hombre. También se ha asociado a viajes al extranjero, especialmente países fuera de Europa (28).

En Noruega en el año 2001 se reportaron 64 casos por 1000 habitantes de gastroenteritis por *C. jejuni*, las cepas presentaban una resistencia de 7% a ciprofloxacina y 10% a eritromicina (29). En Finlandia se observó un 3% de resistencia (8). En Guatemala el INCAP ha realizado un estudio sobre resistencia antimicrobiana en cepas de *C. jejuni* por el método de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) observando que durante los años 1987 a 1989 este microorganismo era susceptible a los agentes antimicrobianos de elección para su tratamiento tales como eritromicina 97%, ciprofloxacina 99%, sin embargo en un estudio realizado durante 1998 a 2000 la susceptibilidad a eritromicina fue de 9.5% mientras que para la ciprofloxacina se observó un 33.3% de cepas resistentes (8).

La sensibilidad al ácido nalidíxico para *C. jejuni* se puede tomar como un marcador de sensibilidad a la ciprofloxacina ya que las cepas que son sensibles al ácido nalidíxico lo son para ciprofloxacina mientras que las resistentes lo son también para esta quinolona de segunda generación. El surgimiento de cepas ácido nalidíxico resistentes, plantea un problema ya que el laboratorio depende de esta prueba para la clasificación del mismo a nivel de especie para la identificación de *C. jejuni* (29).

## **7. Aislamiento e Identificación**

Para el aislamiento a partir de material fecal, los medios selectivos más comunes se basan en agar sangre y antibióticos para inhibir el crecimiento excesivo de la microbiota fecal competitiva; los más usados son Butzler, Skirrow y

Campy-Bap (4, 10). No obstante, estudios recientes de las muestras de origen guatemalteco demostraron que las mismas se inhiben completamente por los suplementos de Skirrow y en menor grado por los del medio de Butzler (8). Los criterios a seguir para la identificación de *C. jejuni* son: morfología microscópica, tinción de Gram, ausencia de hemólisis y desarrollo de colonias grises en agar butzler. La confirmación es realizada por pruebas bioquímicas tales como: prueba de oxidasa, prueba de catalasa, hidrólisis del hipurato y la susceptibilidad al ácido nalídixico y la cefalotina. El desarrollo de técnicas de filtración, que permiten el paso de estas bacterias tomando ventaja de su movilidad, pero retienen las bacterias de mayor tamaño como las de la flora entérica, ha demostrado ser mejor para el aislamiento de *C. jejuni* en Guatemala. Este método se realiza en un medio no selectivo, como agar sangre, es actualmente uno de los métodos modernos para el aislamiento primario de *Campylobacter*, en las muestras fecales frescas. Cuando se requiere medio de transporte se recomienda el uso de hisopo en medio Cary Blair, el cual se resiembró en agar Butzler (10, 17). Este método requiere atmósfera microaerofílica a 37° C, no a 42° C disminuyendo la necesidad de otra incubadora (8).

Endtz y col. compararon un medio selectivo Skirrow y la técnica de filtración por membrana, las tasas de aislamiento más elevadas se observaron cuando el medio se utilizó en combinación con la técnica de filtración (21).

### **7.a. Detección Antigénica:**

Debido a los problemas de recuperación e identificación de especies de *Campylobacter*, se han creado técnicas directas, como aglutinación en látex (19). Meritec-Campy (Meridian Diagnostics, Cincinnati, OH) es una prueba de aglutinación de látex utilizada para la identificación de aislamientos en cultivo.

Un estudio publicado informó una sensibilidad del 100% para la detección de *C. jejuni* utilizando este método. Campyslide (Becton Dickinson Microbiology Systems), es otra prueba útil para la confirmación en el género de cultivos de los cuatro *Campylobacter* patógenos principales, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, y *C. fetus*;



en un trabajo de Hodinka y Gilligan, se examinaron un total de 50 aislamientos clínicos de especies de *Campylobacter* (45 cepas de *C. jejuni* y 5 cepas de *C. coli*), con concordancia total entre el Campyslide y los métodos convencionales, 1 de 173 aislamientos de cepas no *Campylobacter* dio un resultado positivo falso. A medida que aumenta la importancia de las campylobacterias en pacientes con SIDA y otros cuadros de inmunosupresión, surgirán otras técnicas directas (21).

### **7. b. Atmósfera de incubación:**

Existen varios métodos para obtener una atmósfera adecuada para el desarrollo de estos microorganismos (10).

#### **7.b.1 Reemplazo de una atmósfera normal por una mezcla de gases apropiada:**

Se retira el aire contenido en una jarra anaeróbica con bomba de vacío y se reemplaza por una mezcla conteniendo 85% de nitrógeno, 10% de dióxido de carbono, y 5% de oxígeno (10, 16).

**7.b.2 Sobres generadores de gases especiales para *Campylobacter*:** son sobres que aportan una atmósfera aproximada de 5-10% de oxígeno y 5-12% de dióxido de carbono (14).

**7.b.3 Utilizando una bolsa plástica:** Es el método más económico, utilizando una bolsa plástica con cierre tipo cremallera (tipo zip-lock) y generar la atmósfera microaerofílica llenándola con una mezcla de gas 85 por ciento de nitrógeno, 10% de CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> (10).

### **7. c. Temperatura de incubación**

Las especies de *C. jejuni* para su aislamiento utilizan una temperatura de

42 °C, ésta actúa como inhibidor adicional de la flora fecal (4, 10). Cuando se utiliza el método del filtro, crece bien a 37°C lo cual tiene ventajas prácticas favorables, al reducir la necesidad de otra incubadora (18).

### **B.Métodos Moleculares de Diagnostico.**

La biología molecular permite aislar y reproducir secciones específicas de la hélice del ADN, así como determinar la secuencia de sus bases y establecer su función, por una diversidad de métodos (13, 30).

#### **1. Extracción y Purificación del ADN:**

El primer requerimiento es una muestra de ADN libre de otros compuestos celulares. Inicialmente se toma una suspensión celular, las células se lisan para liberar el ADN, se añade alcohol y el ADN precipita en la interfase. La solución acuosa se trata con RNAsas para eliminar el ARN, las proteínas se eliminan usando fenol (31).

#### **2. Electroforesis en gel:**

La electroforesis en gel es el procedimiento por el cual moléculas cargadas migran en un campo eléctrico. El grado de movilidad se determina por su tamaño y su carga eléctrica. En la electroforesis en gel, el ácido nucleico se incluye en el gel, normalmente de agarosa o de policrilamida. El gel es una red compleja de fibrillas y el tamaño de poro puede controlarse por la forma en que se prepara el gel. Los ácidos nucleicos migran a través de estos poros dependiendo de su tamaño y de su forma. Después de un tiempo de migración, la ubicación de las moléculas de ADN en el gel son observables por iluminación con luz ultravioleta (bromuro de etidio) o radioactividad (31).

#### **3.Desnaturalización de los ácidos nucleicos**

Las dos cadenas del ADN están unidas por puentes de hidrógeno que pueden romperse por acción del calor sin afectar los enlaces covalentes que unen

a los nucleótidos, si el ADN calentado se enfría lentamente, la doble cadena vuelve a formarse permitiendo realizar hibridaciones con cadenas de ADN procedentes de fuentes distintas (13, 32).

#### **4.Hibridación de Ácidos Nucleicos**

La hibridación es la construcción artificial de ácidos nucleicos bicatenarios a partir de dos monocatenarios y por complementariedad de bases. Cuando una solución de ADN que ha sido calentada se enfría lentamente, se produce la rehibridación espontánea, dando lugar a la estructura inicial. Tal reasociación ocurre sólo si las secuencias de bases son complementarias. Este es un método que permite estudiar el grado de relación genética entre dos ácidos nucleicos, permite la detección de fragmentos de ADN que son complementarios a fragmentos monocatenarios de secuencia conocida (sondas) (13, 33).

Existen dos posibles fuentes de sondas. Primero, se puede usar DNA clonado de un organismo muy relacionado (sonda heteróloga) para lo cual hay que reforzar las condiciones de hibridación para compensar las diferencias naturales entre las dos secuencias. Segundo, se puede obtener una sonda por síntesis química. La secuencia de nucleótidos de una sonda sintética se puede deducir de una secuencia conocida de aminoácidos de la proteína que esta codificada por el gen que se busca (genética inversa) (31).

#### **5.Endonucleasas de restricción**

Son enzimas que hidrolizan los ácidos nucleicos rompiendo enlaces internucleótidos del interior de la cadena, son producidas principalmente por bacterias que hidrolizan enlaces fosfodiéster del esqueleto del ADN de doble hebra en secuencias específicas. Una de las primeras endonucleasas de restricción que se caracterizó fue de la bacteria *Escherichia coli* y se designó EcoRI. Estas enzimas se denominan con la inicial del nombre del género en letras mayúsculas seguido de las dos primeras letras del nombre de la especie en minúscula, y utilizando números romanos para designar el orden de

caracterización de diferentes endonucleasas de restricción del mismo organismo (26, 32).

BglIII proviene de la bacteria *Bacillus globigii* y fue la segunda en orden de descubrimiento. La secuencia de reconocimiento de esta enzima es:

A↓ GATCT en donde la flecha indica el sitio de corte (31,34).

T↓ CTAGA

PstI proviene de la bacteria *Providencia stuarti* y fue la primera en orden de descubrimiento. La secuencia de reconocimiento es.

CTGCA↓ G en donde la flecha indica el sitio de corte (31,34).

G ↓ACGTC

Las propiedades de las endonucleasas de restricción fueron investigadas en los años 1960 por Werner Arber, un bioquímico suizo en la Universidad de Ginebra (31).

## 6. Southern Blot

El Southern blot es una técnica que permite la identificación de secuencias específicas de ADN, mediante uso de electroforesis en gel y de hibridación utilizando sondas específicas (26). Para analizar una muestra de ADN cromosomal esta debe ser previamente fragmentada con enzimas de restricción.

Los fragmentos obtenidos se separan, de mayor a menor tamaño mediante una electroforesis en gel de agarosa. Una vez terminada la electroforesis y sin teñir el gel, los fragmentos de ADN se transfieren a un filtro de nitrocelulosa o a una membrana de nylon. El filtro se incuba con una sonda marcada, específica para la secuencia que se desea identificar, por medio de lavados se elimina la sonda que no se unió, y se determina la posición en la que se ha producido una

unión específica por detección enzimática, por radioisótopos, o por quimioluminiscencia. El patrón de hibridación se puede comparar directamente con la región del gel original en la que están las secuencias de ADN que interesan (35,36).

## **7. Ribotipos:**

La agrupación de bacterias en un sistema de tipificación usando sondas de genes que codifican el ARN ribosomal se denomina ribotipaje (26).

Stull y colaboradores fueron los primeros en reportar la utilidad del uso del ARN ribosomal de *E. coli*. (molécula altamente conservada) como sonda para ADN cromosómico en Southern blots para tipificar cepas bacterianas (37).

Grimont y Grimont sugieren que los modelos de restricción de genes ARNr proveen una amplia información para la descripción y tipificación de diferentes especies de bacterias (38).

La ribotipia ha sido el más sensible de los 10 métodos usados para la discriminación entre grupos epidemiológicamente definidos de cepas de *Campylobacter* (9).

Los cistrones ARNr presentan marcadores geonómicos valiosos, ya que se conservan en la bacteria, pero difieren entre las especies en número y localización (31).

La ribotipia ha probado ser útil para diferenciar cepas de *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas cepacia*, *E. coli*, *Campylobacter jejuni* y otras (37, 38).

## **8. ESTUDIOS REALIZADOS ANTERIORMENTE**

En Guatemala, se realizó un estudio utilizando cepas de *C. jejuni* aisladas de niños con y sin diarrea en la comunidad de Santa María de Jesús, realizado por el INCAP entre 1987 y 1989, en él se categorizaron ocho diferentes ribotipos, de los cuales los patrones más comunes en las cepas estudiadas fueron: el ribotipo tres, el ribotipo dos, el ribotipo cuatro, los niños con diarrea presentaban en común el ribotipo tres, los resultados sugirieron reinfecciones por diferentes cepas

de esta bacteria en un mismo niño, a lo largo de los dos años de seguimiento. El patrón de resistencia de estas cepas indicó una progresiva adquisición de resistencia a eritromicina y ciprofloxacina (5, 8, 9).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

*Campylobacter jejuni*, es responsable de prácticamente el doble de casos registrados de enteritis por *Salmonella*. La dosis de infección es muy pequeña y en los últimos años, las tasas de incidencia por *C. jejuni* varían entre 25 y 250 por cada 100,000 personas, siendo un grave problema para la salud pública en todo el mundo (13, 18).

Las infecciones por *C. jejuni* puede presentar serias complicaciones inmunorreactivas tales como síndrome de Guillain Barré (SGB) o artritis reactiva (19).

En Guatemala, las infecciones gastrointestinales son la segunda causa de morbilidad en niños menores de 5 años. *Campylobacter* es considerado como uno de los principales agentes etiológicos de estas infecciones, sin embargo no se investiga de rutina (2, 10).

En las áreas marginales de la ciudad de Guatemala, se reporta en el 9.5% de los niños con diarrea. Torres MF, lo reporta como la causa del 10% de las diarreas en niños menores de 5 años; Torres OR y colaboradores lo reportan como el causante del 5.6% de diarreas en áreas urbano-marginales de Guatemala. Observaciones recientes (2001-2003) determinaron que se asocia con 15 % de las diarreas severas en niños menores de tres años (los más vulnerables nutricionalmente) y como causa de diarrea severa, que requirió de hospitalización, se ha encontrado el 24% de niños menores de 36 meses (7, 12, 27, 13).

