

Presencia de factores de virulencia y patovariedades en cepas de *Campylobacter jejuni* aisladas en pacientes con diarrea y niños sanos

Jordi Reina, Amparo Muñoz, María Jesús Ros y Victoria Fernández-Baca

Servicio de Microbiología Clínica. Hospital Universitario Son Dureta. Palma de Mallorca.

FUNDAMENTO: Determinar la presencia de factores de virulencia (adhesión, invasión, citotoxicidad y actividad hemolítica) y establecer la existencia de patovariedades (fenotipos de virulencia) en cepas de *Campylobacter jejuni* aisladas en pacientes pediátricos con diarrea inflamatoria, diarrea secretora y portadores.

MÉTODOS: Se han analizado 95 cepas procedentes de 48 pacientes con diarrea inflamatoria (sangre y moco en heces), 30 pacientes con diarrea secretora (líquida o acuosa) y 17 cepas aisladas en niños asintomáticos (grupo control). El estudio de la capacidad de adherencia, invasión y citotoxicidad se ha realizado en la línea celular Hep-2 y el análisis de la actividad hemolítica en placas de agar sangre con un 5% de sangre de carnero. Las patovariedades se han definido utilizando la adhesión celular (fenotipos A y a) y la citotoxicidad (fenotipos E y e).

RESULTADOS: El 29,1% de las cepas procedentes de las diarreas inflamatorias se han mostrado adherentes; el 66,6%, invasivas; el 64,5%, citotóxicas, y el 52,1%, hemolíticas. En el grupo de las diarreas secretoras los valores obtenidos han sido del 70, 20, 10 y 6,6%; mientras que en el grupo control, del 11,7% (adherencia) y 5,8% (invasión). Se han obtenido datos estadísticamente significativos para las cepas secretoras en su carácter adherente y en las cepas inflamatorias en su capacidad de invasión, citotoxicidad y hemólisis. De las diferentes patovariedades destaca que el fenotipo Ae predomina en las cepas secretoras y el fenotipo ae en las cepas del grupo control. No se ha observado una

patovariedad predominante en las cepas inflamatorias. **CONCLUSIONES:** El estudio de los factores de virulencia permite establecer el comportamiento patogénico de las cepas de *C. jejuni* aisladas en las heces de pacientes con diarrea. El estudio de la adherencia y citotoxicidad (patovariedades) puede utilizarse como marcadores de virulencia y predecir el comportamiento inflamatorio o secretor de la virulencia por *C. jejuni*.

Palabras clave: *Campylobacter jejuni*. Factores de virulencia. Patovariedades. Diarrea inflamatoria. Diarrea secretora.

Presence of virulence factors and pathovars in *Campylobacter jejuni* strains isolated from patients with diarrhea and healthy children

BACKGROUND: To study the prevalence of virulence factors (adhesion, invasion, cytotoxicity and hemolytic activity) and to establish the presence of pathovars (virulence phenotype) in *C. jejuni* strains isolated in pediatric patients with inflammatory and secretory diarrhea and asymptomatic carriers.

METHODS: We analyzed 95 strains of 48 patients with inflammatory diarrhea (blood and mucus in feces), 30 patients with secretory diarrhea (watery) and 17 strains isolated in asymptomatic children (control group). The study of adherence capacity, invasion and cytotoxicity was made in the Hep-2 cell line, and the analysis of hemolytic activity in blood agar plates with a 5% sheep's blood. The pathovars were defined by the cellular adhesion (phenotypes A and a) and the cytotoxicity (phenotypes E and e).

RESULTS: 29.1% of inflammatory strains presented adherence capacity, 66.6% were invasive, 64.5% cytotoxic and 52.1% hemolytic. In the secretory strains the values were 70, 20, 10 and 6.6% respectively; in the control group the 11.7% presented

Correspondencia: Dr. J. Reina.
Servicio de Microbiología Clínica. Hospital Universitario Son Dureta.
Andrea Doria, 55. 07014 Palma de Mallorca.

