

## CAMPYLOBACTER JEJUNI Y CAMPYLOBACTER COLI

---

### RESUMEN

*Campylobacter jejuni y C. coli son las especies de Campylobacter aisladas con mayor frecuencia en enfermos humanos infectados y se pueden transmitir directamente de los animales a los humanos por contacto o por consumo y manipulación de alimentos de origen animal.*

*Tanto C. jejuni como C. coli colonizan normalmente el tracto intestinal de la mayoría de los mamíferos y de las aves (especialmente pollos, patos y pavos). Generalmente, esta colonización es persistente, a veces con emisiones externas del agente patógeno intermitentes, y normalmente sin síntomas clínicos. La contaminación fecal de la carne (especialmente de la carne de aves) durante su procesado se considera la mayor fuente de toxinfeción alimentaria humana. La colonización de Campylobacter en animales de compañía jóvenes y en animales de producción de alimento (gatitos, cachorros, lechones, cordero y terneros), en algunos mamíferos pequeños utilizados para estudios experimentales (hurones y ratas) y en varias especies aviares puede asociarse con una enfermedad intestinal, pero no está claro si Campylobacter es el agente causante. En los humanos se pueden producir infecciones extraintestinales, incluyendo bacteremia, y algunas secuelas de la infección, tales como polineuropatías, pueden ser graves, aunque se presentan con poca frecuencia. Se desconoce la prevalencia de tales complicaciones en animales. Tanto C. jejuni y C. coli, como C. fetus, se pueden aislar de fetos abortados bovinos y ovinos, presumiblemente como consecuencia de translocación a través de la mucosa intestinal o por infecciones ascendentes.*

**Aislamiento del agente:** *En mamíferos y aves, la detección de la colonización intestinal se basa en el aislamiento del organismo en las heces, frotis rectales y/o contenidos del ciego. En el caso de fetos abortados, Campylobacter se puede aislar del estómago del feto, de la placenta y de los órganos internos. La contaminación de los productos alimenticios de origen animal se detecta por aislamiento de Campylobacter directamente o después de enriquecimiento selectivo. Se han descrito métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa para la detección de Campylobacter en muestras fecales/intestinales y en muestras de carne enriquecida.*

**Identificación del agente:** *Campylobacter jejuni y Campylobacter coli son bacterias termófilas, Gram negativas, muy móviles, que necesitan condiciones microaeróbicas a 37-42°C para su crecimiento óptimo. Se necesitan medios de agar que contengan antibióticos selectivos para aislar estas bacterias de muestras fecales/intestinales y de muestras de carne enriquecidas. Alternativamente, se puede aprovechar su alta movilidad utilizando técnicas de filtración para su aislamiento. Se pueden necesitar técnicas de enriquecimiento para organismos que hayan sido dañados por estrés ambiental, como cambios térmicos, deshidratación, oxígeno atmosférico, pérdida de nutrientes y shock osmótico, por ejemplo durante el transporte de la muestra. También se pueden utilizar técnicas de enriquecimiento para detectar campilobacters cuando se presentan en cantidades bajas (por ejemplo en muestras de carne).*

*La confirmación preliminar de aislados debe llevarse a cabo mediante microscopía óptica. Los organismos característicos son bacterias Gram negativas, y, en la fase de crecimiento logarítmico, son pequeñas y en forma de S. En cultivos más viejos, predominan las formas de cocos. Cuando se examinan con el microscopio de contraste de fases, los organismos tienen un movimiento rápido y característico como el de un sacacorchos. La identificación de los fenotipos se basa en reacciones bajo diferentes condiciones de crecimiento. Se pueden utilizar pruebas bioquímicas y*

moleculares para confirmar varias especies de *Campylobacter*. Generalmente, *C. jejuni* se puede distinguir de todos los demás campilobacters mediante la hidrólisis de hipurato.

Existen varios métodos fenotípicos para subtipificar *C. jejuni* y *C. coli* incluyendo serotipificación y tipificación por fagos, pero los reactivos que se necesitan para estas técnicas tienen una disponibilidad restringida. Recientemente, se han desarrollado métodos de tipificación molecular y se usan ampliamente con fines epidemiológicos. No existen relaciones obvias entre subtipos y patogenicidad.

**Pruebas serológicas:** Las aves y los mamíferos colonizados, así como los humanos infectados, desarrollan respuestas con anticuerpos circulantes a *C.jejuni/coli*. No existen pruebas serológicas validadas para la detección de infecciones por *Campylobacter*, sino que se pueden utilizar en ensayos inmunoenzimáticos preparaciones simples de antígenos complejos incluyendo proteínas superficiales extraíbles por ácido.

**Requisitos para las vacunas y los materiales de diagnóstico:** No existen vacunas efectivas disponibles para la prevención de infecciones por *Campylobacter* entérico en aves o mamíferos.

## A. INTRODUCCIÓN

El género *Campylobacter* comprende varias especies (34). Los miembros de este género son típicamente bacterias Gram negativas, que no forman esporas, con forma de S o espiral (0,2–0,8 µm de ancho y 0,5–5 µm de largo), con flagelos polares aislados a uno o a ambos extremos, lo que le confiere una movilidad característica, como la de un sacacorchos. Estas bacterias son microaerófilas, pero algunas pueden crecer también aeróbicamente o anaeróbicamente. No fermentan ni oxidan los carbohidratos. Algunas especies, particularmente *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*, son termófilas, y crecen óptimamente a 42°C. Pueden colonizar superficies mucosas, generalmente del tracto intestinal, en la mayoría de las especies de mamíferos y de aves probadas. La especie *C. jejuni* comprende dos subespecies (*C. jejuni* subespecie *jejuni* y *C. jejuni* subespecie *doylei*) que pueden diferenciarse sobre la base de la reducción del nitrato (la subespecie *doylei* no reduce el nitrato). La subespecie *jejuni* se aísla más fácilmente que la subespecie *doylei*. *Campylobacter jejuni* y *C. coli* son las especies patógenas más importantes, porque son agentes zoonóticos. Por tanto, este capítulo se centrará en estas especies, a menos que se manifieste lo contrario. *Campylobacter fetus*, el agente causal de la campilobacteriosis genital bovina, se revisa en el Capítulo 2.3.2.