Actualmente, en estudios efectuados en Guatemala se ha observado que *C. jejuni* ha desarrollado resistencia a antimicrobianos utilizados como tratamiento de elección (eritromicina), y alternativos (tetraciclina, ciprofloxacina y ampicilina) en un porcentaje significativo de las cepas estudiadas (8).

La infección por especies de *Campylobacter* es frecuente en niños, pacientes inmunosuprimidos y viajeros provenientes de países desarrollados. En Guatemala prevalecen las condiciones necesarias para el desarrollo de las enfermedades gastrointestinales, este factor predispone a la población en general a la susceptibilidad de adquirir la infección por *Campylobacter*, en casos de infección crónica es necesario administrar tratamiento antimicrobiano. No obstante, no se reporta porque los métodos para aislarlo no están implementados en la rutina diagnóstica.

Desde el año 1998 al 2003 se llevó a cabo un ensayo clínico controlado de una vacuna en turistas estadounidenses que visitaban Antigua Guatemala. Un total de 1,800 pacientes fueron monitoreados con cultivos fecales a su arribo al país y cada vez que se enfermaban era analizada toda muestra diarreica, o bien una vez a la semana y antes de salir de regreso a EE.UU. En este grupo de pacientes se aislaron 14 cepas de *C. jejuni* altamente resistente a ciprofloxacina y a la eritromicina.

Al comparar los patrones de resistencia de las cepas aisladas de niños del área rural cercana a Antigua Guatemala, Santa María de Jesús, con los de las cepas presentes en turistas, se observó una marcada diferencia. Con el objetivo de investigar profundamente esta observación, se propuso comparar los ribotipos de 26 cepas de *C. jejuni* aisladas de niños, con 14 cepas de *C. jejuni* aisladas de adultos extranjeros, por medio de ribotipia y de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).



## V. OBJETIVOS

### 1. General

Comparar los patrones de ribotipos de cepas de *C. jejuni* resistentes a antimicrobianos de uso común, aisladas de niños de Guatemala y visitantes extranjeros.

### 2. Específico

1. Determinar los ribotipos de cepas resistentes a uno o más de los antimicrobianos de uso común (eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina y ampicilina) aisladas durante 2001-2003 en niños habitantes de Santa María de Jesús y de cepas aisladas durante 1998-2003 en turistas adultos que visitaban Antigua Guatemala.

2. Determinar si los patrones de cepas de *C. jejuni* circulantes en niños de Guatemala presentan alguna diferencia con los patrones encontrados en cepas de *C. jejuni* aisladas de viajeros adultos que visitaron Guatemala.

## VI. HIPÓTESIS

Existen diferencias entre los ribotipos de las cepas de *C. jejuni* aisladas de niños de Santa María de Jesús Guatemala y las cepas aisladas de turistas provenientes de EE.UU.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Universo de Trabajo

Cepas de *Campylobacter jejuni*

### B. Muestra

1. 26 cepas de *C. jejuni*, resistentes a antimicrobianos aisladas de niños de la comunidad de Santa María de Jesús, Departamento de Sacatepéquez en un estudio sobre etiología aguda de diarrea realizado por el INCAP entre 2001 - 2003.
2. 14 cepas *C. jejuni*, resistentes a antimicrobianos aisladas de adultos que visitaron Antigua Guatemala y participaron en proyectos realizado por el INCAP y la Universidad de Johns Hopkins en los años 1998 a 2003.

Las cepas recolectadas fueron aisladas e identificadas por los laboratorios de Microbiología y Virología del INCAP, y se conservan en cultivos stock a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Asimismo en estudios previos se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), por el método de referencia: Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically- fourth edition; approved standard (NCCLS).

### C. Recursos

#### i. Materiales

##### a) Materiales de laboratorio

- Cajas de Petri 100x15mm
- Asas bacteriológicas no calibradas
- Pipetas serológicas

- Tips
- Hisopos estériles
- Bolsas plásticas
- Gradillas de metal
- Servilletas de papel
- Papel parafinado
- Papel aluminio
- Parafilm
- Tubos de microcentrifuga
- Agitador magnético
- Papel filtro
- Papel para cromatografía Whatman 3 MM
- Membranas de nylon MSI Magnagraph
- Guantes de látex
- Recipientes para descarte
- Hielera
- Rollos fotográficos Polaroid

➤ **Cristalería**

- Beakers de 25, 100, 250, 500 ml
- Erlenmeyer de 250, 500, 1,000 ml
- Balón aforado de 50, 100, 250, 500, 1000 ml
- Probetas de 10, 50, 100, 500, 1000 ml
- Pipetas de 1, 5, 10, 25 ml
- Embudos
- Frascos con tapón de rosca de 500 ml
- Viales para microcentrifuga
- Vidrios cuadrados de diferentes tamaños
- Pipetas Pasteur
- Moldes y vidrios para electroforesis

- Tubos de ensayo 13x100 con tapón de rosca
- Bandejas pirex de vidrio de diferente tamaño

#### **b) Equipo**

- Autoclave (Castle Steam Sterilizer)
- Campana bacteriológica
- Horno (Willco)
- Horno microondas
- Micropipetas automáticas
- Balanza (AND FX 3200, EK- 120A)
- Incubadoras a 37°C y 42°C (Thelco 32 M)
- Refrigeradora (Hot Point)
- Congeladores (Pro-Scientific) a -70°C y -20°C
- Vortex (GENIE – 2, Scientific Industries)
- Potenciómetro
- Pipetores (Holt Line No. 24583)
- Mechero bunsen
- Rotador automático ( Eberbach Corporation)
- Centrífuga para tubos eppendorf (Eppendorf)
- Baño de Maria con agitación (Blue M Electric Company)
- Cámara para electroforesis horizontal (Hoefer Scientific)
- Fuente de poder para electroforesis (Hoefer Scientific)
- Bomba de Vacío (Fisher Scientific)
- Sellador de bolsas plásticas (Micro-Seal)
- Transiluminador (Fotodyne)
- Cámara fotográfica Polaroid
- Rollos fotográficos Polaroid 667 instantánea blanco y negro

#### **c) Medios de cultivo**

- Agar ( sangre de carnero al 7.5 %)

**d) Requerimientos especiales de cultivo**

- Sobres Campy-Pak
- Jarras Gas-pak

**e) Reactivos**

- Extracción de ADN: QIAamp DNA extraction kit (Quiaagen, Chatswoth CA).
- Etanol al 70 por ciento
- Agua estéril HPLC

**f) Electroforesis de ADN:**

- Agarosa (Sigma No. A-9539) 0.7- 1.0 por ciento en buffer Tris-boratos-EDTA (TBE 1 X)
- Buffer TBE 10x (tris-boratos-EDTA)
- EDTA 0.5 M pH 8
- Bromuro de etidio (Sigma)
- Marcador de peso molecular de ADN (ADN molecular Weight marker III, Dig-Labeled cat 1218-603, Roche)
- Buffer de carga (azul de bromofenol, sucrosa en agua)

**g) Digestión de ADN con enzimas de restricción**

- buffer enzima # 10X (Roche)
- Enzima Pst I, (Roche, cat No. 621633, 10,000 U)
- Enzima Bgl I, (Roche, cat No. 621641, 5000 U)

**h) Southern blotting**

- HCL 0.25 M
- agua Desmineralizada estéril
- NaOH 0.5 M
- NaCl 1.5 M

- Tris Hcl 0.5 M
- Buffer 20 x SSC,
- Buffer 2X SSC
- Buffer 6X SSC.
- Bromuro de etidio (Sigma)

i) **Marcación de ARN** con digoxigenina. Transcripción reversa de rARN en c ADN, Kit Detection DIG ADN Labeling, Roche.

**j) Prehibridación, Hibridación y Lavados.**

- Solución de hibridación (Ácido málico 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5),
- Reactivo de bloqueo ( 10 por ciento Reactivo de bloqueo, Buffer de hibridación)
- Buffer de lavado ( ácido málico 0.1 M, NaCl 0.15 M, 0.3 por ciento, Twen 20, pH 7.5)
- Buffer de detección ( Tris HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M, pH 9.5)
- Solución de color ( vial # 9 NBT / BCIP Kit detection DIG ADN Labeling Roche, buffer de detección)
- Agua estéril.

**D. Procedimientos**

**a. Recuperación de cultivos stock:**

Los cultivos en caldo tripticasa soya con 15 por ciento de glicerol, de las cepas obtenidas en los estudios realizados anteriormente en Santa María de Jesús y Antigua Guatemala que se encuentran congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$ , se sacaron por grupos de 5 viales cada vez.

Se tomó de cada vial 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 carnero. Se incubó a  $36^{\circ}\text{C}$  por 48 horas, en condiciones microaerofílicas.

**b. Extracción de material genético:****i. Extracción usando el QIAamp DNA extraction kit .**

- Se recolectó crecimiento de *C. jejuni* con un hisopo estéril, resuspendiéndolo en 180 ul de buffer ATL.
- Se agregó 20 ul de Proteinasa K
- Se mezcló en vórtex por 15 segundos
- Se incubó en baño de María a 56°C por una hora.
- Se agregó 200 ul de buffer AL.
- Se mezcló en vórtex por 15 segundos
- Se incubó en baño María a 70°C por 10 minutos
- Se agregó 200ul de etanol absoluto.
- Se mezcló en vórtex por 15 segundos
- Se transfirió la muestra a la columna de extracción
- Se centrifugó la columna de extracción a 8000 rpm, durante 1 minuto.
- Se descartó el filtrado.
- Se agregó 500 ul de buffer de lavado 1
- Se centrifugó nuevamente la columna a 8000 rpm, por 3 minutos.
- Se descartó el filtrado.
- Se agregó 500 ul de buffer de lavado 2
- Se centrifugó la columna a 12000 rpm por 3 minutos.
- Se descartó el filtrado.
- Se agregó 200 ul de agua destilada estéril.
- Se dejó en reposo por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifugó la columna a 8000 rpm por un minuto.
- Se recolectó el filtrado en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml y almacenar a 20°C hasta su posterior utilización ó A 4 °C si se va a utilizar pronto (39).



**c. Chequeo de la calidad del ADN por el método de minigel:**

- Se preparó un gel de agarosa al 0.7%, en buffer TBE 1x con 1 peine,
- Se solidificó el gel de agarosa.
- Se inoculó 10 ul de ADN + 10 ul de buffer de carga en el pozo correspondiente para cada muestra.
- Se dejó correr con buffer TBE 1x, por dos horas a 40 miliamperios.
- Se observó las bandas en ultravioleta para verificar la calidad de cada muestra de ADN
- Se tomó foto y guardaron las muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$  para realizar la restricción (40).

**d. Digestión de ADN con enzimas de Restricción:**

- Se cortó el ADN con la enzima Pst1 y Bgl 1, en el buffer para enzima # 10x.
- Se realizó mezcla maestra en campana, (buffer para enzima 2ul, agua estéril HPLC 4 ul, enzima Pst 1 2 ul, enzima Bgl 1 2 ul). Siempre el volumen final es 10ul para cada muestra.
- Se alicuotó 10 ul de muestra de ADN y 10ul de mezcla maestra .
- Se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por una hora.
- Se desactivó la enzima a  $65^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos en baño maría (40).

**e. Electroforesis de ADN:****i. Gel de Agarosa:**

- Se pesó 1.05 gr de agarosa.
- Se agregó 10 ml de buffer TBE 10X (estéril, en refrigeración). Para geles de 150 ml, usar TBE 10X
- Se completó el volumen a 150 ml con agua desmineralizada.
- Se llevó a ebullición hasta que se disolvieron todos los cristales de agarosa, en horno microondas.
- Se agregó 10 ul de bromuro de etidio.

- Se vertió el gel en el molde apropiado con peines, evitando burbujas.
- Se solidificó treinta minutos y colocarlo a 4°C en una superficie plana.

#### ii. **Inoculación de Muestras:**

- Se agregó 900 ml de buffer TBE 1X al tanque horizontal.
- Se mezcló 10ul de muestra con 10 ul de buffer de carga sobre un pedazo de parafilm.
- Se inoculó en el pozo correspondiente sin formar burbujas.
- Se incluyó controles estándar en el pozo inicial
- Se tapó el tanque cuidando que el polo negativo este cerca de las muestras y el polo positivo en el extremo opuesto.
- Se dejó correr a 20 miliamperios por 16 horas.

#### iii. **Revelado del Gel:**

- Al llegar el frente azul a una pulgada del final del gel, se paro la fuente de poder. Utilizando guantes, se saco el gel del tanque y se llevó al cuarto oscuro.
- Se observó el gel con luz ultravioleta y si el resultado era satisfactorio, se tomó la fotografía.

#### f. **Blots de Southern**

- Se cortó la esquina derecha del gel.
- Se depurino el ADN , sumergiendo el gel en 250 ml de HCl 0.25 M durante 5 minutos.
- Se lavó el gel 3 veces con agua desmineralizada.
- Se trató el gel con 250 ml de NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M por 30 minutos para desnaturalizar el ADN.
- Se descartó la solución desnaturalizante, no lavar el gel.
- Se neutralizó con Tris-HCl 0.5 M, NaCl 1.5M por 30 minutos.