Manuscrito recibido el 9-11-1994; aceptado el 22-3-1995.

Enferm Infecc Microbiol Clin 1995; 13: 511-515.

adherence capacity and 5.8% were invasive. We obtained difference statistically significant for the secretory strains in the adherence capacity, and in inflammatory strains in the adherence capacity, cytotoxicity and hemolysis. The phenotype Ae predominate in the secretory strains, and the phenotype ae in the strains belonging to the control group. No pathovar predominates in the inflammatory strains.

CONCLUSIONS: The analysis of virulence markers permit us to establish the pathogenic behaviour of the *C. jejuni* strains isolated in patients with diarrhea. The study of the adherence capacity and cytotoxicity (pathovars) would be used as a virulence markers and to predict the inflammatory or secretory nature of the diarrhea caused by *C. jejuni* strains.

Key words: *Campylobacter jejuni*. Virulence factors. Pathovars. Inflammatory diarrhea. Secretory diarrhea.

Los diferentes estudios epidemiológicos realizados sobre las gastroenteritis causadas por *Campylobacter jejuni* han apuntado la posibilidad de que existan importantes variaciones en el comportamiento patogénico (marcadores de virulencia) entre las cepas de distintas zonas geográficas. Así, en los países desarrollados la mayoría de pacientes presentan una colitis inflamatoria caracterizada por la presencia de abundantes leucocitos (78-93% de casos) y sangre macroscópica en heces (60-65% casos)¹⁻³. Por el contrario las diarreas producidas en pacientes pertenecientes a países en vías de desarrollo y zonas tropicales se caracterizan por ser de tipo no inflamatorio y de predominio secretor (coleriformes). Además de ello, en estos países las tasas de portadores asintomáticos son muy elevadas y cercanas al 39%^{1,4}, fenómeno que no ocurre en los países desarrollados (<5% portadores)^{1,2}.

Todo esto hace pensar en la posibilidad de que las cepas de *C. jejuni* puedan expresar o modular sus distintos factores de virulencia en función de las características inmunológicas del paciente, las exposiciones repetidas pueden determinar un cierto grado de inmunidad⁵, o que coexistan dos grupos patogénicos distintos en estas cepas. Uno de ellos sería preferentemente de tipo adherente-invasor y produciría diarreas de tipo inflamatorio, y el otro sería de tipo enterotoxigénico, dando lugar a diarreas secretoras^{4,5}.

Debido a que apenas existen en nuestro país estudios sobre la presencia de los distintos factores de virulencia en cepas de *C. jejuni*, hemos realizado un análisis de éstos en las cepas aisladas en pacientes

con diarrea inflamatoria y secretora, así como en un grupo de control asintomático en un intento de comprobar el predominio de alguno de ellos en un determinado tipo de diarrea.

Pacientes y métodos

Se ha estudiado la presencia de diferentes factores de virulencia en 78 cepas de *C. jejuni* aisladas en pacientes pediátricos con diarrea. De ellos, 48 presentaron una diarrea de tipo inflamatoria y 30 un proceso diarreico de tipo secretor. Así mismo se han estudiado estos mismos factores de virulencia en 17 cepas aisladas en niños sanos (portadores asintomáticos) estudiados por motivos clínicos no relacionados con ningún proceso diarreico (grupo control).

Se ha considerado como diarrea inflamatoria aquella en la que se observaba la presencia de moco y sangre macroscópica en heces y se asociaba en ocasiones a dolor abdominal en la zona periumbilical y/o fiebre. Por el contrario, la diarrea secretora se ha definido como aquella en que la consistencia de las heces era líquida y abundante sin moco ni sangre. Las cepas del grupo control (portadores asintomáticos) se han obtenido del estudio de diferentes poblaciones infantiles sanas que acudieron al hospital por motivos diferentes a los procesos diarreicos y todos ellos carecían de antecedentes gastrointestinales recientes.