En humanos susceptibles, la infección por *C. jejuni/coli* se asocia con enteritis aguda y dolor abdominal que dura hasta 7 días o más. Aunque tales infecciones son autolimitadas, pueden producirse complicaciones, como bacteremias, síndrome de Guillain-Barré, artritis reactiva y aborto (29).

Los campilobacters son la causa principal de enfermedades intestinales bacterianas en humanos identificadas en muchos países industrializados (32). Más del 80% de los casos están producidos por *C. jejuni* y alrededor del 10% de los casos, por *C. coli*. Otras especies de *Campylobacter*, tales como *C. consisus*, *C. upsaliensis*, *C. lari* y *C. fetus*, también pueden asociarse con diarrea en humanos. La detección de tales campilobacters es poco común en el mundo industrializado pero más normal en los países en desarrollo (17). Ya que la incidencia de la infección en humanos de los países industrializados se estima alrededor del 1% de la población por año, la carga social y económica de esta enfermedad es significativa (12). Se cree que, básicamente, la fuente de infección por *C.jejuni/coli* en humanos es la manipulación y/o el consumo de carne contaminada, especialmente carne de aves de corral. Sin embargo, el contacto con animales domésticos y con ganado, el consumo de agua contaminada o de leche cruda y los viajes a zonas donde la enfermedad es frecuente se consideran factores de riesgo para la enfermedad en el hombre (12). El control de *Campylobacter* en la cadena alimenticia se ha convertido en el objetivo más importante de las agencias responsables de la salud alimentaria a nivel mundial.

Generalmente, *Campylobacter jejuni* y *C. coli* se consideran comensales de ganado, animales domésticos y aves. Sin embargo, también se han asociado con enfermedades en varios hospedadores. No está claro hasta qué punto *Campylobacter* es el agente causante de la enfermedad o si puede colonizar mejor bajo determinadas condiciones, por ejemplo, los contenidos líquidos del intestino. En perros y gatos, especialmente animales jóvenes o animales sometidos a estrés, se asocia al *C. jejuni* con diarrea (11, 33), y ésta es una fuente de infección humana bien reconocida (32). Los perros y gatos son también frecuentemente colonizados por *C. upsaliensis* (perros) y *C. helveticus* (gatos) (3). Se han descrito brotes de enteritis asociada con *Campylobacter* en algunos animales incluyendo grupos de reproducción de primates no humanos e incluso pequeños mamíferos criados en laboratorio. Se han aislado grandes cantidades de *Campylobacter* de ganado joven con enteritis, incluyendo lechones, corderos y terneros, pero también se encuentran organismos en animales sanos. En las aves, especialmente aves de corral, la enfermedad es rara, a pesar de los altos niveles de colonización con *C. jejuni* o *C. coli*. Se han descrito brotes de hepatitis aviar, pero el papel patogénico de *Campylobacter spp.* en estos brotes no está claro. Una posible excepción son los avestruces, en las cuales se

produce enteritis y muerte asociada con *Campylobacter* en los animales jóvenes. Los *Campylobacter spp.* se encuentran con frecuencia en aves salvajes (7, 36).

*Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. hyointestinalis* y *C. sputorum*, así como *C. fetus* (Capítulo 2.3.2), también pueden asociarse con infecciones en el tracto reproductor (21). En el ganado, todas estas cepas se pueden asociar con aborto. En ovejas hasta el 20% de los abortos asociados con *Campylobacter* se deben a *C. jejuni* o *C. coli*. Tales infecciones, son presumiblemente consecuencia de traslocación del tracto gastrointestinal a través de una ruta ascendente.

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

### 1. Identificación del agente

Se está revisando actualmente (14) el procedimiento ISO (Organización Internacional de Estandarización) existente para el método horizontal de detección de *Campylobacter* termotolerantes en alimentos y piensos animales (13). Se está desarrollando un procedimiento ISO adicional para el aislamiento de *Campylobacter* del agua (ISO/CD 17995:2002). Sin embargo, ninguno de estos métodos estándar pueden ser los óptimos para el aislamiento de campilobacters en animales vivos.

Las muestras que se recolectan son las muestras fecales o intestinales (ciego) de aves de corral (pollos, pavos, gallinas ponedoras, etc.) y de mamíferos productores de carne (ganado vacuno, ovejas y cerdos) y animales domésticos (perros y gatos). En el matadero, se recogen muestras de piel o de carne. En casos esporádicos, por ejemplo, en avestruces jóvenes, los campilobacters se asocian con enfermedades entéricas e, incluso, muerte. En tales casos, y en fetos abortados, los campilobacters se recuperan de muestras de intestino, hígado y bazo tomadas post-mortem.

Los campilobacters son organismos bastante difíciles de cultivar. Su recuperación del material fecal o de los intestinos se puede llevar a cabo:

- Aprovechando la rápida movilidad y el pequeño tamaño de campilobacters en relación con otra flora intestinal, permitiendo que estos organismos pasen a través de los filtros de membrana sobre medio de crecimiento en agar, o
- Usando agar que contenga antibióticos selectivos, incluyendo generalmente varias combinaciones de cefoperazona, anfotericina-B, trimetoprim, vancomicina, etc., y
- La recuperación de *C. jejuni* y *C. coli* termófilo utilizando los medios anteriores se puede mejorar por crecimiento selectivo a la temperatura óptima de crecimiento de 42°C, lo que puede inhibir el crecimiento de bacterias contaminantes.