- Se cortaron 4 pedazos de papel Whatman 3mm exactamente del tamaño y forma del gel.
- Se cortó un pedazo de papel filtro un poquito más ancho que el gel y del largo de la bandeja donde se coloca el blot.
- Se mojó la membrana de nylon en 2X SSC por 15 minutos, se cortó la esquina derecha.
- Se llenó el fondo de la bandeja con 20X SSC y se mojó el papel filtro en esta solución.
- Se colocó el papel filtro sobre el soporte. Agregando suficiente 20X SSC para asegurarse de que los extremos del papel filtro estén sumergidos. Se invirtió el gel y se colocó sobre el papel filtro, con una pipeta eliminando las burbujas.
- Se colocó la membrana sobre el gel, marcando el extremo derecho superior del lado opuesto de la membrana, sacando las burbujas.
- Se mojó cada pedazo de papel whatman 3mm en 2XSSC y se colocó sobre la membrana, sacando cualquier burbuja después de cada pieza.
- Se envolvieron las orillas del sandwich del gel y membrana en Saran wrap. Cortando el saran sobre la membrana y se colocando luego una pila de toallas de papel sobre el sándwich, se colocó un segundo soporte sobre las toallas de papel cortadas al tamaño del gel.
- Se colocó una botella de vidrio 1000 ml sobre el vidrio dejando la transferencia toda la noche.
- Después de la transferencia nocturna, se removió la membrana del gel, lavándola en 6x SSC.
- Se dejó secar por una hora poniéndola en papel filtro.
- Se horneó a 80°C durante 30 minutos para fijar el ADN a la membrana.

**g. Marcación de ARN con digoxigenina. Transcripción reversa de rARN en cADN:**

Nota: Todas las cantidades y soluciones fueron calculadas para filtros de 400 cm<sup>2</sup>. Este procedimiento sintetiza suficiente sonda para hibridar filtros de 400 cm<sup>2</sup>.

- A un eppendorf estéril se agregó: 2 ul de primers 10 X (vial 5 hexanucleotide de Genius 1 a -20 °C), 4ul de buffer de reacción 5X (buffer 5x para AMV- transcriptasa reversa a -20 °C, verificar la concentración de cada lote nuevo), 0.25 ul rARN (a 4°C Boehringer Mannheim), 12.75 ul de agua desionizada estéril. Se mezcló durante 3 segundos en la microcentrífuga.
- Se calentó a 68°C durante 5 minutos, luego se enfrió a temperatura ambiente.
- Se agregó: 2ul de dNTPs 10X (vial 6 de Genius 1 a -20°C), 3 ul de transcriptasa reversa (AMV-RT a -20°C), se mezcló centrifugando 5 segundos. Se necesitan 20-30 U de AMV-RT por sonda, calcular el volumen dependiendo de la concentración de la enzima.
- Se incubó a 42°C por una hora.
- Se precipitó la sonda agregando 2 ul de LiCl y 50 ul de etanol frío al 95% (-20°C).
- Se centrifugó a 13,000 RPM durante 15 segundos, se removió el sobrenadante, se lavó el botón con 100 ul de etanol al 70%. Se centrifugó durante 4 minutos, se removió el sobrenadante.
- Se secó durante 15 minutos al vacío.
- Se resuspendió el botón en 20 ul de TE.
- Antes de usar la sonda: Se llevó a ebullición durante 10 minutos y luego se enfrió en hielo durante 5-10 minutos, se transfirió la sonda a 10 ml de solución de hibridación.
- Se agregó la solución de hibridación conteniendo la sonda a la bolsa con el papel filtro prehibridado.

La sonda puede rehusarse hasta cinco veces, descongelándola a temperatura ambiente o 37 °C, seguido de ebullición durante 10 minutos y enfriamiento brusco en hielo durante 5 minutos.

**Instrucciones especiales:** Los reactivos deben sacarse del congelador inmediatamente antes de usar, colocarse en una hielera con hielo picado y usar rápidamente en forma aséptica. Únicamente usar tips nuevos, estériles, nunca reintroducir un tip usado. Estos reactivos son sumamente caros, su pureza y funcionalidad no deben arriesgarse por ahorrar un tip, nunca dejar fuera del descongelador, guardarlos inmediatamente después de usarlos (25).

**h. Marcación de Estándares de ADN en escalera y lambda con digoxigenina Priming al azar.**

Para poder incluir estándares de peso molecular apropiado, detectables por el conjunto antidigoxigenina-fosfatasa alcalina, estos deben marcarse.

- A un eppendorf estéril se agregó: 1ul de escalera de 1 KB, 1ul de Lambda, 1 ul de agua destilada desionizada estéril.
- Se hirvió durante 10 minutos y se enfrió en hielo durante 5 minutos.
- Se agregó: 2 ul de primers 10X, 2 ul de dNTPs, 1 ul de enzima Klenow (mezclar en microcentrifuga por 3 seg).
- Se incubó a 37°C por una hora.
- Se paró la reacción agregando 2 ul EDTA0.2 M a pH 8.0.
- Se precipitó el ADN marcado con 2 ul de LiCl 4M y 60 ul de etanol frío (-20°C). La muestra se mantiene a -70°C por un mínimo de 30 minutos, o por 2 horas a -20°C.
- Se centrifugó durante 5 minutos a 13,000 rpm.

- Se removió el sobrenadante durante 4 minutos a 13,000 rpm. Se descartó el sobrenadante, se secó al vacío por 15 minutos, y se disolvió en 50 ul de TE a pH 8.0
- Se transfirió 10 ul de la suspensión ADN-TE a un tubo conteniendo 10 ml de solución de hibridación y sonda de ARNr (39).

i. **Cómo Estimar el rendimiento del ADN marcado con digoxigenina:**

El kit detection DIG ADN labeling contiene ADN control marcado, que puede usarse en un ensayo directo para estimar el rendimiento de ADN marcado con digoxigenina. Este proceso confirma que la reacción de marcación fue exitosa y que produjo suficiente muestra para aplicaciones subsiguientes.

- Se realizaron diluciones seriadas del ADN marcado como control en buffer de dilución de ADN. Las diluciones se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  por un mínimo de un año.
- Se colocó 1 ul de las diluciones B-E en una membrana de nylon cargada positivamente, marcando la membrana débilmente con un lápiz para identificar cada dilución.
- Se fijó el ADN a la membrana horneando por 30 minutos a  $80^{\circ}\text{C}$ .
- Se agregó 30 ml buffer ácido maleico 0.15 M pH 7.5 por 2 minutos, con agitación.
- En una bolsa plástica se introdujo la membrana agregando 10 ml de solución de reactivo de bloqueo / buffer de hibridación dilución 1:9
- Se sacaron las burbujas y se selló, dejando reposar 30 minutos.
- Se descartó el reactivo anterior, agregando solución de conjugado (2ul de vial 8 kit detection DIG ADN labeling, Roche, 10 ml de sol. de hibridación).
- Se selló la bolsa y se dejó reposar 30 minutos.
- Se lavó con 20 ml de buffer de lavado 2 veces por 15 minutos.
- Se equilibró con 10 ml de buffer de detección 2-5 minutos.

- Se agregó solución de color, dejando reposar en lugar oscuro toda la noche.
- Se paró la reacción, lavando la membrana con agua destilada.
- Se dejó secar.
- Se comparó la intensidad de las manchas del control y de las diluciones de la sonda para estimar la concentración de la sonda preparada (25,40).

j. **Pre-hibridación, Hibridación y Lavados:**

i. **Pre-hibridación:**

- Se preparó la solución de hibridación y se colocó en baño maría, hasta que el reactivo se disolviera.
- Se agregó 50 ml de solución de hibridación a una bolsa conteniendo la membrana, hibridando en baño maría a 68°C, con agitación por una hora.
- Se removió la solución de pre-hibridación de la bolsa. Se rodó una pipeta sobre la bolsa para remover cualquier solución remanente.

ii. **Hibridación:**

- Se agregó 10 ml de solución de hibridación conteniendo la sonda marcada a la bolsa. La solución de hibridación conteniendo la sonda debe desnaturalizarse hervir durante 10 minutos y enfriarse en hielo antes de ser agregada a la bolsa.
- Se sacaron las burbujas rodando una pipeta y se selló la bolsa con calor, se incubó a 68°C en baño de maría, dejando toda la noche con agitación.

iii. **Lavados:**

- Se prepararon los reactivos conforme se usaron.
- Se abrió la bolsa de una esquina y se guardó la solución de sonda en un tubo estéril de vidrio, congelando a -20°C.

- Se colocó la membrana en un pirex de vidrio y se agregó buffer de lavado por 5 minutos, se descartó la solución.
- Se incubó por 30 minutos en 100 ml de solución de bloqueo en pirex de vidrio, manteniendo en baño maría sin calor.
- Se incubó por 30 minutos en 20 ml de solución de anticuerpo, se puso en movimiento sin calor.
- Se lavó 2 veces por 15 minutos en 100 ml de buffer de lavado
- Se equilibró en 20 ml de buffer de detección, por 5 minutos.
- Se incubó en 20 ml de solución de color en un pirex de vidrio.
- Se dejó reposar en oscuridad, hasta observar las bandas.
- Se paró la reacción, lavando la membrana por 5 minutos con agua destilada.
- Se dejó secar la membrana al aire libre



## **D. Diseño de Investigación:**

### **1. Tipo de muestreo:**

Muestreo no probabilístico por conveniencia.

### **2. Variables:**

Se trabajó con 40 cepas de *C. jejuni* resistentes a uno o más de los antimicrobianos de uso común (eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina y ampicilina) 26 cepas aisladas de niños habitantes de Santa María de Jesús recolectadas durante 2001-2003, y con 14 cepas aisladas de turistas adultos que visitaban Antigua Guatemala durante 1998-2003.

Las cepas analizadas pertenecen a la colección de los laboratorios de Microbiología y Virología del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. Dichas cepas han sido previamente identificadas, y están caracterizadas por el método de Concentración Inhibitoria Mínima.

## **E. Análisis De Resultados.**

**1. Descriptivo:** por medio de tablas, gráficas.

### **2. Comparativo:**

#### **a) Análisis por conglomerados (clusters).**

Es una herramienta estadística que permite ubicar sujetos en subgrupos, utilizado cuando se sospecha la existencia de segmentos pero no se conocen, para ello se utilizó el programa Gene Profiler RFLPscan 3.5.6

#### **b) Dendogramas**

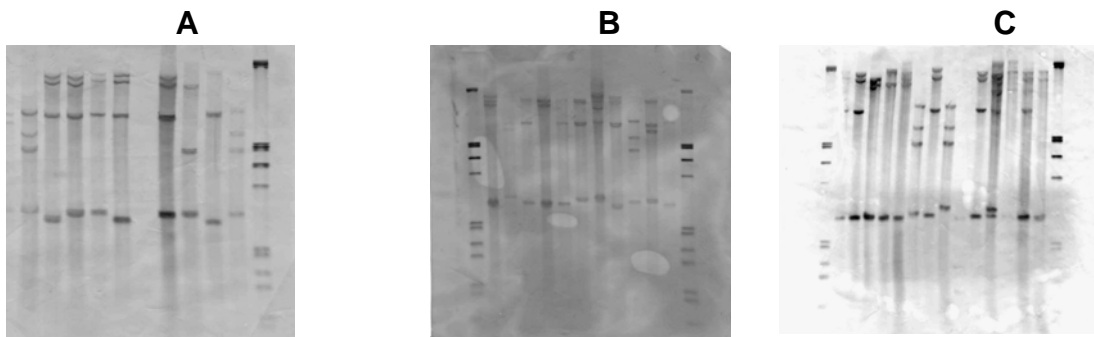
Se generó una matriz de coeficientes de distancias que fue la base para generar un dendograma para cada perfil ribotípico utilizando el método UPGMA ((unweighted Pair-Group Method for arithmetic Averages), esto permitió determinar las relaciones genéticas existentes entre las cepas de las diferentes poblaciones.

## VIII. RESULTADOS

Para el presente estudio se analizaron 40 cepas de *C. jejuni* resistentes a uno o más de los antimicrobianos de uso común (eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina y ampicilina), 26 cepas fueron aisladas de niños habitantes de Santa María de Jesús de Guatemala, recolectadas durante 2001-2003, y 14 cepas aisladas de turistas adultos que visitaban Antigua Guatemala durante 1998-2003.