Todas las cepas han sido aisladas en el proceso rutinario de las heces para estudio de la presencia de enteropatógenos y su identificación en cuanto a especie se ha realizado siguiendo los criterios bioquímicos convencionales para este grupo bacteriano⁶.

Los factores de virulencia analizados han sido la capacidad de adhesión o adherencia, invasibilidad y citotoxicidad sobre las células Hep-2 crecidas en monocapas de 1 cm de diámetro (tubos tipo shell-vial; Vircell, Ingelheim Diagnostica) y la actividad hemolítica sobre hematíes de carnero.

Para el análisis de los factores celulares se ha seguido el protocolo recomendado por Fauchere et al⁷, con algunas modificaciones, consistente en realizar una suspensión de las diferentes cepas, a partir del crecimiento obtenido en placas de agar sangre incubadas 48 horas en una atmósfera microaerófila, en 2 tubos que contenían 3 ml de tampón fosfato-salino (pH, 7,2) hasta obtener una concentración ajustada al valor 10 de la escala de MacFarland (3×10^9 ufc/ml). Uno de los tubos se utiliza simultáneamente para el estudio de la actividad adherente e invasibilidad, mientras que el segundo se reserva para el análisis de la citotoxicidad de las cepas sobre las células Hep-2.

Para el estudio de la capacidad de adherencia bacteriana (adhesividad) se añaden 200 μ l de la suspensión bacteriana a 2 tubos shell-vial de células Hep-2 y se mantienen durante 1 hora en atmósfera ambiental a 37 °C en posición vertical para favorecer el proceso de adhesión bacteriana a la superficie celular. Transcurrido este periodo de tiempo se decanta el contenido de un shell-vial, se lava la monocapa con PBS (pH, 7,2) dos veces y se fija con ace-

TABLA 1. Principales factores de virulencia detectados en las cepas de *Campylobacter jejuni*

Factor	Tipo de diarrea		Sanos (n=17)	Valores de p*		
	Inflamatoria (n=48)	Secretora (n=30)		Inflamatoria frente a secretora	Inflamatoria frente a sanos	Secretora frente a sanos
Adherencia	14 (29,1)	21 (70)	2 (11,7)	0,001	0,269	0,0004
Invasión	32 (66,6)	6 (20)	1 (5,8)	0,0002	0,0001	0,3789
Citotoxicidad	31 (64,5)	3 (10)	0	0,0001	0,0001	0,4675
Hemólisis	25 (52,1)	2 (6,6)	0	0,0001	0,0005	0,7369

*Obtenidos mediante la prueba de ji al cuadrado. Los valores entre paréntesis corresponden al porcentaje.

tona a -20°C durante 10 minutos. Posteriormente se tiñen las monocapas con el colorante Giemsa durante 10-15 minutos y se examinan al microscopio óptico a 1.000 aumentos para observar y establecer el grado de adherencia bacteriana a las células. Se ha considerado una cepa como adherente si se podían detectar más de 10 bacterias/célula.

Para el estudio de la capacidad invasiva (invasibilidad) de las cepas se decanta el segundo shell-vial, se lava dos veces con PBS, se añaden 200 μl de MEM (minimal essential medium) (Vircell) y se deja incubar durante 3 horas a 37°C para permitir la penetración e invasión bacteriana. Posteriormente se decantan los tubos, se lavan $\times 2$ con PBS y se fijan las monocapas con acetona a -20°C durante 10 minutos. Se tiñen las monocapas con el colorante Giemsa durante 10-15 minutos y tras el secado se establece la capacidad de invasión de la cepa por observación con el microscopio óptico a 1.000 aumentos. Se ha considerado una cepa como invasiva si se observaba un mínimo de 10 bacterias/célula.