#### a) Recogida de muestras

##### i) Aves de corral

Se ha descrito que las aves de corral son colonizadas sobre todo por *C. jejuni* (65-95%), con menos frecuencia por *C. coli* y raramente por otras especies (23). Los índices de colonización en pollos están relacionados con la edad. La mayor parte de las poblaciones son negativas hasta los 2-3 meses de edad. Una vez que se produce la colonización por *Campylobacter* en poblaciones avícolas, la transmisión por coprofagia es extremadamente rápida y pueden llegar a colonizarse en 72 horas hasta el 100% de las aves dentro de una explotación. Las muestras de aves vivas, destinadas a la cadena alimenticia, deberían tomarse tan próximas al momento del sacrificio como sea posible (23). La mayoría de las aves albergan grandes cantidades de organismos ( $>10^6$  unidades formadoras de colonias por g de heces). Los campilobacter se pueden aislar a partir de vertidos fecales recientes. Para la detección fiable de *Campylobacter* por cultivo, se deberían recoger heces recién evacuadas (preferiblemente sin trazas de orina). Se debe impedir que tales muestras se sequen antes del cultivo. Cuando se utilizan frotis, se debe utilizar un medio de transporte (como Amies, Cary Blair o Stuart).

##### ii) Ganado vacuno, ovejas y cerdos

Los campilobacters son colonizadores frecuentes del intestino de ganado vacuno, ovejas y cerdos (2, 37, 38). El ganado vacuno y las ovejas son colonizados fundamentalmente por *C. jejuni*, *C. coli*, *C. hyointestinalis* y *C. fetus*, mientras que los cerdos son colonizados predominantemente por *C. coli*. En mamíferos jóvenes, la proporción es más alta que en animales más viejos. En estos últimos, los organismos se pueden detectar intermitentemente en las heces, probablemente debido al bajo número o a emisiones intermitentes del agente. Han de tomarse muestras recientes (muestras rectales si es posible) y se debe impedir que se sequen. Cuando se utilizan frotis, se debe utilizar un medio de transporte (como Amies, Cary Blair o Stuart).

iii) *Perros y gatos*

Ocasionalmente, se asocia a *C. jejuni* con enfermedad clínica en animales domésticos jóvenes, particularmente enteritis. En tales casos la cantidad de organismos vertida puede ser alta. Los perros y los gatos se encuentran colonizados frecuentemente por *C. upsaliensis* (perros) y *C. helveticus* (gatos) (3). Las muestras fecales recogidas deben ser recientes y se debe impedir que se sequen. Cuando se utilizan frotis, se debe utilizar un medio de transporte (como Amies, Cary Blair o Stuart).

iv) Órganos internos (corazón, bazo, hígado o contenidos estomacales)

Los órganos se extraen post-mortem en condiciones asépticas y se envían al laboratorio el mismo día.

v) *Muestras de matadero*

En las aves de corral, generalmente se utilizan los ciegos para la detección de *Campylobacter*. Se pueden cortar con tijeras estériles de la parte restante del intestino y mandarlos intactos al laboratorio en una bolsa de plástico o placa Petri. Para establecer el estado de un lote de animales al final de la cadena de sacrificio, se deben recoger muestras de piel (piel del cuello o del pecho) o se pueden llevar a cabo lavados generales del cuerpo del animal muerto, almacenando el líquido de lavado como muestra a analizar posteriormente.

Las muestras de ganado vacuno, ovejas y cerdos se pueden recoger de los intestinos mediante apertura aséptica de la pared del intestino o tomando frotis rectales. Las muestras de carne se pueden recoger y transportar al laboratorio en una bolsa estéril.

La importancia de *Campylobacter* en el suministro de alimento ha sido revisada por Jacobs-Reitsma (15).

**b) Transporte y tratamiento de muestras**

i) *Transporte*

Los campilobacters son muy sensibles a las condiciones ambientales, incluyendo deshidratación, oxígeno atmosférico, luz solar y temperatura elevada. Por tanto, el transporte al laboratorio y posterior procesado deben hacerse tan rápido como sea posible (preferiblemente el mismo día, y si no dentro de los dos días siguientes). Las muestras no deben transportarse como frotis secos, ya que los campilobacters se secarían y morirían rápidamente. Un medio de transporte adecuado aumenta la probabilidad de mantener campilobacters cultivables en muestras de frotis. Las muestras se deben proteger de la luz.

No se puede recomendar una temperatura ideal para el transporte, pero está claro que la congelación o las temperaturas altas pueden reducir la viabilidad. Se deben evitar temperaturas altas (>20°C), temperaturas bajas (<0°C) y fluctuaciones en la temperatura. Durante el procesado de laboratorio, las muestras deben mantenerse a temperatura ambiente durante periodos cortos (para evitar choques térmicos innecesarios). Cuando el tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y el procesado es largo, se aconseja un almacenamiento a 4(±2) °C. Se deben seguir los procedimientos para transporte, resumidos en el Capítulo 1.1.1. *Métodos de muestreo*.

ii) *Medios de transporte*

*Frotis*: Se recomienda el uso de tubos de transporte, conteniendo medios y frotis. Estos están disponibles comercialmente. El medio para los tubos debe ser Amies, un agar simple o un medio con base de carbón vegetal. La función del medio no es el crecimiento de *Campylobacter* sino proteger a las muestras de la sequedad y de los efectos tóxicos del oxígeno.