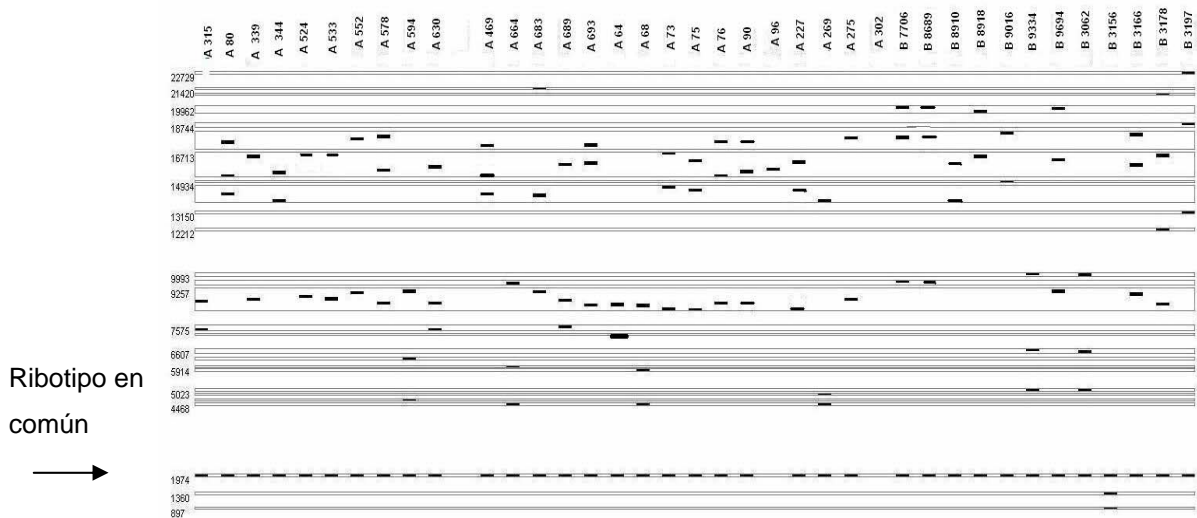
Como resultado se obtuvieron las películas que muestran los patrones ribotípicos de los aislamientos de *C. jejuni* generados por restricción enzimática de ADN genómico con Pst I y Bgl I, mediante Southern blot-hibridación con la sonda 16S ADN ribosomal, marcador Lambda. A los extremos de cada película se colocó como punto de referencia un marcador de ADN molecular con bandas de peso molecular conocido (Gráfica No.1)

**Gráfica No.1** Patrones ribotípicos de los aislamientos de *C. jejuni* **A y B** representan los aislamientos de niños habitantes de Santa María de Jesús; **C.** Representa los aislamientos de turistas adultos que visitaban Antigua Guatemala;



El peso molecular logró determinarse por medio del programa Gene Profiler RFLPscan 3.5.6, utilizando como referencia el marcador molecular de ADN II, los resultados de este análisis muestran que de las 40 muestras de ADN cromosomal de *C. jejuni* digeridas con las enzimas PST I y Bgl I se obtuvieron bandas con pesos moleculares de 897 a 22729 Kb, todas las cepas presentan un ribotipo en común, con un peso molecular de 1,974kb (Gráfica No 2).

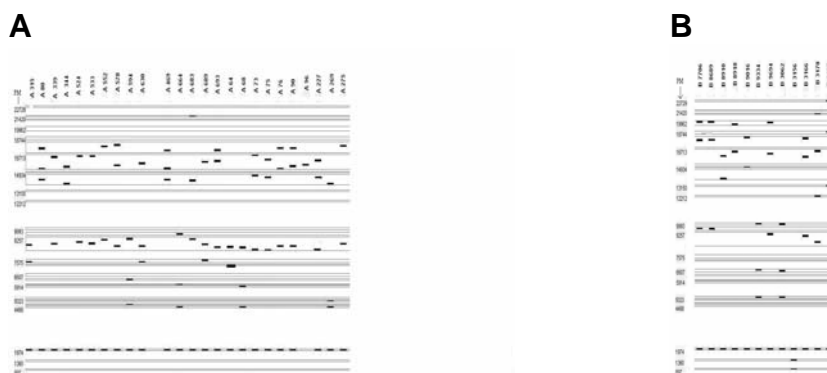
**Gráfica No.2** Ribotipos de cepas de *C. jejuni*, el esquema representa las bandas de hibridación y peso molecular encontradas en las cepas tanto niños como adultos. La letra A representa cepas aisladas de niños y la letra B representa cepas aisladas de adultos.



Se determinaron los pesos moleculares de las bandas de hibridación por separado para cada una de las poblaciones en estudio, encontrando que los pesos moleculares en población de niños fueron de 1974 a 21420 kb, mientras que en población de adultos los pesos moleculares fue de 897 a 22729 kb (Gráfica 3).

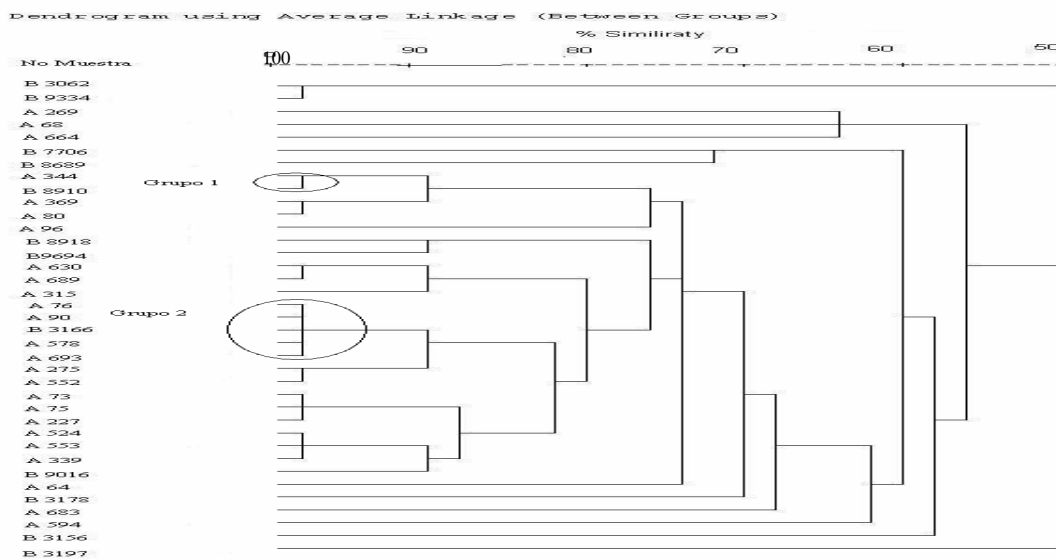
**Gráfica No.3**

Esquema ribotípico de cepas de *C. jejuni*, **A** representa los aislamientos de niños habitantes de Santa María de Jesús; **B**. Representa los aislamientos de turistas adultos que visitaron Guatemala;



A partir del esquema ribotípico obtenido (Gráfica 3) se construyó una matriz de coeficientes de distancias utilizando el método UPGMA (unweighted Pair-Group Method for arithmetic Averages) que fue la base para generar un dendograma para cada perfil esto permitió visualizar las relaciones existentes entre las distintas cepas provenientes de niños y de adultos (Gráfica No 4).

**Gráfica No.4** Dendograma de los ribotipos obtenidos de cepas de *C. jejuni* resistentes a uno o más de los antimicrobianos de uso común, representa las relaciones genéticas existentes entre las diferentes cepas, aisladas de niños habitantes de Santa María de Jesús y de turistas adultos que visitaban Antigua Guatemala. En la parte izquierda del dendograma se indica el numero de cepa que corresponde, y la población de la cual fue aislada. La población se indica con una letra: A, niños; B, adultos;

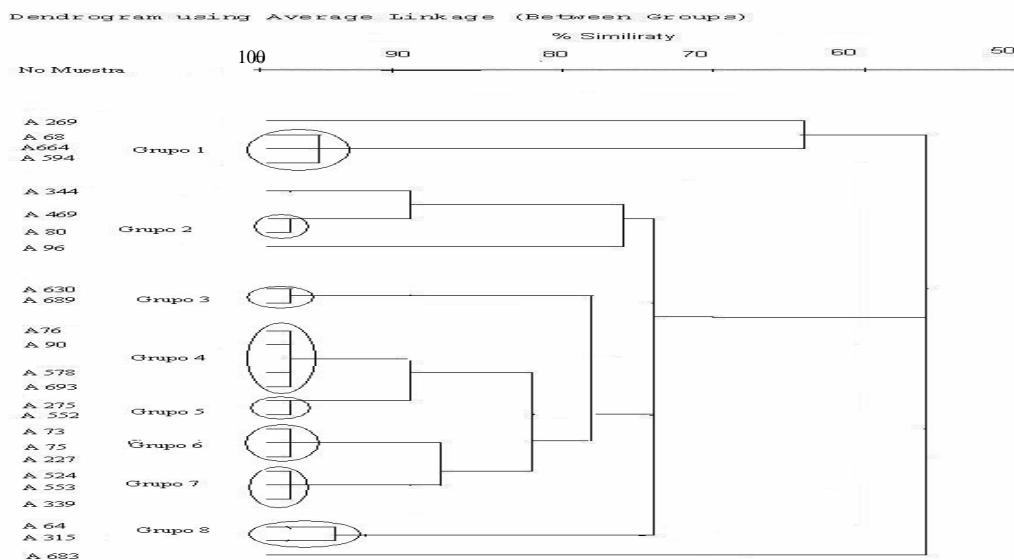


El dendograma generado mostró dos agrupamientos significativos de las cepas de *C. jejuni* analizadas en relación a las poblaciones de niños y adultos. El dendograma se subdividió en dos grupos importantes para observar que únicamente dos cepas procedentes de adultos (B8910 grupo 1 y B3166 grupo 2) presentan mayor de 95% de similitud de patrón ribotípico con respecto a las cepas procedentes de niños. El 40% de las cepas aisladas de adultos, presenta menor de 50% de similitud con respecto a las cepas aisladas de niños; y el 37% de las

cepas presenta menor de 70% de similitud con respecto a las cepas aisladas en niños (Gráfica No 4).

El análisis de cluster para ribotipos obtenidos de cepas aisladas de niños se clasificó en ocho grupos, cada grupo presenta un 90 a 95% de similitud de patrón ribotípico, y solamente muestra cuatro ribotipos que son completamente diferentes a las demás cepas (A 269, A344, A 96, A 683), obteniendo un total de 12 ribotipos diferentes para esta población. El perfil ribotípico predominante en las cepas provenientes de niños se encuentra en el grupo cuatro, alcanzando 16% del total de cepas seleccionadas, apareciendo en cuatro cepas con un patrón ribotípico de cuatro bandas (Gráfica No. 5).

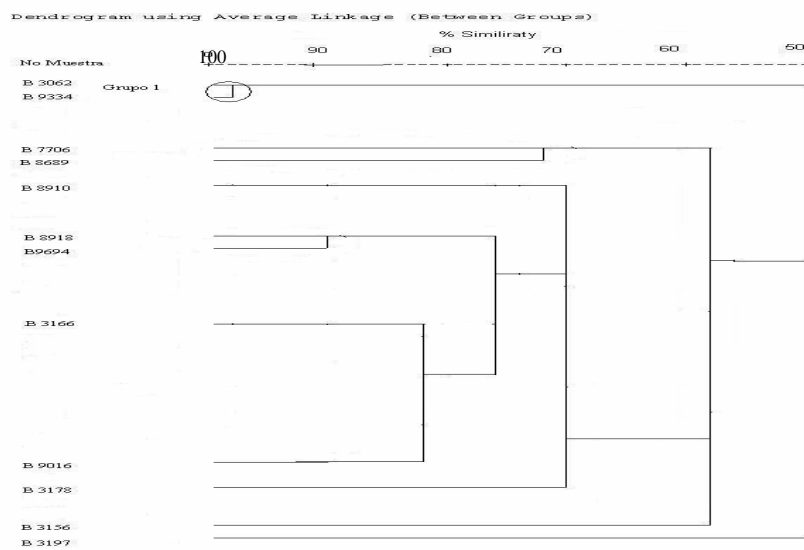
**Gráfica No.5** Cluster de cepas de *C. jejuni* resistentes a uno o más de los antimicrobianos de uso común, muestra las relaciones genéticas existentes entre el total de cepas aisladas de niños habitantes de Santa María de Jesús.



El análisis de cluster para adultos muestra solamente dos cepas, con porcentaje de similitud de patrón ribotípico mayor a 95%, el dendrograma generado no mostró un agrupamiento significativo en relación a porcentajes de

similitud mayores a 90%, se observa que no hay un patrón ribotípico predominante (Gráfica No. 6), se categorizaron 11 ribotipos diferentes en el total de las cepas aisladas de niños.

**Gráfica No.6** Cluster de cepas de *C. jejuni* resistentes a uno o más de los antimicrobianos de uso común, muestra las relaciones genéticas existentes entre el total de cepas aisladas de turistas adultos que visitaban Antigua Guatemala durante 1998 – 2003.



Se comparó la susceptibilidad a antimicrobianos, patrón ribotípico y los cluster obtenidos de cepas de *C. jejuni* aisladas de niños habitantes de Santa María de Jesús y de turistas adultos que visitaban Antigua Guatemala, por medio del cual se determinó que solamente dos cepas aisladas de adultos presentan similitud mayor a 90% con respecto a las cepas aisladas de niños en el patrón ribotípico, patrón de resistencia, y número de fragmentos de ADN (Tabla No 1).

**Tabla No.1** Comparación de susceptibilidad a antimicrobianos de uso común, patrón ribotípico y los cluster obtenidos de cepas de *C. jejuni* aisladas de niños habitantes de Santa María de Jesús y de turistas adultos que visitaban Antigua Guatemala. La letra A representa cepas aisladas de niños, y la letra B cepas aisladas de adultos extranjeros.

No Muestra	MIC Eritromicina			MIC Ciprofloxacina			MIC Tetraciclina			MIC Ampicilina			No. Fragmentos ADN
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	
<b>Grupo 1</b>													
>90% Similitud													
A 344	0.25					64			128	4			3
B 8910	0.5					16			64	2			3
<b>Grupo 2.</b>													
>95% Similitud													
A 76	0					64		64		4			4
A 90	1					16	1	16			64		4
A 578	0					4		32			256		4
A 693	0					64		128			256		4
B 3166	1					64		32			1		4

S: sensible                      I: Intermedio                      R: Resistente

Valores para interpretación de Susceptibilidad Antimicrobianos.			
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. 1,997;17:4-25.