El estudio del efecto citotóxico (citotoxicidad) se ha realizado a partir del segundo tubo que contiene la suspensión de la cepa, para ello se ha centrifugado a 2.500 rpm durante 20 minutos a 4°C y se filtra posteriormente el sobrenadante a través de un filtro Millipore de 0,45 μ . Del filtrado se añaden 200 μl a un shell-vial de células Hep-2 y se deja incubar durante 24 horas a 37°C en atmósfera ambiental. Transcurrido este tiempo se realiza la lectura del efecto citotóxico (destrucción de la monocapa celular) en un microscopio invertido a 10 y 20 aumentos con y sin el colorante trypan blue. El efecto citotóxico se confirma mediante la fijación de la monocapa con acetona, tinción con el colorante Giemsa y observación en el microscopio óptico.

El estudio de la actividad hemolítica de las cepas se ha realizado sembrando las mismas en placas de agar sangre con un 5% de sangre de carnero o incubadas durante 48 horas a 37°C en una atmósfera de tipo microaerófila.

Para la definición de las diferentes patovariedades se han utilizado los factores de virulencia recomendados por Fauchere et al^{7,8}, es decir, la adhesión celular (adhesividad) y citotoxicidad (efecto citotóxico) sobre la línea celular Hep-2. Se ha designado a la presencia del primero de ellos como fenotipo A y su ausencia como fenotipo a; y a la presencia del segundo como fenotipo E y su ausencia como fenotipo e. Con ello se ha podido establecer la existencia de las cepas de *C. jejuni* de cuatro patovariedades correspondientes a los fenotipos AE, Ae, aE y ae.

Para el análisis estadístico de los resultados se ha utilizado el test de ji al cuadrado con la correlación de Yates en los casos que ha sido preciso.

Resultados

En el grupo de pacientes con diarrea inflamatoria, el 29,1% de las cepas presentaban capacidad de adhesión a las células Hep-2, el 66,6% eran invasivas, el 64,5%, citotóxicas, y el 52,1% de las cepas se mostraban como hemolíticas. En el grupo de pacientes con diarrea secretora los porcentajes de detección fueron del 70, 20, 10 y 6,6%. Se han observado diferencias estadísticamente significativas en la capacidad de adhesión de las cepas secretoras ($p < 0,001$) y en la invasividad ($p < 0,0002$), citotoxicidad ($p < 0,0001$) y hemólisis ($p < 0,001$) de las cepas inflamatorias (tabla 1). Las 17 cepas procedentes del grupo control se mostraron adherentes en el 11,7% e invasivas en el 5,8%, no detectándose ninguna cepa con actividad citotóxica ni hemolítica. En relación con las cepas control, las cepas inflamatorias se han mostrado más invasivas, citotóxicas y hemolíticas, mientras que las cepas secretoras sólo se han comportado como más adherentes.

En relación con las diferentes patovariedades, de las 48 cepas inflamatorias 12 (25%) presentaron el fenotipo AE, 2 (4%) Ae, 17 (35,5%) aE y 17 (35,5%) ae. En las cepas secretoras los porcentajes fueron: AE, 6,6%; Ae 63,3%; aE, 3,3%, y ae, 30%; y en las cepas control: Ae, 11,7% y ae, 88,3% (tabla 2). No se han observado diferencias estadísticamente significativas entre las cepas inflamatorias y secretoras en los fenotipos AE y ae; sin embargo sí hubo diferencias en el fenotipo Ae que predominaba en las cepas secretoras ($p < 0,0001$) y en el fenotipo ae que predominaba en las cepas del grupo control ($p < 0,0004$). Así mismo se han observado diferencias estadísticamente significativas entre las cepas inflamatorias y las secretoras en el fenotipo aE que predominó en las cepas inflamatorias ($p < 0,002$) y el predominio del fenotipo ae en las cepas control tanto en relación con las secretoras ($p < 0,0004$) como con las inflamatorias ($p < 0,0005$). El estudio de es-