Cuando solamente se puedan recoger cantidades pequeñas de muestras fecales/del ciego y no haya tubos de transporte disponibles, se recomienda el envío del espécimen en medios de transporte. Se han descrito varios medios de transporte: Cary-Blair, Cary-Blair modificado, medio Stuart modificado, medio Campyloglicolato, agua con peptona alcalina y medio de prueba de movilidad semisólida. Se han descrito buenos resultados de recuperación utilizando Cary-Blair (18, 28).

iii) *Tratamiento de las muestras*

Las muestras han de procesarse tan pronto como lleguen al laboratorio, preferiblemente el día de llegada o, al menos, durante los 3 días siguientes. Para evitar variaciones en la temperatura, las muestras deberían refrigerarse únicamente cuando no se puedan procesar el mismo día; de otra forma, se deben mantener a temperatura ambiente. Cuando las muestras se envían o se mantienen en el laboratorio a 4°C, debe dejarse que se equilibren a temperatura ambiente antes de su procesado, para evitar choques térmicos.

- Para muestras fecales o intestinales, no se necesita ningún tratamiento, y se pueden poner directamente sobre medios selectivos. Cuando se utiliza el método de filtración, se lleva a cabo una suspensión de las heces (generalmente 1 en 10) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y diluida de forma que se puedan poner gotas de la suspensión sobre el filtro.

- Los ciegos se abren asépticamente cortando el extremo con tijeras estériles y el material se saca fuera, exprimiéndolo para su procesado.
- Los contenidos del estomago fetal se inoculan directamente sobre un medio de cultivo adecuado. Los órganos internos o trozos de los órganos se pasan por la llama después de meterlos en alcohol (70%) para esterilizar la superficie, y posteriormente se homogenizan. El homogenado se inocula en el medio de cultivo.
- Las muestras de piel se juntan (hasta completar una cantidad total de 25 g) y se transfieren a un medio de enriquecimiento. Las muestras de carne se pueden incubar en un medio de enriquecimiento o se pueden lavar, y el medio de lavado se añade a un medio de enriquecimiento. Si se utilizan grandes volúmenes, por ejemplo lavados de animales muertos, se puede utilizar una solución salina estéril y añadirla a un volumen igual de medio de enriquecimiento de doble concentración.

### c) Aislamiento de *Campylobacter*

El aislamiento de *Campylobacter* de muestras fecales o intestinales se lleva cabo, generalmente, mediante colocación directa sobre el medio selectivo o utilizando el método de filtración sobre agar no selectivo. Se recomienda el enriquecimiento para aumentar la sensibilidad del cultivo de microorganismos potencialmente estresado por las condiciones ambientales o en caso de bajos niveles de organismos en las heces de, por ejemplo, ganado vacuno, ovejas y cerdos. Sin embargo, el enriquecimiento de estas últimas muestras no se lleva a cabo rutinariamente. Generalmente, los productos de piel y carne necesitan enriquecimiento para el cultivo de cantidades bajas de campilobacters (estresados). Después del enriquecimiento selectivo, las muestras se subcultivan sobre medios selectivos sólidos.

#### i) Medios selectivos para aislamiento

En la actualidad hay muchos medios en uso para el cultivo bacteriológico de *Campylobacter* spp. Corry *et al.* (9, 10) proporcionan una descripción detallada de las novedades en la detección de *Campylobacter* y la variedad de métodos existentes. Los medios selectivos se pueden dividir en dos grupos fundamentales: medios que contienen sangre y medios que contienen carbón. Los componentes de la sangre y del carbón sirven para eliminar los derivados tóxicos del oxígeno. La mayor parte de los medios están disponibles comercialmente. La selectividad de los medios viene determinada por los antibióticos utilizados. Se utilizan cefalosporinas (generalmente cefoperazona), a veces en combinación con otros antibióticos (por ejemplo vancomicina, trimetoprim). Se utiliza cicloheximida (actidiona) y más a menudo anfotericina B para inhibir a las levaduras y a los hongos (20). La principal diferencia entre los medios es el grado de inhibición de la flora contaminante. Todos los agentes selectivos permiten el crecimiento de *C. jejuni* y *C. coli*. No existe ningún medio disponible que permita el crecimiento de *C. jejuni* e inhiba el de *C. coli* o viceversa. Hasta cierto punto, otras especies de *Campylobacter* (por ejemplo *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus*, *C. fetus* y *C. hyointestinales*) pueden crecer en la mayoría de los medios, especialmente a la temperatura menos selectiva de 37°C. Si fuera necesario, se deberían determinar las especies del *Campylobacter* aislado.

Ejemplos de caldos de enriquecimiento selectivos:

- Caldo Bolton
- Caldo Preston
- Caldo Exeter
- Caldo Park y Sanders
- CCDB (caldo con deoxicolato, cefoperazona y carbón)

Ejemplos de medios sólidos selectivos con sangre:

- Agar Preston
- Agar Skirrow
- Agar Butzler
- Campy-cefex

Ejemplos de medios sólidos con base de carbón

- mCCDA (agar modificado con deoxicolato, cefoperazona y carbón), versión ligeramente modificada de la CCDA descrita originalmente) (5, 6).
- Agar Karmali o CSM (medio de carbón selectivo) (17)
- Agar CAT (cefoperazona, anfotericina y teicoplanina), facilitador del crecimiento de *C. upsaliensis* (1).

#### ii) Inoculación de medios

Para muestras que no necesiten enriquecimiento, se extiende directamente una pequeña cantidad (alrededor de 0.1 g utilizando un asa) sobre un medio selectivo sólido para facilitar el aislamiento de colonias aisladas.