Al comparar la susceptibilidad a antimicrobianos y patrón ribotípico de cepas de *C. jejuni* se observa que el 100% de las cepas provenientes de adultos extranjeros son sensibles a eritromicina, mientras que el 16% de cepas provenientes de niños presentan resistencia a la misma. El 100% de las cepas provenientes de adultos extranjeros es resistente a tetraciclina, mientras que en cepas provenientes de niños solamente lo es el 64%. El 23% de las cepas provenientes de adultos extranjeros es resistente a ampicilina, mientras que las cepas provenientes de niños presentan el 72% de resistencia. Además, el 100% de las cepas tanto de adultos extranjeros, como de niños son resistentes a ciprofloxacina. (Tabla No 2 y No 3).

**Tabla No.2** Comparación de susceptibilidad a antimicrobianos de uso común (eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina o ampicilina) y de patrón ribotípico de cepas de *C. jejuni* aisladas de niños habitantes de Santa María de Jesús recolectadas durante 2001-2003.

No Muestra	MIC Eritromicina			MIC Ciprofloxacina			MIC Tetraciclina			MIC Ampicilina			No. Bandas
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	
	<b>Grupo 1 &gt;90% similitud</b>												
A 68			16			8			64		8		4
A 594			16			128			128			256	4
A 664			8			32			128			256	4
<b>Grupo 2. &gt;95% similitud</b>													
A 469	0					32	0					32	4
A 80	0					16		64		1			4
<b>Grupo 3 &gt;95% similitud</b>													
A 630	0					16			32			128	4
A 689	0					16		8				256	4
<b>Grupo 4. &gt;95% similitud</b>													
A 76	0					64			64	4			4
A 90	1					16			16			64	4
A 578	0					4			32			256	4
A 693	0					64			128			256	4
<b>Grupo 5 &gt;95% similitud</b>													
A 275	0					32	0					64	3
A 552	0					8			128			256	3
<b>Grupo 6 &gt;95% similitud</b>													
A 73	0					8			64	4			4
A 75	0					64			64	4			4
A 227	0					64			64		32		4
<b>Grupo 7 &gt;95% similitud</b>													
A 339	0					32	1					32	3
A 524	1					64	0					32	3
A 553	0					4	0					256	3
<b>Grupo 8 &gt;90% similitud</b>													
A 64			8			8	0			2			3
A 315			16			8	1					32	3
<b>Cepas con patrón ribotípico &lt; 90 %</b>													
A 96	4			0			1				16		2
A 269			10			16			64			64	4
A 344	0.25					64			128	4			3
A 683	0					16			256			256	4

S: sensible I: Intermedio R: Resistente

Valores para interpretación de Susceptibilidad Antimicrobianos.

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



**Tabla No.3** Comparación de susceptibilidad a antimicrobianos de uso común (eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina o ampicilina) y de patrón ribotípico de cepas de *C. jejuni* aisladas de turistas adultos que visitaban Antigua Guatemala durante 1998-2003.

No. Muestra	MIC Eritromicina			MIC Ciprofloxacina			MIC Tetraciclina			MIC Ampicilina			No Bandas
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	
<b>Grupo 1</b>	95% similitud												
B 3062	0.25			1			64			256			4
B 9334	0.125			8			16			64			4
<b>Cepas con patrón ribotípico &lt; 90 %</b>													
B 8689	0.5			1			32			2			4
B 7706	0.5			1			128			0			4
B 8918	0.25			4			16			0.5			6
B 9694	0.5			16			512			2			6
B 9016	0.25			64			64			2			3
B 3166	0.125			32			64			8			4
B 8910	0.5			16			64			2			3
B 3178	1			128			256			64			5
B 3156	0.25			64			128			16			4
B 3197	0.25			128			256			4			4
B 3312	0.25			256			128			1			4

S: sensible I: Intermedio R: Resistente

Valores para interpretación de Susceptibilidad Antimicrobianos.

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. 1,997;17:4-25.

**Tabla No.4 Serotipificación por el método de Penner** de cepas de *C. jejuni* aisladas de niños habitantes de Santa María de Jesús y de turistas adultos que visitaban Antigua Guatemala.

Identificación Guatemala	Identificación CDC	Población	Genero por método PCR	Especie	Serotipo por método Penner
421	D6829	Niños	<i>Campylobacter</i>	<i>C. jejuni</i>	HS:3
221	D6830	Niños	<i>Campylobacter</i>	<i>C. jejuni</i>	HS :15
120	D6841	Niños	<i>Campylobacter</i>	<i>C. jejuni</i>	HS:3
131	D6838	Niños	<i>Campylobacter</i>	<i>C. jejuni</i>	HS:3
132	D6842	Niños	<i>Campylobacter</i>	<i>C. jejuni</i>	HS:3
8097	D6834	Adultos	<i>Campylobacter</i>	<i>C. jejuni</i>	HS:6, 25, 7, 21
8191	D6835	Adultos	<i>Campylobacter</i>	<i>C. jejuni</i>	H6: 6, 25, 7, 21, 29
9078	D6836	Adultos	<i>Campylobacter</i>	<i>C. jejuni</i>	HS: 2
9110	D6832	Adultos	<i>Campylobacter</i>	<i>C. jejuni</i>	HS:2
7706	D6840	Adultos	<i>Campylobacter</i>	<i>C. jejuni</i>	HS:16
8918	D6831	Adultos	<i>Campylobacter</i>	<i>C. jejuni</i>	HS: 1, 8
9694	D6837	adultos	<i>Campylobacter</i>	<i>C. jejuni</i>	HS: 6, 25, 7, 21, 29

Ref: Colaboración de la Dra. Collette Fitzgerald, feb 2007. Laboratorio de Referencia de *C. Jejuni*, CDC, Atlanta Georgia.

## IX. DISCUSION DE RESULTADOS

Las enfermedades diarreicas han sido uno de los principales problemas de salud en Guatemala. Entre los principales agentes etiológicos causantes de estas infecciones se encuentra *C. jejuni*, actualmente se estima que afecta 1% de la población mundial (3). El número anual de casos declarados excede los casos de salmonelosis declarados en muchos países europeos (41).

El manejo y control de esta infección requiere terapia con antimicrobianos de elección tales como: eritromicina, ciprofloxacina, ampicilina y tetraciclina, sin embargo se ha observado un incremento en el desarrollo de resistencia a los mismos agentes antimicrobianos (8). Las cepas analizadas en este estudio presentan resistencia a dos o más de estos antibióticos, definiéndose como bacteria multirresistente.

En bacteriología, los métodos clásicos de tipado (serotipado, biotipado, fagotipado, etc.) frecuentemente han sido utilizados en los estudios taxonómicos y epidemiológicos, pero estos métodos requieren de una extensa variedad de antisueros específicos, son muy laboriosos y solo se realizan en dos laboratorios del mundo además, solo detectan variaciones fenotípicas, por tanto estas técnicas no son útiles para el estudio de la genética de poblaciones. Sin embargo para el conocimiento de la estructura poblacional es necesaria la medida del grado de variabilidad genética que existe entre las distintas cepas de una población bacteriana, el método de ribotipado permite analizar y comparar regiones del genoma que son altamente variables en la población (46).

Revisando la distribución de los ribotipos encontrados destaca la aparición constante de una banda en común en todas las cepas analizadas, con un peso molecular de 1974 Kb, (Gráfica No. 2), esto puede asociarse a que el 100% de las cepas en estudio presentan resistencia a ciprofloxacina (Tabla No.1). Estudios

anteriores muestran que la resistencia a las quinolonas (ciprofloxacina) resulta de la mutación cromosomal en el gen *gyr A* que codifica para la subunidad A de la enzima ADN girasa, enzima requerida para la replicación bacteriana (42).

A partir del esquema ribotípico obtenido (Gráfica 3) se construyó una matriz de coeficientes de distancias utilizando el método UPGMA (unweighted Pair-Group Method for arithmetic Averages) que fue la base para generar un dendograma para cada perfil. Esto permitió visualizar las relaciones existentes entre las distintas cepas provenientes de niños y de adultos. El dendograma subdividió los aislados en 2 grupos importantes que permitió determinar que únicamente dos cepas de *C. jejuni* circulantes entre los viajeros a Guatemala, presentan 95% de similitud tanto en patrón ribotípico, como en patrón de resistencia, y número de bandas con respecto a las de niños de Guatemala, por lo que podríamos asumir que de los visitantes a Antigua Guatemala estudiados, sólo se infectaron con cepas locales en el 14% de los casos (Gráfica No 4) .

Los resultados de la tipificación molecular, obtenidos de cepas aisladas de niños muestran 12 ribotipos diferentes en total, de los cuales 8 se clasifican en grupos que presentan mayor o igual a 90% de similitud de patrón ribotípico, mientras que 4 son significativamente distintos, la distribución de los ribotipos muestra que el 16% de cepas provenientes de niños, destaca la aparición de un patrón ribotípico predominante de 4 bandas con pesos moleculares (18744, 16713, 9257, 1974 Kb) (Gráfica No 5). En 1994 se categorizaron 8 ribotipos en 57 cepas de *C. jejuni* aisladas de niños de la misma población, además el patrón ribotípico predominante presentaba 5 bandas, el presente estudio demuestra que en 10 años hubo un incremento en la variabilidad genética observando 4 nuevos ribotipos, así como diferencia en cuanto al patrón ribotípico predominante de cepas de *C. jejuni* en la población de Santa María de Jesús.

El análisis de cluster para turistas extranjeros muestra que el 83% presentan una alta diversidad y solamente 2 cepas presentan un 90% de similitud, no mostró un agrupamiento significativo en relación a porcentajes de similitud mayores a 90%, se observa que no hay un patrón ribotípico predominante (Gráfica No. 6), esto refleja diferencias en la virulencia.

Para profundizar en los análisis se contó con el apoyo del laboratorio de referencia de *C.jejuni*, CDC, Atlanta quien realizó la serotificación de las cepas, los resultados obtenidos del análisis se realizó con el programa de Penner, el cual reporta serotipos muy diferentes entre cepas de adultos y niños, y se observa que los serotipos de cepas de niños son semejantes entre si (Tabla No 1). A pesar que en muchos países desarrollados, la campilobacteriosis se ha asociado a brotes transmitidos por el agua y los viajes al extranjero, este estudio demuestra que las cepas provenientes de turistas extranjeros presentan diferentes perfiles de resistencia, ribotipos y de serotipos a las cepas provenientes de niños guatemaltecos. La gran variabilidad de ribotipos puede ser debido a múltiples factores, tanto de la prescripción desmedida de este tipo de antimicrobianos, la disponibilidad libre de receta médica, su uso habitual en uso de antibióticos en la cría de animales o su fuente de origen (41).

Se observa que las cepas circulantes entre los niños guatemaltecos manifiestan patrones de resistencia variada especialmente a tetraciclina con 64%, ampicilina con 72% de resistencia y eritromicina con 16% de resistencia (Tabla No.3), a diferencia de las cepas provenientes de turistas ya que presentaban un 100% de resistencia a tetraciclina, 23% de resistencia a ampicilina y 100% de sensibilidad a eritromicina (Tabla No.4). Esto se ve reflejado al comparar los datos de los patrones ribotípicos ya que el 40% de las cepas aisladas de adultos, presenta menor al 50% de similitud con respecto a las cepas aisladas de niños; y el 37% de las cepas de adultos presenta menor a 70% de similitud con respecto a las cepas aisladas en niños (Gráfica No 4).

La variabilidad de la resistencia antimicrobiana entre ambas poblaciones, pudo ser 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 en Guatemala (8).

Las técnicas moleculares han causado un gran impacto para el diagnóstico de microorganismos de difícil crecimiento y detección, es por eso que el estudio de la biología molecular del género *C. jejuni*, no solo ofrece la oportunidad de comprender más sobre los patrones genómicos de la bacteria, sino también provee la perspectiva de contribuir hacia el desarrollo de estrategias moleculares que pudieran mejorar el diagnóstico, la vacunación, y los mecanismos de patogenicidad de *C. jejuni*, ya que a la fecha aún se desconocen.

## X. CONCLUSIONES

1. Existen diferencias entre los ribotipos de las cepas de *C. jejuni* aisladas de niños de Santa María de Jesús de Guatemala y las cepas aisladas de turistas provenientes de EE.UU.
2. Las cepas circulantes entre los niños guatemaltecos manifiestan patrones de resistencia variada especialmente a tetraciclina y a eritromicina, a diferencia de las cepas provenientes de turistas.
3. Únicamente el 14 % de cepas de *C. jejuni* circulantes entre los adultos extranjeros, presentan similitud mayor a 90% tanto en patrón ribotípico como en patrón de resistencia, con respecto a las cepas aisladas en niños de Guatemala.
4. Se establecieron diferentes ribotipos categorizados por peso molecular, número de bandas y resistencia a antimicrobianos, encontrándose ocho grupos en niños y uno en adultos.
5. El perfil ribotípico predominante en las cepas provenientes de niños se encuentra en el grupo seis, con un patrón ribotípico de cuatro bandas.
6. Las cepas provenientes de adultos extranjeros no presentan patrón ribotípico predominante.
7. Existe una alta diversidad de cepas de *C. jejuni* aisladas de turistas provenientes de EE.UU.
8. En 10 años hubo un incremento en la variabilidad genética, así como diferencia en cuanto al patrón ribotípico predominante de cepas de *C. jejuni* en la población de Santa María de Jesús, Guatemala.

## XI. RECOMENDACIONES

1. Para realizar la extracción de material genético se utilizó el QIAamp DNA extraction kit, con el cual se obtuvo un mayor rendimiento y mejor calidad del ADN. Se recomienda el uso de este reactivo comercial, que aunque de alto costo, facilita y estandariza el trabajo de extracción de ADN de una bacteria difícil de lisar como es el *Campylobacter jejuni*.
2. Dar seguimiento al presente estudio a través de estudios más extensos, que cubran un número mayor de especímenes, y posiblemente de muestras asociadas epidemiológicamente con síndrome de Guillain Barré.
3. Investigar las muestras 96, 269, 344, 683 aisladas de niños y las muestras 3156, 3178, 3197, 3166, 3312 aisladas de adultos, ya que presentan patrones ribotípicos con menos del 50% de similitud entre las cepas analizadas.