TABLA 2. Patovariedades detectadas en los diferentes grupos de pacientes

Tipo diarrea	Cepas	Fenotipos			
		AE	Ae	aE	ae
Inflamatoria	48	12 (25)	2 (4,1)	17 (35,5)	17 (35,5)
*p (inflamatoria frente a secretora)		0,08	0,0001	0,002	0,8
Secretora	30	2 (6,6)	19 (63,3)	1 (3,3)	9 (30)
p (secretora frente a sanos)		0,7369	0,001	0,7711	0,0004
Sanos	17	0	2 (11,7)	0	15 (88,3)
p (inflamatoria frente a sanos)		0,0549	0,5	0,0113	0,0005

*Valores de p obtenidos mediante la prueba de ji al cuadrado. Los valores entre paréntesis corresponden al porcentaje.

tos dos factores de virulencia permite clasificar a las cepas de *C. jejuni* en cuatro diferentes patovariedades, comprobándose cómo las células inflamatorias son más citotóxicas y menos adherentes que las cepas secretoras ($p < 0,001$).

Discusión

Los diferentes estudios realizados en *C. jejuni* han demostrado la presencia de varios factores de virulencia probablemente implicados en los procesos diarréicos^{9,10}. Así, se ha descrito la producción de una enterotoxina similar en estructura, receptor y mecanismo de acción a la toxina colérica y una serie de citotoxinas que producen efectos citotóxicos y citopáticos sobre diferentes líneas celulares¹⁰. Además de ello, Fauchere et al^{7,8} han demostrado cómo las cepas de *C. jejuni* se adhieren a la superficie de los enterocitos (adhesividad) y posteriormente penetran en su interior (invasibilidad) para dar lugar a un proceso citopático inflamatorio intestinal.

El estudio de la adherencia celular realizada por nosotros sobre células Hep-2 ha mostrado cómo el 29,1% de las cepas inflamatorias y el 70% de las cepas secretoras presentaban esta capacidad de adhesión. Este dato es estadísticamente significativo y parece indicar que las cepas secretoras precisan de un mayor grado de adherencia previo al proceso de síntesis de la enterotoxina. Datos semejantes han sido descritos por Ruiz-Palacios et al¹¹, quienes han observado cómo las cepas productoras de enterotoxina predominan en los pacientes con diarrea secretora y que además el carácter enterotoxigénico va ligado a la capacidad de adhesión celular. Nuestro porcentaje global de cepas adherentes ha sido del 44,8% (35 cepas), muy inferior al comunicado por Lindblom et al¹² en Suecia (100% de las cepas). Es posible que existan diferencias geográficas, como ya se ha mencionado, en la expresión de los distintos factores de virulencia de *C. jejuni*. Así, en Francia Fauchere et al⁷ y Fendri et al¹³ han observado cómo cerca del 49% de las cepas de *C. jejuni* presentaban capacidad de adherencia, pudiendo establecerse dos

tipos de fenotipos en función de la capacidad de adherencia celular (A y a). De este modo el 44,8% de nuestras cepas presentarían el fenotipo A (adherentes) y el 45,2% el fenotipo a (no adherentes), datos muy semejantes a los descritos por estos autores. El 11,7% de las cepas aisladas en el grupo control también mostraban capacidad adherente. Es posible que este mecanismo sea el responsable del mantenimiento del estado de portador, a través de la adhesión de la cepa a las células de la mucosa intestinal.