Para muestras que necesiten enriquecimiento (por ejemplo muestras de piel y carne), se diluyen 25 g del material a 1/10 en medio de enriquecimiento. Las muestras de carne o las canales completas de pollo se pueden lavar con solución salina o PBS, después de lo cual se añade un volumen de este líquido de lavado a nueve volúmenes de medio de enriquecimiento. Se pueden añadir volúmenes más grandes de líquido de lavado a un volumen igual de caldo de enriquecimiento de doble concentración. Cuando se usan muestras de carne más pequeñas para el análisis, se pueden lavar con líquido de enriquecimiento, que se incuba posteriormente.

Para fines de investigación se pueden enriquecer frotis fecales/del ciego. Se colocan en 10 ml de caldo de enriquecimiento, bien individualmente o bien juntos, y se incuban.

iii) *Filtración pasiva*

La filtración pasiva evita el uso de medios selectivos y es, por tanto, muy útil para el aislamiento de las especies de *Campylobacter* más sensibles a los antimicrobianos. Este método fue desarrollado por Steele & McDermott (30). Para filtración pasiva, las heces se mezclan con PBS (aproximadamente a dilución de 1/10) para producir una suspensión. Aproximadamente 100 µl de esta suspensión se depositan cuidadosamente sobre un filtro de 0,45 o 0,65 µm, que se ha colocado previamente sobre una placa de agar sangre no selectiva. Ha de tenerse cuidado de no dejar que el inóculo se derrame sobre el borde del filtro. Se deja que las bacterias se muevan a través del filtro durante 30-45 minutos a 37°C o temperatura ambiente. Después se quita el filtro, el fluido que ha pasado a través del filtro se extiende con un asa de vidrio estéril o con un extensor de plástico, y la placa se incuba microaeróbicamente a 42°C (o a 37°C para aislar también especies que no sean *C.jejuni/C.coli*).

iv) *Incubación*

• *Atmósfera*

Se necesitan atmósferas microaeróbicas de 5-10% de oxígeno, 5-10% de dióxido de carbono (y preferiblemente 5-9% de hidrógeno) para un crecimiento óptimo (10, 34). Se pueden producir condiciones atmosféricas microaeróbicas adecuadas mediante diferentes métodos. En algunos laboratorios, se utilizan evacuaciones repetidas del contenido de una jarra de gas seguidas de sustitución de la atmósfera con gases embotellados. Hay disponibles kits generadores de gas de fuentes comerciales. Si se trata de grandes cantidades de cultivos resultan más adecuados los incubadores de atmósfera variable.

Para enriquecimiento, no se necesita ninguna atmósfera específica cuando se utiliza un pequeño espacio de cabeza (<2 cm) en la botella de enriquecimiento, siempre que la tapa esté bien sellada.

• *Temperatura de incubación*

Los medios se pueden incubar a 37°C o 42°C, pero es una práctica común incubar a 42°C para minimizar el crecimiento de contaminantes y para seleccionar el crecimiento óptimo de *C.jejuni/C.coli*. Se añaden los agentes fungostáticos: cicloheximida o anfotericina para impedir el crecimiento de levaduras y hongos a 37°C (6). En algunos laboratorios, la incubación se produce a 41,5°C para armonizar con los protocolos de aislamiento de *Salmonella* y *Escherichia coli* 0157 (13, 14). Para enriquecimiento, se utilizan a veces protocolos específicos en los que se aumenta la temperatura durante el tiempo de incubación para recuperar las células dañadas subletalmente.

• *Tiempo de incubación*

El caldo de enriquecimiento se incuba durante 24-48 horas y se siembra por extensión sobre un medio selectivo sólido.

Generalmente *Campylobacter jejuni* y *C. coli* manifiestan crecimiento sobre medios sólidos en 24-48 horas a 42°C. Se recomiendan 48 horas de incubación para el diagnóstico rutinario, ya que el número adicional de muestras positivas obtenidas mediante incubación prolongada es muy bajo (6).

v) *Identificación sobre medio sólido*

En agar Skirrow u otros medios sólidos que contengan sangre, las colonias características de *Campylobacter* son ligeramente rosadas, redondas, convexas, suaves y brillantes, con un borde regular. En medios con base de carbón tales como mCCDA, las colonias típicas son grisáceas, planas y húmedas, con tendencia a extenderse, y pueden tener brillo metálico.

**d) Confirmación**

Se necesita un cultivo puro para pruebas confirmativas, pero se puede obtener una confirmación preliminar mediante examen microscópico directo del material con colonias sospechosas.

Las pruebas confirmativas de la presencia de campilobacters termófilos y su interpretación (14) se proporcionan en el Cuadro 1. Los resultados de las pruebas de confirmación se confirman utilizando controles positivos y negativos.

**Cuadro 1. Pruebas confirmativas de *Campylobacter* termófilos**

Prueba confirmatoria	Resultado para <i>Campylobacter</i> termófilo
Morfología	Bacilos curvados pequeños
Movilidad	Característica (muy móviles y con forma de sacacorchos)
Oxidasa	+
Glucosa(TSI)	-
Lactosa (TSI)	-
Sacarosa (TSI)	-
Gas (TSI)	-
Producción de H <sub>2</sub> S (TSI)	- (se pueden producir trazas de ennegrecimiento en presencia de <i>C.coli</i> )
Crecimiento a 25°C	-

TSI = agar hierro con azúcar triple

- i) *Examen microscópico de morfología y movilidad:* el material de una colonia sospechosa se suspende en solución salina y se evalúan, preferiblemente mediante un microscopio de contraste de fases, sus características, como bacilos delgados curvos o espirales con movilidad en forma de sacacorchos. Los cultivos más viejos muestran formas *cocoides* menos móviles.
- ii) *Detección de oxidasa:* Obtener material de una colonia sospechosa y colocarlo en papel de filtro mojado con reactivo de oxidasa. La aparición en 10 segundos de color violeta o azul intenso significa que la reacción es positiva. Si se utiliza un kit de prueba de la oxidasa disponible comercialmente, hay que seguir las instrucciones del fabricante.
- iii) *Fermentación de azúcares y producción de sulfhídrico:* El medio de agar con hierro y triple azúcar (TSI) se inocula por extensión longitudinal sobre la superficie del agar inclinado y por picadura en la base (el extremo del medio TSI en el tubo). Incubar microaeróbicamente a 42°C durante 24-48 horas. Interpretar los resultados como en el Cuadro 2.