## XII. REFERENCIAS

1. Fernández H. Martí. Invasive and enterotoxic properties in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from humans and animals. Brasil: Biol. Res, 1995; 205-210
2. Murray, PR. Manual of Clinical Microbiology. 6 ed. Washington D.C: American Society for Microbiology, 1995. p. 483-489,541,1290
3. Gómez J. Rodríguez R. González M.I. Gastroenteritis por *Salmonella*, *Shigella* y *Campylobacter*. [www.exopol.com/general/circulantes](http://www.exopol.com/general/circulantes). Última modificación 3/2004
4. Mims Playfair, et al. Microbiología médica; 2ed. España: Mosby, 1999. 258-260
5. Torres OR, et al. Infecciones recurrentes por *Campylobacter Jejuni* en niños de Santa María de Jesús: Tipificación por Ribotipia. INCAP. Nota técnica
6. Rees JH, Soudain SE, Gregson NA. *Campylobacter jejuni* in infection and Guillain Barré syndrome. N Engl J Med 1995: 333(5):1374-80
7. Torres MF. Coprocultivo para *Campylobacter jejuni*.71-74Pp. (En: Manual Práctico de Bacteriología Médica. 1ª Edición. Guatemala 1996).
8. González Pérez, WP. Determinación de resistencia antimicrobiana en cepas guatemaltecas de *Campylobacter jejuni*. Tesis. USAC Facultad de C.C.Q.Q. y Farmacia. 2000
9. 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. 1994.
10. Fernández, H. Farace M.I Diagnostico de *Campylobacter* en muestras clínicas y de alimentos. Chile. 2003: 22: 3-15
11. Marsh WW. Infectious diseases of gastrointestinal tract in adolescents. Adolesc Med 2000;11:263-78
12. 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

13. G. Black, Jacquelyn. Microbiology; Principles and explorations. 4ed. New York; Ed John Wiley:646: 239-240
14. Rodríguez Torres, et al. Microbiología y Parasitología Medica; 2ed. España: Masson, 1998. p321-36
15. Tsang, R.S. The relation of *Campylobacter jejuni* infection and the development of Guillain –Barre Syndrome. Curr Opin Infect Dis 2002.15: 221-228
16. Parsonnet. *Campylobacter jejuni* asociado a enfermedad intestinal inmunoproliferativa. N Engla J Med 2004; 350;239-248.
17. Hernández Chavarria, F. Cultivo de Bacterias microaerofilicas: *Campylobacter*. Rev Col. de MQC Costa Rica. 2002 vol.8No5: 116-121
18. Guerrant, R. and D.A. Bobak. Bacterial and Protozoal Gastroenteritis. N Engl J Med 1991;325:327-340
19. Compendium of Methods For The microbiological Examination Of Foods. Fourth ed. American Public Health Association APHA. 301-307
20. Schweer, B. Antibodies against gangliosides: Infection and immunopathogenesis of Guillain-Barre Syndrome. Microbes Infect 2002. 4: 373-384
21. Koneman E.W. et al. Diagnóstico Microbiológico. Quinta ed. Buenos Aires: Panamericana. 318-332
22. Aspinall GO, Fugimoto SO, Mc Donald AG. Lipopolysacharides from *Campylobacter jejuni* associate Guillain Barré syndrome patients mimic human gangliosides in structure. Infect Inmun 1994; 62(6):2122-9
23. Worl Health Organization. Control of Diarrheal Diseases Program. Readings of Diarrhea. 1992
24. Clifford G. Et al. Characterization of Waterborne Outbreak-associated *Camylobacter jejuni*, Wilkerton, Ontario. CDC 2003 Vol. 9.No10.
25. Popovic TB, et al. Rybotiping in Molecular Epidemiology. P. 1-22 ( In Persing D. Diagnostic Molecular Microbiology. American Society for Microbiology. Washington, D.C. 1993. II +22p).
26. Trudy M. W, Newell D. Genotyping of *Campylobacter spp.* Applied Enviroiment Microbiology, 2000;vol 66. No1; 1-9.

27. Cruz, JR, et al. Etiología de diarrea aguda en infantes de áreas marginales de Guatemala. Memorias del III Congreso Nacional de Microbiología. Guatemala, 1986.
28. CHRO. 11<sup>th</sup> International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms. Int J Med Micr 2001. 291, suppl 31, 1-168.
29. Rautelin H, Renkonen O, Kosunen T. Emergence of Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in subjects from Finland. Antimicrob Ag Chemother. 1991; 35: 2065-2069.
30. Hiatt K, et al. Genotype Analyses of *Campylobacter* Isolated from the Gastrointestinal Tracts and Reproductive Tracts of Broiler Breeder Roosters. Avian Diseases: vol4, No2 pp406-14
31. Mateos González. Tecnología del DNA Recombinante in vitro. [www.icampus.ucl.ac.be/SBIM2520/document/genemol/biomolespa/enzimas\\_-de-restricc.html](http://www.icampus.ucl.ac.be/SBIM2520/document/genemol/biomolespa/enzimas_-de-restricc.html)
32. Ray Wv, Grossman M. Methods in Enzimology. London: Academic Press Inc., Vol 100 1983
33. Rawn. Bioquímica. España: McGraw Hill-Interamericana, vol.2, 1989. XXXIII + 1107p.
34. Freifelder D. Molecular Biology. 2 ed. California, E.E.U.U.: Jones and Bartlett Publishers, Inc. 1987. 834p (p. 126 –129)
35. Owen Rj. Chromosomal DNA fingerprinting a new method of species and identification applicable to microbial pathogens. J Med Microbiol. 1989; 30: 89-99.
36. Andrews AT. Electroforesis; theory, techniques and biochemical and clinical applications. 2ed. Inglaterra: oxford Clarendon Press, 1986. XIII + 440
37. Stull TI, LiPuma JJ, and Edling TD. A broad spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. J Infect Dis 1988; 157:280 -286
38. Grimont F, Grimont PA. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. Ann Inst Pasteur/ Microbiol. 1986; 137B, 165-175
39. QIAamp Tissue DNA extraction kit, Manual de Procedimientos.
40. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a Laboratory Manual. 2ed. Part E5-7. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, 1989

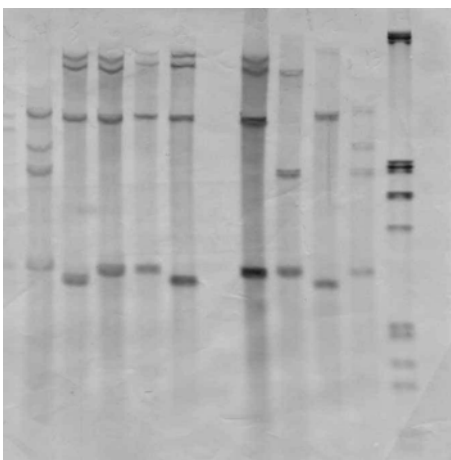
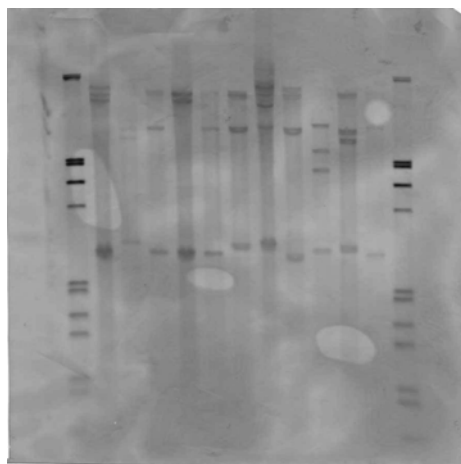
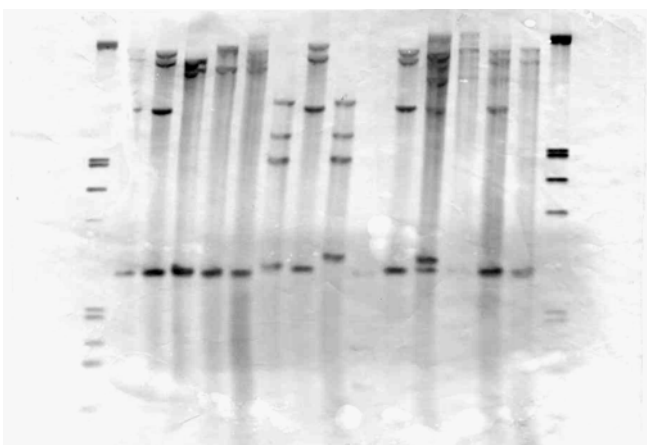
41. Gootz T, Martin B. Characterization of high level quinolone resistance in *C. jejuni*. *Antimicrob Ag Chemother.* 1991; 35:840-845
42. Aguado J., Ramos J., & Lumbreras C. *Campylobacter jejuni* infection a Guillain-Barré Syndrome. *New Eng. J. Med.* 12:334, 1996.
43. Altekrose S., Fields P., & Swerdlow D: *Campylobacter jejuni* - An Emerging Foodborne Pathogen. *Emerging Infectious Diseases* 5:1, 1999.
44. Allos B., Lippy F., Carisen A. et al: *Campylobacter jejuni* strains form patients with Guillain - Barré Syndrome. *Emerging Infectious Disease.* 4:263, 1998.
45. Brigid L., Crowley D., Moloney R et al: Integrolike Structures in *Campylobacter spp.* of Human and Animal Origin. *Emerging Infectious Disease.* 6:1, 2000.
46. Farfán Sellarés Maribel; Estudio de la estructura genética de poblaciones; Barcelona, España; 2002.

### **XIII. Anexos**

**ANEXO 1.****Gráfica No.1 Patrones ribotípicos presentes en aislamientos de cepas de *C. jejuni* resistentes a uno o más de los antimicrobianos de uso común (eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina o ampicilina).**

Películas que muestran los patrones ribotípicos de los aislamientos de *C. jejuni* generados por restricción enzimática de ADN genómico con Pst I y Bgl I, mediante Southern blot- hibridación con la sonda 16S ADN ribosomal. Marcador Lambda.

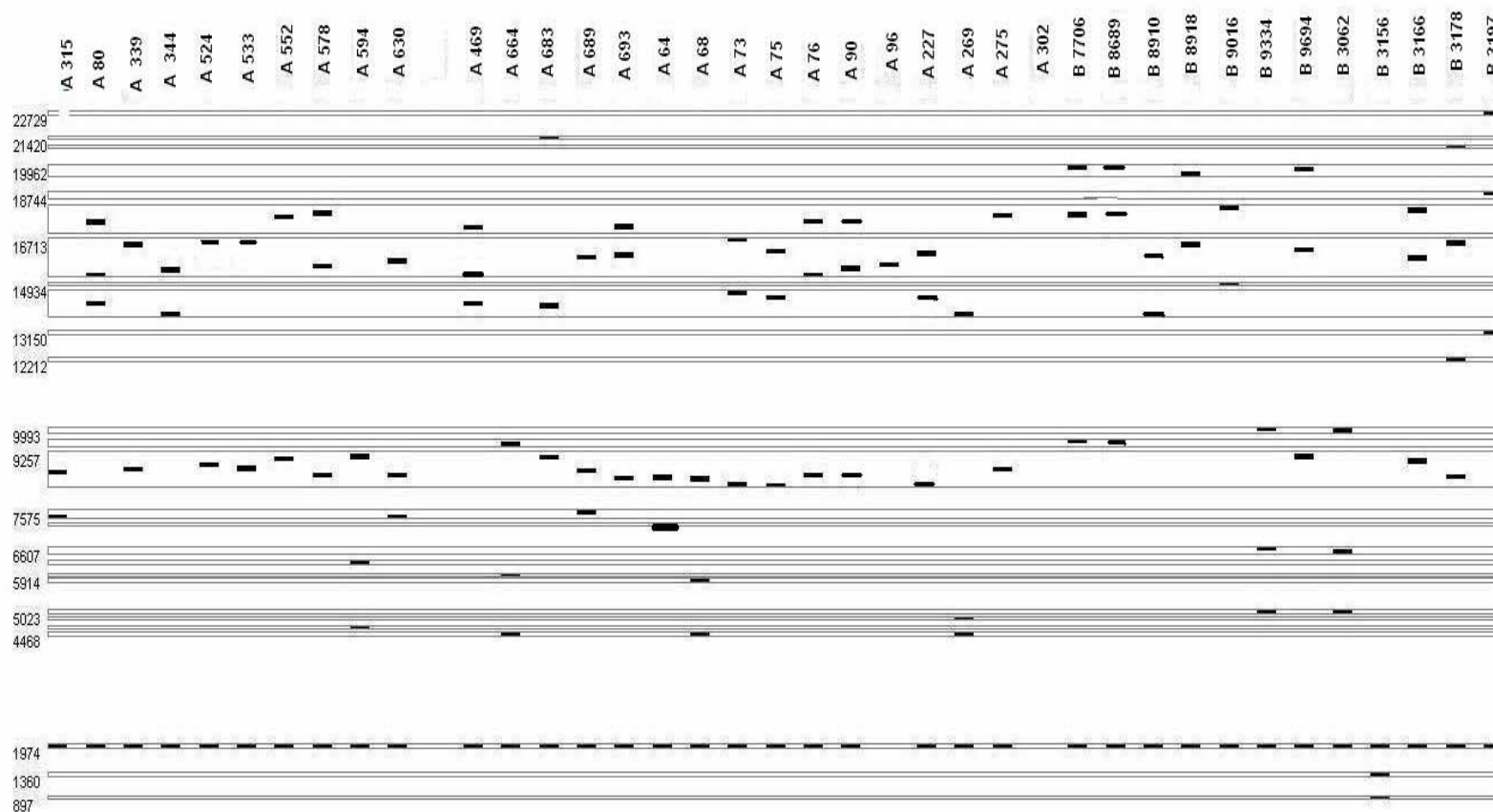
**A y B** representan los aislamientos de niños habitantes de Santa María de Jesús recolectadas durante 2001-2003; **C.** representa los aislamientos de turistas adultos que visitaban Antigua Guatemala durante 1998-2003;