La invisibilidad es la capacidad que presentan algunas cepas de *C. jejuni* y que les permite atravesar la membrana citoplasmática y penetrar en el interior de la célula; esta capacidad de invasión es un fenómeno de virulencia que predice el desarrollo de una posterior diarrea de tipo inflamatorio en este microorganismo^{14,15}. En nuestro estudio hemos observado cómo un porcentaje muy elevado (66,6%) de las cepas aisladas en pacientes con diarrea inflamatoria mostraban capacidad invasiva. Por el contrario, sólo el 20 y el 6,6% ($p < 0,0001$) de las cepas aisladas en pacientes con diarrea secretora y portadores mostraban este marcador de virulencia. Estos datos son más elevados que los comunicados por Lindblom et al¹² en Suecia (39%) sin embargo, estos autores sólo estudian pacientes adultos y no especifican el tipo de diarrea. Por el contrario, Ruiz-Palacios et al¹¹ han observado cómo el 70% de las cepas aisladas en pacientes con diarrea inflamatoria presentan en sus heces cepas con capacidad invasiva. Este mismo autor correlaciona los tres principales factores de virulencia de *C. jejuni* y establece que el aislamiento de una cepa invasiva pero no adherente puede ser considerado como factor de riesgo para el padecimiento de una diarrea inflamatoria. Aceptamos plenamente esta conclusión, dado que hemos detectado diferencias estadísticamente significativas en la expresión de estos dos marcadores de virulencia, de modo que una cepa adherente se correlaciona con una diarrea secretora y una cepa invasora con una diarrea inflamatoria.

Otro importante factor de virulencia detectado en *C. jejuni* es la enterotoxina termolábil que le da un

carácter enterotoxigénico^{10,16}. Nosotros no hemos estudiado la producción de esta toxina pero sí hemos analizado el carácter citotóxico a través del estudio del efecto destructivo sobre la línea Hep-2. Hemos observado cómo la citotoxicidad es un factor de virulencia íntimamente asociado a la capacidad de invasión celular. De este modo, el porcentaje de cepas citotóxicas (64,5%) es muy semejante al de cepas invasivas (66,6%), predominando claramente en las cepas inflamatorias. Este resultado parece demostrar que tras el proceso invasivo las cepas inician una etapa de proliferación y elaboración de citotoxinas que determina la posterior lisis celular y el inicio de una respuesta inmune local, dando lugar a un proceso inflamatorio local en el epitelio intestinal¹⁷⁻¹⁹.

Además de analizar la capacidad citotóxica de las cepas, como marcador de reacción inflamatorio, hemos estudiado la actividad hemolítica de estas mismas cepas en un intento de correlacionarlo con la presencia de sangre en las heces. Al analizar este parámetro hemos podido observar que el 52,1% de las cepas inflamatorias eran hemolíticas, mostrando este dato significación estadística al compararlo con las cepas secretoras y las del grupo control.

De estos datos se desprende la existencia de un patrón fenotípico de virulencia predominante en las cepas de *C. jejuni* inflamatorias y que sería el de una cepa invasora, citotóxica y hemolítica. Por el contrario, las cepas secretoras sólo presentarían un fenotipo de virulencia, el de ser cepas intensamente adherentes y además productoras de alguna enterotoxina no estudiada por nosotros.

Siguiendo las recomendaciones de Fauchere et al⁷ y sustituyendo el efecto citopático de la elongación del cultivo celular como marcador de citotoxicidad, por el efecto citotóxico completo, hemos podido clasificar al conjunto de las cepas estudiadas en las cuatro patovariedades propuestas por este autor. Así hemos podido establecer que la patovariedad Ae (adherente no citotóxica) predomina en las cepas secretoras, y la patovariedad ae (no adherente no secretora), en las cepas no patogénicas aisladas en portadores asintomáticos. En el grupo de las cepas inflamatorias no ha podido observarse una patovariedad predominante con significación estadística, aunque el carácter citotóxico (patovariedades AE y aE) se ha observado en el 70,5% de las cepas.

En conclusión, el estudio de la presencia de algunos factores de virulencia permite predecir el comportamiento patogénico de las cepas de *C. jejuni* aisladas en heces y establecer el tipo de diarrea que ocasionarán, pudiendo iniciarse de este modo con rapidez las medidas terapéuticas correspondientes.