**Cuadro 2. Interpretación de los resultados en agar TSI**

Apariencia	Interpretación
Extremo:	
Amarillo	Positivo a glucosa (fermentación de glucosa)
Rojo o sin cambios	Negativo a glucosa (sin fermentación de glucosa)
Negro	Formación de sulfhídrico (H <sub>2</sub> S)
Burbujas o grietas	Producción de gas a partir de glucosa
Superficie inclinada:	
Amarillo	Positivo a lactosa y/o sacarosa (utilizados uno o ambos azúcares)
Rojo o sin cambios	Negativo a lactosa y sacarosa (ningún azúcar utilizado)

- iv) *Crecimiento a 25°C:* Inocular el cultivo puro en una placa de agar sangre no selectivo e incubar a 25°C en atmósfera microaeróbica durante 48 horas.
  - v) *Pruebas de aglutinación de látex* disponibles comercialmente para confirmación de cultivos puros de *C. jejuni/C. coli* (incluyendo a menudo también *C. lari*).
- e) Identificación de *Campylobacter* a nivel de especie**

Entre las especies de *Campylobacter* spp. que crecen a 42°C, las que se encuentran más frecuentemente en muestras de origen animal son *C. jejuni* y *C. coli*. Sin embargo, se han descrito frecuencias bajas de otras especies. Generalmente, *C. jejuni* se puede diferenciar de otras especies de *Campylobacter* sobre la base de la hidrólisis de hipurato, ya que es la única especie que da positiva a hipurato. Se ha descrito la presencia de cepas de *C. jejuni* negativas a hipurato (31). El cuadro 3 proporciona algunas características

fenotípicas clásicas básicas de las especies más importantes de *Campylobacter* termófilos (14). Una de las características probadas más frecuentemente ha sido la sensibilidad al ácido nalidíxico, pero actualmente puede ser difícil de interpretar porque se ha producido un aumento en las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* resistentes al ácido nalidíxico, y en el aislamiento de genogrupos de *C. lari* sensibles al ácido nalidíxico. Se han descrito programas de especificación más extensos en la literatura (25, 34). Los resultados de la especificación deberían confirmarse utilizando controles positivos y negativos definidos.

La especificación bioquímica puede suplementarse e incluso reemplazarse por métodos moleculares. Se han descrito algunas sondas de ADN y ensayos de identificación basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para especies de *Campylobacter* (25, 34). On *et al.* (26) evaluaron la especificidad de 11 ensayos de identificación basados en PCR para *C. jejuni* y *C. coli*.

**Cuadro 3.** Características fenotípicas básicas de especies termófilas seleccionadas de *Campylobacter*.

Características	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Hidrólisis de hipurato	+	-	-	-
Catalasa	+	+	+	- o ligero
Acetato de indoxil	+	+	-	+
Cefalotina	R	R	R	S

Clave: + = positivo; - = negativo; S = sensible; R = resistente

- i) **Detección de hidrólisis de hipurato:** Suspender un asa de cultivo de una colonia sospechosa en 400 µl de un solución de hipurato sódico al 1% (ha de tenerse cuidado de no incorporar agar). Incubar a 37°C durante 2 horas, después añadir lentamente 200 µl de solución de ninhidrina al 3,5% a un extremo del tubo para forma una capa superpuesta. Reincubar a 37°C durante 10 minutos y leer la reacción. Reacción positiva: azul/violeta oscuro. Reacción negativa: clara o gris. Si se utilizan discos de prueba de hidrólisis de hipurato disponibles comercialmente, seguir las instrucciones del fabricante.
- ii) **Detección de actividad catalasa:** Colocar una colonia sospechosa sobre un porta de vidrio. Poner una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% sobre el material bacteriano. Examinar inmediatamente la producción de gas, lo que indica actividad catalasa. La prueba es positiva si aparecen burbujas de gas en 30 segundos.
- iii) **Detección de hidrólisis de acetato de indoxil:** Poner una colonia sospechosa sobre un disco de acetato de indoxil y añadir una gota de agua destilada estéril. Si el acetato de hidroxil se hidroliza se produce un cambio de color a azul oscuro en 5-10 minutos. Si no hay cambio de color significa que no se ha producido la hidrólisis.
- iv) **Prueba de sensibilidad a cefalotina:** La sensibilidad a cefalotina se prueba mediante la técnica de difusión como se ha descrito anteriormente (14, 27).

#### f) Detección molecular de *Campylobacter*

Se han presentado previamente en la literatura métodos basados en PCR para la detección de *Campylobacter* en muestras de heces animales y en muestras de carne enriquecida (24, 25). Uno de estos ensayos está en uso en Dinamarca para análisis rutinario de frotis de cloacas de pollos en el matadero (4, 19). Hay al menos una prueba de PCR disponible comercialmente para muestras de carne después del enriquecimiento.

#### g) Pruebas basadas en la captura del antígeno

Existen varios enzimoimmunoensayos disponibles comercialmente para la detección de *Campylobacter* en muestras de deposiciones animales. Una de estas pruebas se ha usado para muestras de ciegos de pollo (n = 42) con una sensibilidad del 91% y una especificidad del 64% (35). Para la detección de *Campylobacter* en muestras de alimento enriquecidas, hay al menos dos ensayos comerciales en el mercado.