**A****B****C.**

## ANEXO 2.

**Gráfica No.2** Ribotipos de cepas de *C. jejuni* resistentes a uno o más de los antimicrobianos de uso común (eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina o ampicilina), el esquema representa las bandas de hibridación y peso molecular encontradas en las cepas tanto niños como adultos. El peso molecular logro determinarse por medio del programa Gene Profiler RFLPscan 3.5.6

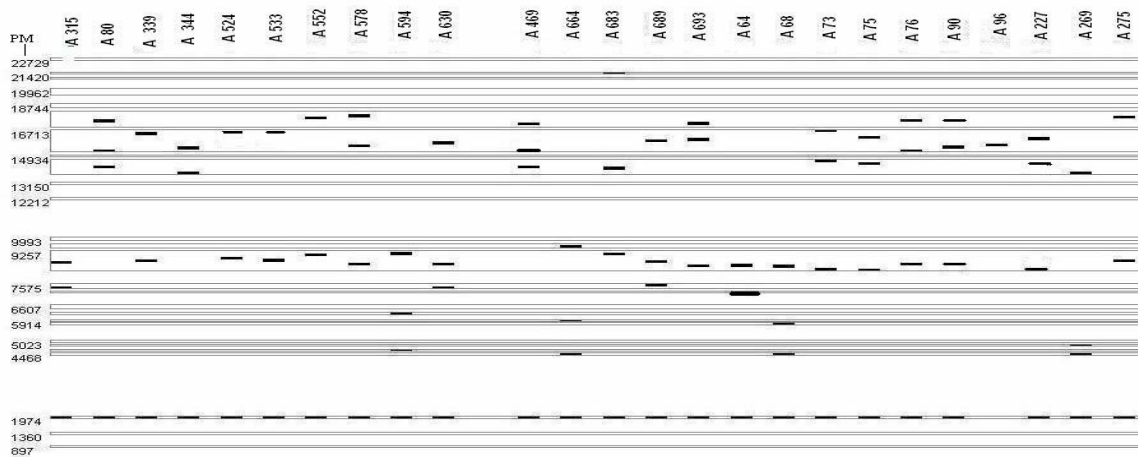
La letra A representa cepas aisladas de niños y la letra B representa cepas aisladas de adultos.



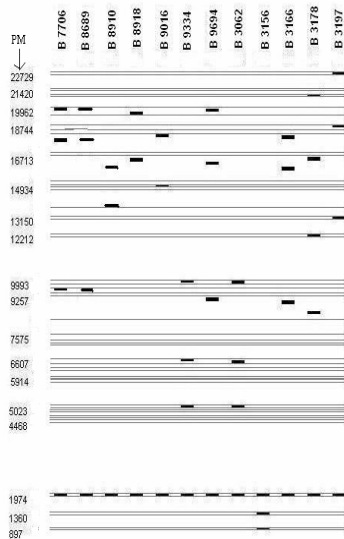
### ANEXO 3.

**Gráfica No.3** Esquema ribotípico en cepas de *C. jejuni* resistentes a uno o más de los antimicrobianos de uso común (eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina o ampicilina) **A** representa los aislamientos de niños habitantes de Santa María de Jesús; **B.** representa los aislamientos de turistas adultos que visitaron Guatemala;

**A**



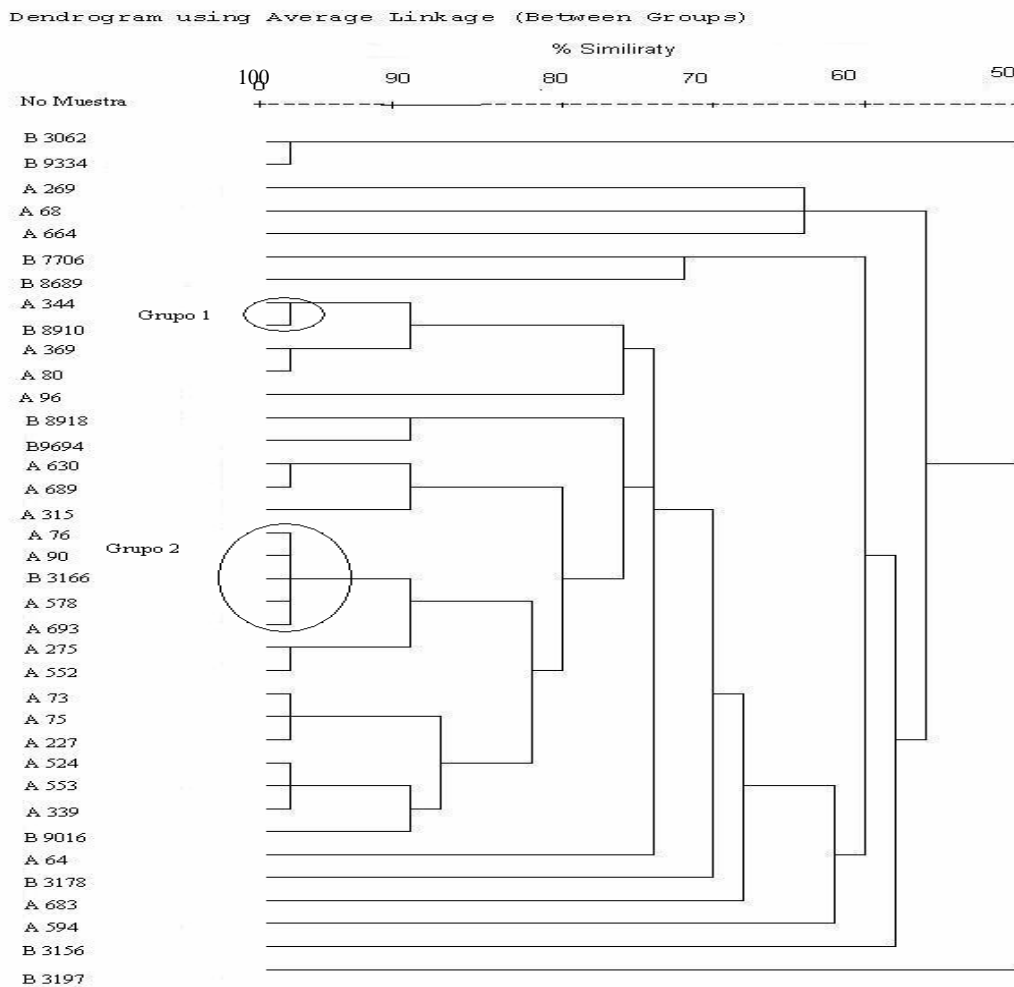
**B.** Esquema ribotípico de cepas de *C. jejuni* aisladas de turistas adultos que visitaban Antigua Guatemala durante 1998-2003;





#### ANEXO 4.

**Gráfica No.4** Dendograma de los ribotipos obtenidos de cepas de *C. jejuni* resistentes a uno o más de los antimicrobianos de uso común (eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina o ampicilina,) aisladas de niños habitantes de Santa María de Jesús recolectadas durante 2001-2003, y cepas aisladas de turistas adultos que visitaban Antigua Guatemala durante 1998-2003.

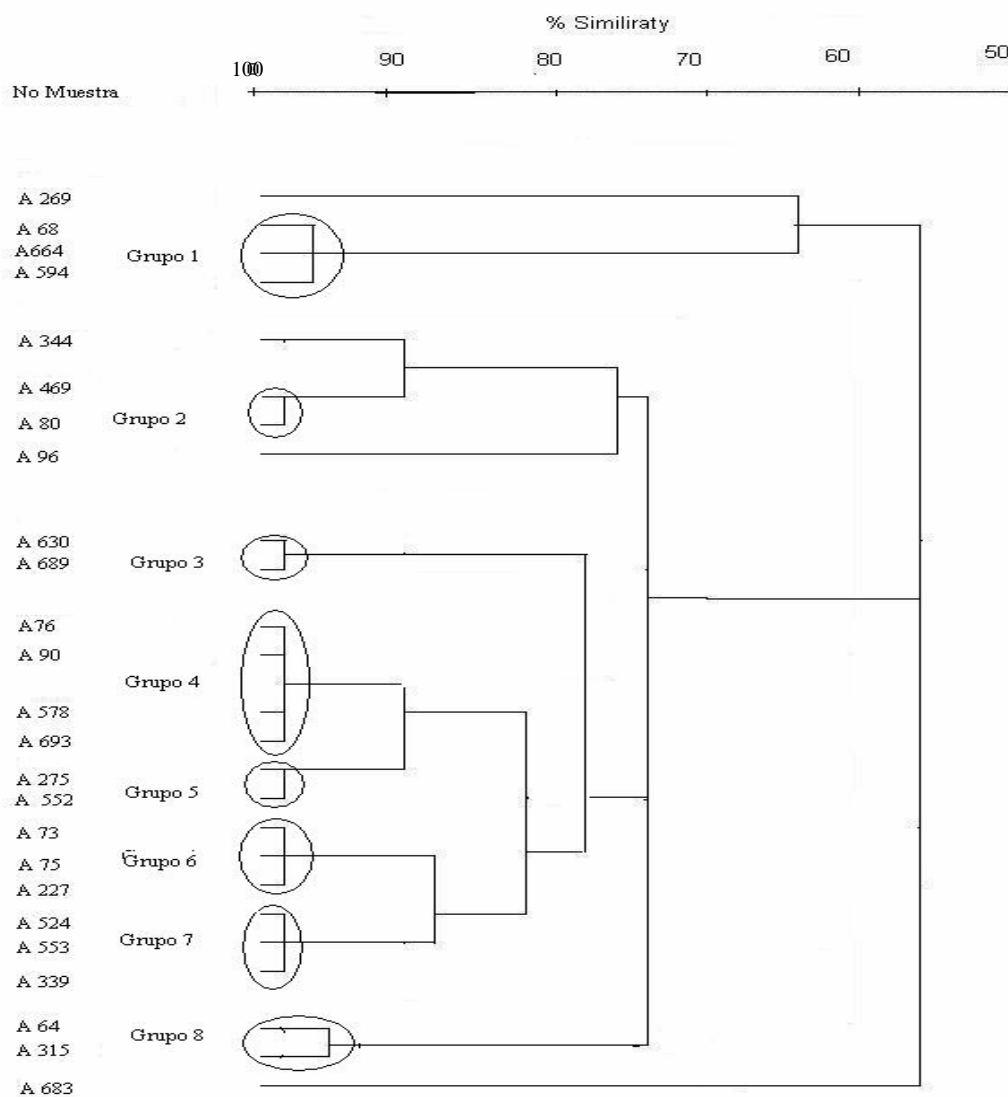


Se observa que únicamente dos cepas provenientes de adultos presentan similitud mayor a 95 por ciento con respecto a las cepas provenientes de niños, (grupo 1 y 2).

## ANEXO 5.

**Gráfica No.5** Cluster de cepas de *C. jejuni* resistentes a uno o más de los antimicrobianos de uso común (eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina o ampicilina,) aisladas de niños habitantes de Santa María de Jesús recolectadas durante 2001-2003.