Bibliografía

- Blaser MJ, Berkowitz ID, LaForce FM, Cravens J, Reller LB, Wang WL. *Campylobacter* enteritis: clinical and epidemiological features. *Ann Intern Med* 1979; 91: 179-185.
- Calva E, Ruiz-Palacios GM, López-Vidal AB, Ramos A, Bojalil R. Cohort study of intestinal infection with *Campylobacter* in Mexican children. *Lancet* 1988; 1: 503-506.
- Colgan T, Lambert JR, Newman A, Luk SC. *Campylobacter jejuni* enterocolitis—a clinicopathologic study. *Arch Pathol Lab Med* 1980; 104: 571-574.
- Glass RI, Stoll BJ, Huq MI, Struelens MJ, Blaser M, Kibriya MG. Epidemiologic and clinical features of endemic *Campylobacter jejuni* infection in Bangladesh. *J Infect Dis* 1983; 148: 292-296.
- Pérez-Pérez GI, Taylor DN, Echeverría PD, Blaser MJ. Lack of evidence of enterotoxin involvement in pathogenesis of *Campylobacter* diarrhea. En: Nachamkin I, Blaser MJ, Tompkins LS, eds. *Campylobacter jejuni: current status and future trends*. Washington D.C.: American Society for Microbiology 1992; 184-192.
- Penner IL. *Campylobacter*, *Helicobacter* and related spiral bacteria. En: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 5ª ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1991; 402-409.
- Fauchere JL, Kervella M, Rosenau A, Pages JM, Fendri C. In vitro study of virulence factors of enteric *Campylobacter* spp. En: Nachamkin I, Blaser MJ, Tompkins LS, eds. *Campylobacter jejuni: current status and future trends*. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1992; 168-175.
- Fauchere JL, Rosenau A, Veron M, Moyen EN, Richard S, Pfister A. Association with HeLa cells of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from human feces. *Infect Immun* 1986; 54: 283-287.
- Walker RI, Caldwell MB, Lee EC, Guerry P, Trust TJ, Ruiz-Palacios GM. Pathophysiology of *Campylobacter* enteritis. *Microbiol Rev* 1986; 50: 81-94.
- Reina J. Análisis de los mecanismos de patogenicidad y virulencia descritos en las campilobacterias termotolerantes. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1993; 11: 497-501.
- Ruiz-Palacios GM, Cervantes LE, Newburg DS, López-Vidal Y, Calva JJ. In vitro models for studying *Campylobacter* infections. En: Nachamkin I, Blaser MJ, Tompkins LS, eds. *Campylobacter jejuni: current status and future trends*. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1992; 176-183.
- Lindblom GB, Cervantes LE, Sjogren E, Kaijser B, Ruiz-Palacios GM. Adherence, enterotoxigenicity, invasiveness and serogroups in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from adult humans with acute enterocolitis. *APMIS* 1990; 98: 179-184.
- Fendri C, Rosenau A, Moyen EN, Fauchere JL. Prevalence of virulence markers of enteric *Campylobacter* in France and Tunisia. *Res Microbiol* 1991; 142: 591-596.
- DeMelo MA, Gabbiani G, Pechere JC. Cellular events and intracellular survival of *Campylobacter jejuni* during infection of Hep-2 cells. *Infect Immun* 1989; 57: 2.214-2.222.
- Fauchere JL, Kervella M, Rosenau A, Mohanna K, Veron M. Adhesin to HeLa cells of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* outer membrane components. *Res Microbiol* 1989; 140: 379-392.
- Johnson WM, Lior H. Toxins produced by *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Lancet* 1984; 1: 229-230.
- Guerrant RL, Wanke CA, Pennie RA, Barrett LA, Linva AM, O'Brien AD. Production of a unique cytotoxin by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immunol* 1987; 55: 2.526-2.530.
- Akhtar SQ, Hug F. Effect of *Campylobacter jejuni* extracts and culture supernatans on cell culture. *J Trop Med Hyg* 1989; 92: 80-85.
- Moore MA, Blaser MJ, Pérez-Pérez GI, O'Brien DO. Production of shiga-like cytotoxin by *Campylobacter*. *Microb Pathogen* 1988; 4: 455-462.