## 2. Pruebas serológicas

Aunque la colonización intestinal, sintomática o no, se asocia con respuestas de anticuerpo circulante y de las mucosas, no se han validado pruebas serológicas desarrolladas para la identificación de mamíferos o aves infectadas. Sin embargo, se pueden utilizar preparaciones simples de antígenos complejos en un enzimoimmunoensayo (ELISA). Los antígenos más frecuentemente utilizados para detectar respuestas de anticuerpos son las proteínas de superficie extraíbles con ácido (EA) (8). Primariamente estas comprenden la



flagelina y una serie de proteínas de superficie periféricas llamada proteínas PEB. Ha de tenerse en cuenta que los flagelos de *Campylobacter* contienen epitopos de reacción cruzada antigénica con otros organismos íntimamente relacionados, como los helicobacters.

### C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO

No existen vacunas desarrolladas específicamente para *C. jejuni* o *C. coli* en animales o aves. Sin embargo, está actualmente en desarrollo para su utilización en humanos una vacuna oral monovalente de células enteras muertas de *C. jejuni* (cepa 81176), combinada con un adyuvante de toxina de *E. coli* modificada lábil al calor, y este enfoque experimental podría aplicarse a aves y mamíferos ([www.armymedicine.army.mil/usammda/info196.pdf](http://www.armymedicine.army.mil/usammda/info196.pdf)).

Se pueden producir antisueros dirigidos contra campylobacters mediante la hiperinmunización de conejos, cabras, etc. (22). Los conejos se pueden inmunizar intramuscularmente con una suspensión bacteriana tratada con formalina (0,3% de formalina durante 30 minutos y lavar después en PBS) en un adyuvante apropiado. Los conejos se reinoculan a intervalos de 14 días con una serie de inyecciones subcutáneas del mismo antígeno. Para obtener antisueros reactivos para múltiples serotipos de *C.jejuni/coli*, los animales deberían inmunizarse secuencialmente con diferentes cepas, preferiblemente de serotipos diferentes. Ha de ponerse de manifiesto que los antisueros producidos de estas forma reaccionaran con la mayor parte de las especies de *Campylobacter*, incluyendo *C. hyointestinalis* y *C. fetus* así como con *Helicobacter* spp.

### REFERENCIAS

1. ASPINALL S.T., WAREING D.R.A., HAYWARD P.G. & HUTCHINSON D.N. (1993). Selective medium for thermophilic campylobacters including *Campylobacter upsaliensis*. *J. Clin. Pathol.*, **46**, 829–831.
2. ATABAY H.I. & CORRY J.E.L. (1998). The isolation and prevalence of campylobacters from dairy cattle using a variety of methods. *J. Appl. Microbiol.*, **84**, 733–740.
3. BAKER J., BARTON M.D. & LANSER J. (1999). *Campylobacter* species in cats and dogs in South Australia. *Aust. Vet. J.*, **77**, 662–666.
4. BANG D.D., PEDERSEN K. & MADSEN M. (2001). Development of a PCR assay suitable for *Campylobacter* spp. mass screening programs in broiler production. *J. Rapid Meth. Automat. Microbiol.*, **9**, 97–113.
5. BOLTON F.J., HUTCHINSON D.N. & COATES D. (1984). Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from faeces. *J. Clin. Microbiol.*, **19**, 169–171.
6. BOLTON F.J., HUTCHINSON D.N. & PARKER G. (1988). Reassessment of selective agars and filtration techniques for isolation of *Campylobacter* species from faeces. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **7**, 155–160.
7. BROMAN T., PALMGREN H., BERGSTRÖM S., SELLIN M., WALDENSTRÖM J., DANIELSSON-THAM M.-L. & OLSEN B. (2002). *Campylobacter jejuni* in black-headed gulls (*Larus ridibundus*): Prevalence, genotypes, and influence on *C. jejuni* epidemiology. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 4594–4602.
8. CAWTHRAW S., AYLING R. & NEWELL D.G. (1994). The isotype, specificity and kinetics of systemic and mucosal antibodies to *Campylobacter jejuni* during experimental oral infections of chickens. *Avian Dis.*, **38**, 341–349.
9. CORRY J.E.L., ATABAY H.I., FORSYTHE S.J. & MANSFIELD L.P. (2003). Culture media for the isolation of campylobacters, helicobacter and arcobacters. *En: Handbook of Culture Media for Food Microbiology*, Second Edition, Corry J.E.L., Curtis G.D.W. & Baird R.M. eds. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 271–315.
10. CORRY J.E.L., POST D.E., COLIN P. & LAISNEY M.J. (1995). Culture media for the isolation of campylobacters. *Int. J. Food Microbiol.*, **26**, 43–76.
11. FOX J.G., MOORE R. & ACKERMAN J.I. (1983). *Campylobacter jejuni*-associated diarrhea in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **183**, 1430–1433.