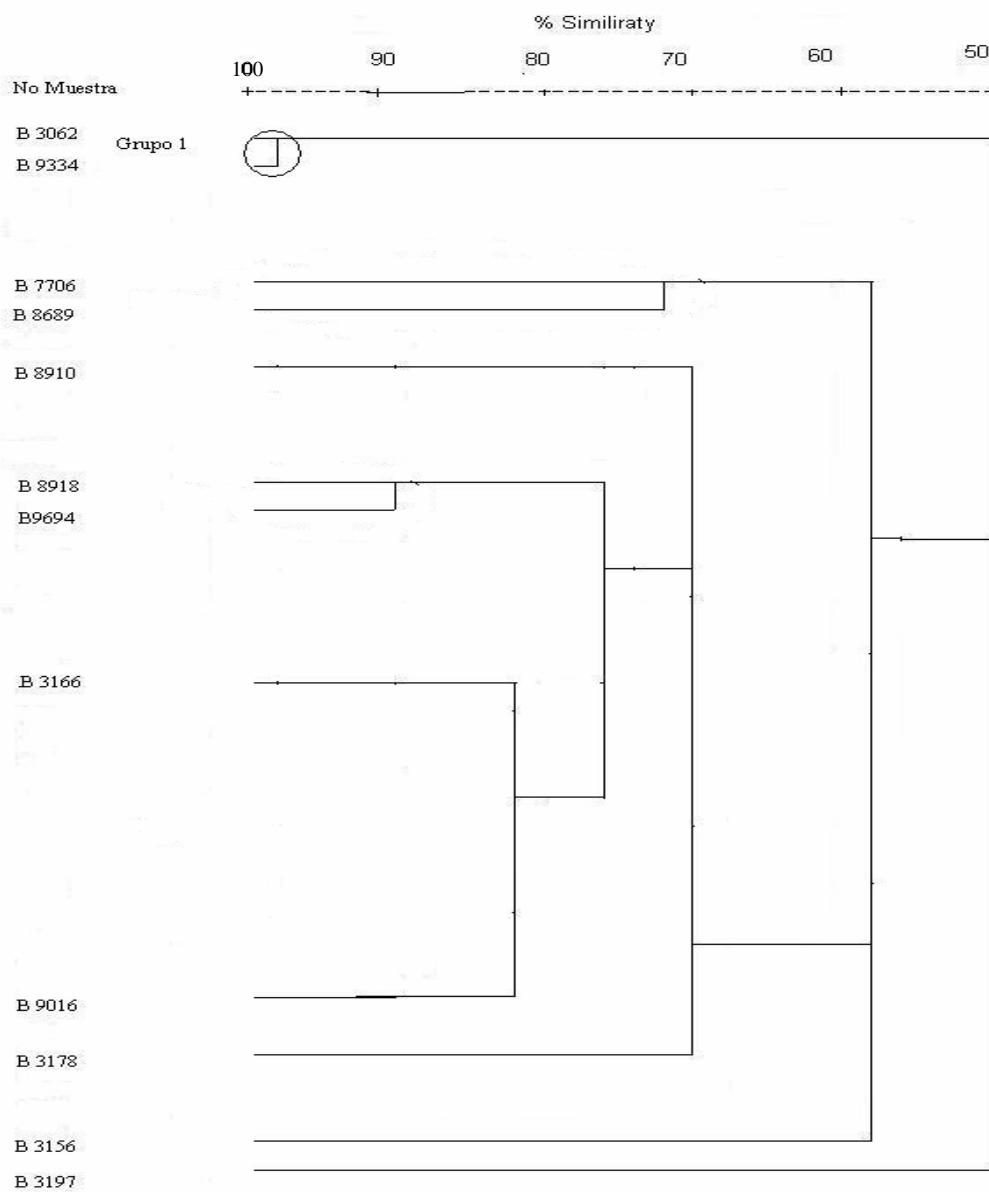
Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)



## ANEXO 6.

**Gráfica No.6** Cluster de cepas de *C. jejuni* resistentes a uno o más de los antimicrobianos de uso común (eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina ó ampicilina,) aisladas de turistas adultos que visitaban Antigua Guatemala durante 1998 – 2003.

Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)



**ANEXO 7.**

**Tabla No.1** Comparación de susceptibilidad a antimicrobianos de uso común (eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina o ampicilina) y de patrón ribotípico de cepas de *C. jejuni* aisladas de niños habitantes de Santa María de Jesús y de turistas adultos que visitaban Antigua Guatemala.

No Muestra	MIC Eritromicina			MIC Ciprofloxacina			MIC Tetraciclina			MIC Ampicilina			No. Bandas
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	
<b>Grupo 1</b>													
>90% Similitud													
A 344	0.25			64			128			4			3
B 8910	0.5			16			64			2			3
<b>Grupo 2.</b>													
>95% similitud													
A 76	0			64			64			4			4
A 90	1			16			16			64			4
A 578	0			4			32			256			4
A 693	0			64			128			256			4
B 3166	1			64			32			1			4

1.Fuente González Pérez, WP. Determinación de resistencia antimicrobiana en cepas guatemaltecas de *Campylobacter jejuni*. Tesis. USAC Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 2000

S: sensible

I: Intermedio

R: Resistente

La letra A representa cepas aisladas de niños, y la letra B cepas aisladas de adultos extranjeros.

## ANEXO 8

**Tabla No.2** Comparación de susceptibilidad a antimicrobianos de uso común (eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina o ampicilina) y de patrón ribotípico de cepas de *C. jejuni* aisladas de niños habitantes de Santa María de Jesús recolectadas durante 2001-2003.

No Muestra	MIC Eritromicina			MIC Ciprofloxacina			MIC Tetraciclina			MIC Ampicilina			No. Bandas
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	
<b>Grupo 1</b>													
>90%similitud													
A 68			16			8			64	8			4
A 594			16			128			128			256	4
A 664			8			32			128			256	4
<b>Grupo 2.</b>													
>95%similitud													
A 469	0					32	0					32	4
A 80	0					16			64			1	4
<b>Grupo 3</b>													
>95%similitud													
A 630	0					16			32			128	4
A 689	0					16		8				256	4
<b>Grupo 4.</b>													
>95%similitud													
A 76	0					64			64		4		4
A 90	1					16			16			64	4
A 578	0					4			32			256	4
A 693	0					64			128			256	4
<b>Grupo 5</b>													
>95% similitud													
A 275	0					32	0					64	3
A 552	0					8			128			256	3

1.Fuente González Pérez, WP. Determinación de resistencia antimicrobiana en cepas guatemaltecas de *Campylobacter jejuni*. Tesis. USAC Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 2000

S: sensible

I: Intermedio

R: Resistente

**ANEXO 8****Continuación Tabla No.2**

Comparación de susceptibilidad a antimicrobianos de uso común (eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina o ampicilina) y de patrón ribotípico de cepas de *C. jejuni* aisladas de niños habitantes de Santa María de Jesús recolectadas durante 2001-2003.

No Muestra	MIC Eritromicina			MIC Ciprofloxacina			MIC Tetraciclina			MIC Ampicilina			No Bandas
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	
<b>Grupo 6</b>													
>95% similitud													
A 73	0					8			64	4			4
A 75	0					64			64	4			4
A 227	0					64			64		32		4
<b>Grupo 7</b>													
>95% similitud													
A 339	0					32	1				32		3
A 524	1					64	0				32		3
A 553	0					16	0				16		3
<b>Grupo 8</b>													
>90% similitud													
A 64			8			8	0			2			3
A 315			16			8	1				32		3
<b>Cepas con patrón ribotípico &lt; 90 %</b>													
A 96	4			0			1				16		2
A 269			10			16			64		64		4
A 344	0.25					64			128	4			3
A 683	0					16			256		256		4

1. Fuente González Pérez, WP. Determinación de resistencia antimicrobiana en cepas guatemaltecas de *Campylobacter jejuni*. Tesis. USAC Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 2000

S: sensible

I: Intermedio

R: Resistente

## ANEXO 9

**Tabla No.3** Comparación de susceptibilidad a antimicrobianos de uso común (eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina o ampicilina) y de patrón ribotípico de cepas de *C. jejuni* aisladas de turistas adultos que visitaban Antigua Guatemala durante 1998-2003.

No. Muestra	MIC Eritromicina			MIC Ciprofloxacina			MIC Tetraciclina			MIC Ampicilina			No Bandas
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	
<b>Grupo 1</b>													
95% similitud													
B 3062	0.25					8			64		1		4
B 9334	0.125					8			64		64		4
<b>Cepas con patrón ribotípico &lt; 90 %</b>													
B 8689	0.5			0					32	2			4
B 7706	0.5			0					128	0			4
B 8918	0.25					4			16	0.5			6
B 9694	0.5					16			512	2			6
B 9016	0.25					64			64	2			3
B 3166	1					1			1		1		4
B 8910	0.5					16			64	2			3
B 3178	1					1			1		1		5
B 3156		1				1			1		1		4
B 3197	1					1			1	1			4
B 3312	1					1			1		1		4

1.Fuente González Pérez, WP. Determinación de resistencia antimicrobiana en cepas guatemaltecas de *Campylobacter jejuni*. Tesis. USAC Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 2000

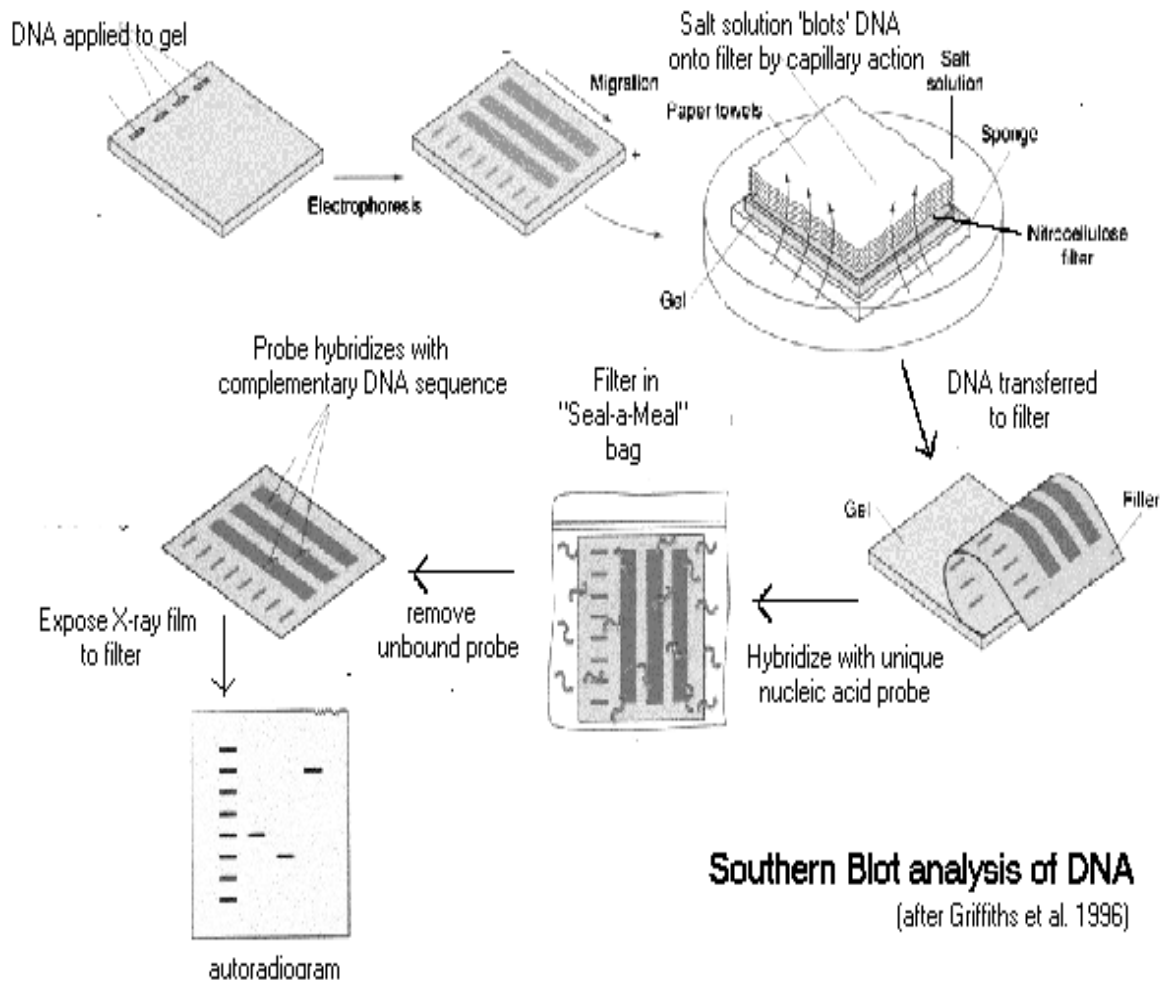
S: sensible

I: Intermedio

R: Resistente

## ANEXO 10

## Gráfica No.8 ANALISIS DE ADN POR BLOTS DE SOTHERN





## ANEXO 11

**Tabla No.3 Valores para interpretación de Susceptibilidad Antimicrobianos  
Método de Concentración Inhibitoria Mínima**

<b>Agente Antimicrobiano</b>	<b>Susceptible (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Intermedio (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Resistente (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
Ampicilina	$\leq 8$	16	$\geq 32$
Ciprofloxacina,	$\leq 1$	2	$\geq 4$
Eritromicina	$\leq 0.5$	1-4	$\geq 8$
Tetraciclina	$\leq 4$	8	$\geq 16$

**Referencia:** NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically- fourth edition; approved standard. 1,997;17:4-25.

## ANEXO 12

**Tabla No. 4 Pruebas de Identificación de especies del Género  
*Campylobacter* sp.**

<b>Prueba</b>	<i>C fetus</i> Ssp. <i>fetus</i>	<i>C.</i> <i>helveticus</i>	<i>C. jejuni</i> Ssp. <i>jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> Ssp. <i>doylei</i>	<i>C. coli</i>	<i>C lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>C.</i> <i>concisus</i>	<i>C. mucosalis</i>
Catalasa	+	-	+	V	+	+	-(d)	-	-
Reducción NO <sub>3</sub>	+	+	+	-	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de:					-				
Indoxilacetato	-	+	+	+	+	-	+	ND	-
Hipurato	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Crecimiento a:									
25°C	+	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42°C	-	+	+	D	+	+	+	+	+
MacConkey	+	ND	+	ND	+	+	-	+	+
NaCl 1.5%	V	ND	-	-	-	+	-	+	-
Glicina 1%	+	ND	+	+	+	+	V	+	+
Sensible a:									
Acido	R	S	S	S	S	R	S	R	R
Nalidixico									
cefalotina	S	S	R	S	R	R	S	R	S

Sensibilidad a antibióticos determinada con discos de 30ug; - 90% o más de las cepas negativas; + 90% o más de las cepas positivas; V 11%-89% de las cepas positivas; D, reacción débil; ND, no se dispone de resultados; R, resistentes; S, sensibles;

Referencia: Konemam E.W, et. Al. Diagnóstico Microbiológico. 5ta edición. Editorial Panamericana, Buenos Aires