12. FRIEDMAN C.R., NEIMANN J., WEGENER H.C. & TAUXE R.V. (2000). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. *En: Campylobacter*, Second Edition, Nachamkin I. & M.J. Blaser, eds. ASM Press, Washington DC, USA, 121–138.
13. ISO INTERNATIONAL STANDARD 10272 (1995) +Technical Corrigendum 1 and 2 (1997). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection of thermotolerant *Campylobacter*. International Organisation for Standardisation (ISO), ISO Central Secretariat, 1 rue de Varembé, Case Postale 56, CH - 1211, Geneva 20, Switzerland.
14. ISO/CD 10272-1 AND 10272-2 (2002). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter* growing at 41,5 degrees Celsius. Part 1: Detection method; Part 2: Colony count technique. International Organisation for Standardisation (ISO), ISO Central Secretariat, 1 rue de Varembé, Case Postale 56, CH - 1211, Geneva 20, Switzerland.
15. JACOBS-REITSMA W.F. (2000). *Campylobacter* in the food supply. *En: Campylobacter*, Second Edition, Nachamkin I. & M.J. Blaser, eds. ASM Press, Washington DC, USA, 467–481.
16. KARMALI M.A., SIMOR A.E., ROSCOE M., FLEMING P.C., SMITH S.S. & LANE J. (1986). Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. *J. Clin. Microbiol.*, **23**, 456–459.
17. LASTOVICA A.J. & SKIRROW M.B. (2000). Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *En: Campylobacter*, Second Edition, Nachamkin I. & M.J. Blaser, eds. ASM Press, Washington DC, USA, 89–120.
18. LUECHTEFELD N.W., WANG W.L., BLASER M.J. & RELLER L.B. (1981). Evaluation of transport and storage techniques for isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from turkey cecal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, **13**, 438–443.
19. LUND M., WEDDERKOPP A., WAINO M., NORDENTOFT S., BANG D.D., PEDERSEN K., & MADSEN M. (2003). Evaluation of PCR for detection of *Campylobacter* in a national broiler surveillance programme in Denmark. *J. Appl. Microbiol.*, **94**, 929–935.
20. MARTIN K.W., MATTICK K.L., HARRISON M. & HUMPHREY T.J. (2002). Evaluation of selective media for *Campylobacter* isolation when cycloheximide is replaced with amphotericin B. *Lett. Appl. Microbiol.*, **34**, 124–129.
21. NEWELL D.G., DUIM B., VAN BERGEN M.A.P., GROGONO-THOMAS R. & WAGENAAR J.A. (2000). Speciation, subspeciation and subtyping of *Campylobacter fetus* associated with infertility within the UK. *Cattle Practice*, **8**, 421–425.
22. NEWELL D.G. & WAGENAAR J.A. (2000). Poultry infections and their control at the farm level. *En: Campylobacter*, Second Edition, Nachamkin I. & M.J. Blaser, eds. ASM Press, Washington DC, USA, 497–509.
23. NEWELL D.G., MCBRIDE H. & PEARSON A.D. (1983). The identification of outer membrane proteins and flagella of *Campylobacter jejuni*. *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 1201–1208.
24. OLSEN J.E., ABO S., HILL W., NOTERMANS S., WERNARS K., GRANUM P.E., POPVIC T., RASMUSSEN H.N. & OLSVIK O. (1995). Probes and polymerase chain reaction for the detection of food-borne bacterial pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* **28**, 1–78.
25. ON S.L.W. (1996). Identification methods for *Campylobacters*, *Helicobacters*, and Related organisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, **9**, 405–422.
26. ON S.L.W. & JORDAN P.J. (2003). Evaluation of 11 PCR assays for species-level identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 330–336.
27. PEFANIS S.M., VENTER C.G. & HERR S. (1989). The use of cephalothin and triphenyltetrazolium chloride impregnated filter paper strips in the identification of *Campylobacter* species. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **56**, 143–144.
28. SJOGREN E., LINDBLOM G.B. & KAUJER B. (1987). Comparison of different procedures, transport media, and enrichment media for isolation of *Campylobacter* species from healthy laying hens and humans with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, **25**, 1966–1968.

29. SKIRROW M.B. & BLASER M.J. (2000). Clinical aspects of *Campylobacter* infection. *En: Campylobacter*, Second Edition, Nachamkin I. & M.J. Blaser, eds. ASM Press, Washington DC, USA, 69–88.
30. STEELE T.W. & McDERMOTT S.N. (1984). The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *Pathology*, **16**, 263–265.
31. STEINHAUSEROVA I., CESKOVA J., FOJTIKOVA K. & OBROVSKA I. (2001). Identification of thermophilic *Campylobacter* spp. by phenotypic and molecular methods. *J. Appl. Microbiol.*, **90**, 470–475.
32. TAUXE R.V. (1992). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. *En: Campylobacter jejuni: current state and future trends*, Nachamkin I., Blaser M.J. & Tompkins L.S., eds. ASM Press, Washington DC, USA, 9–19.
33. TORRE E. (1993). Factors influencing shedding of *Campylobacter jejuni* in dogs without diarrhea. *Am. J. Vet. Res.*, **54**, 260–262.
34. VANDAMME P. (2000). Taxonomy of the family Campylobacteraceae. *En: Campylobacter*, Second Edition, Nachamkin I. & M.J. Blaser, eds. ASM Press, Washington DC, USA, 3–26.
35. WAGENAAR J.A., DE GOFFAU K., ACHTERBERG R., DIJKSTRA J., JACOBS-REITSMA W. & LAMBERS J. (2001). The use of an enzyme immunoassay for the detection of *Campylobacter* in poultry caecal samples. Abstract L15 at 11<sup>th</sup> CHRO (Freiburg), *Int. J. Med. Microbiol.*, **129**, 107–108.
36. WALDENSTROM J., BROMAN T., CARLSSON I., HASSELQUIST D., ACHTERBERG R.P., WAGENAAR J.A. & OLSEN B. (2002). Prevalence of *Campylobacter jejuni*, *C. lari*, and *C. coli* in different ecological guilds and taxa of migrating birds. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 5911–5917.
37. WEIJTENS M. (1996). *Campylobacter* in pigs (dissertation). Utrecht University, The Netherlands.
38. WESLEY I.V., WELLS S.J., HARMON K.M., GREEN A., SCHROEDER-TUCKER L., GLOVER M. & SIDDIQUE I. (2000). Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in dairy cattle. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 1994–2000.

\*  
\* \*