



Universidad Austral de Chile

**Facultad de Ciencias
Escuela de Ciencias**

**PROFESOR PATROCINANTE: Heriberto Fernández
INSTITUTO: Microbiología Clínica
FACULTAD: Medicina**

**“CAPACIDAD DE ADHERENCIA DE CEPAS DE *Arcobacter butzleri* AISLADAS DE
DIFERENTES ORÍGENES”**

**Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar al
Grado de Licenciado en Ciencias
Biológicas.**

**FERNANDA DANIELA INZUNZA DALLER
VALDIVIA – CHILE
2005**

"El camino hasta ahora ha sido muy difícil, pero también ha estado lleno de buenos momentos, de esos que nunca se olvidan, y esos momentos, están llenos de maravillosas personas, es por ello que esta tesis está dedicada a todos ellos, en especial a los que estuvieron conmigo y ya no están"

A mi Irmí y a mi Padre que desde algún lugar estarán festejando este nuevo triunfo.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a los proyectos FONDECYT 1030245 y DID 200401 por haber financiado este seminario de graduación y al profesor Heriberto Fernández, por la confianza depositada en mi, al invitarme a participar en este proyecto, por su tiempo, paciencia, conocimientos y disponibilidad en todo momento, además de todos aquellos que forman y formaron parte del Instituto de Microbiología Clínica mientras trabajé en él. No puedo dejar de nombrar a las "secres", compañeros, profesores y amigos, que formaron parte de mi vida universitaria desde el año 2000, muy especialmente a la "profe" Rosa Eugenia Trumper por su cariño y apoyo en todos estos años, a mi gran amiga "Mayo" que me ha acompañado en los momentos mas difíciles, a la "Jovi" y Carito, por su grata amistad, a la "Ine", Vero, Susana, Karin, Loretto, Jorge, Diego y Andrés, por esos buenos momentos ¡Gracias de todo corazón! No puedo olvidar a mis grandes amigos que a pesar de la distancia siempre han estado conmigo, Lucy, Patty, Andrea y Jorge. Por último quisiera agradecer y dedicar este logro a Dios y a mi familia, en especial a aquellos que de una u otra manera hicieron mas fácil mi paso por la universidad a mi "tatita", a la tía Aída por recibirme en su casa, a las tías Norma y Pilar por su constante apoyo y cariño, a Gerardo por sus preocupaciones y gran afecto, a la "Maree" por su apoyo, cariño y por haberse convertido en una gran amiga y casi hermana, a mis bebas por su cariño incondicional, a mi tío "Dany" y a la Javi por su amor y apoyo en todo momento. Finalmente agradezco a mi madre por su amor, apoyo, esfuerzo y por ser una maravillosa mujer, ya que si no fuera por todo lo que me ha dado hasta ahora no sería quien soy ¡Muchas gracias por todo!

ÍNDICE

		Pág.
	ÍNDICE	I
	ÍNDICE DE TABLAS, GRÁFICOS Y FIGURAS	III
1.	RESUMEN	1
1.2.	SUMMARY	2
2.	INTRODUCCION	3
2.1.	HIPÓTESIS DE TRABAJO	9
2.2.	OBJETIVO GENERAL	9
2.3.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3.	MATERIAL Y METODOS	10
3.1	MATERIALES	10
3.1.1.	Material biológico	10
3.1.1.1.	Cepas bacterianas	10
3.1.1.2.	Línea celular	11
3.1.1.3.	Animales de experimentación	11
3.1.2.	Reactivos	11
3.1.3.	Equipos	11
3.1.4.	Otros	11
3.2.	MÉTODO	12
3.2.1.	Recuperación de cepas	12
3.2.2.	Cultivo de células epiteliales HEp-2	12

		Pág.
3.2.3.	Ensayo de la capacidad de adherencia	13
3.2.4.	Ensayo del aumento de la capacidad de adherencia por pasajes consecutivos en peritoneo de ratón	14
4.	RESULTADOS	16
5.	DISCUSION	22
5.1	CONCLUSIONES	27
6.	LITERATURA CITADA	28
7.	ANEXO: MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES DE TRABAJO	37

ÍNDICE
TABLAS, GRÁFICOS Y FIGURAS

		Pág.
TABLA 1:	Fuente de origen y número de cepas de <i>A. butzleri</i> usadas para el ensayo de adherencia.	10
TABLA 2:	Capacidad de adherencia a células epiteliales Hep-2 de cepas de <i>A. butzleri</i> aisladas de distintos orígenes y cuantificación del promedio de las bacterias adheridas por célula, con su respectiva desviación estándar.	17
TABLA 3:	Capacidad de adherencia expresada en porcentaje, de <i>A. butzleri</i> según origen de la cepa.	19
TABLA 4:	Capacidad de adherencia de la cepa AC-11, tras pasajes por peritoneo de ratón.	20
GRÁFICO 1:	Capacidad de adherencia de <i>A. butzleri</i> aisladas de diferentes orígenes.	18
GRÁFICO 2:	Resultados de la capacidad de adherencia de <i>Arcobacter butzleri</i> , según origen de la cepa.	19
GRÁFICO 3:	Resultados de la capacidad de adherencia de la cepa AC-11, tras pasaje por peritoneo de ratón.	20
FIGURA 1:	Células HEp-2 con <i>A. butzleri</i> adheridas a la superficie celular. Microscopia de contraste de fase (aumento 1250x)	21

1. RESUMEN

El género *Arcobacter* agrupa bacilos Gram negativos, curvos, móviles por flagelación polar, capaces de crecer en condiciones de aerobiosis y de microaerofilia. De hábitat diversos, reconoce como reservorio a diferentes animales, destacando aves y mamíferos. Sin embargo, *Arcobacter butzleri* es considerado un patógeno emergente, capaz de causar diversas infecciones y abortos en animales, a demás de diversos cuadros clínicos en el hombre, habiendo sido asociada a cuadros de enteritis, diarrea, bacteremias y peritonitis.

Para ampliar los conocimientos sobre los factores de patogenicidad de esta bacteria se determinó la capacidad de adherencia de 50 cepas de *A. butzleri* a la línea celular HEp-2, aisladas de diferentes orígenes (humano, agua y animales).

El 100% de las cepas en estudio presentó capacidad de adherencia y aquella que presentó el menor porcentaje, fue capaz de aumentar la capacidad de ella mediante pasajes por peritoneo de ratón, lo que permite inferir que *A. butzleri* es capaz de adherirse a células epiteliales HEp-2, ocupando eventualmente este mecanismo como primer paso en el desarrollo del proceso infeccioso.

1.2. SUMMARY

The genus *Arcobacter* comprises Gram-negative, curved rods, motil by polar flagellation. They are able to grow under aerobiosis conditions and also under microaerobic conditions. *Arcobacter butzleri* is the most frequent species recognizing as reservoir different animals, birds and mammals. It is considered an emergent pathogen that can produce diverse infectious processes and abortion in animals. In human beings *A. butzleri* can cause diarrhea as well as bacteremia and peritonitis.

To increase the knowledge about their pathogenical factors, the adherence capacity of 50 *A. butzleri* strains was determined using the cellular line HEp-2.

All the strains showed adherence capacity and those presenting the lowest adherence percentages were able to increase their adherence capacity after successive peritoneal passages in mouse.

The obtained results allow to infer that *A. butzleri* is capable to adhere to epithelial cells (HEp-2) and probably it could use this mechanism as the first step in the development of the infectious process.

2. INTRODUCCIÓN

Durante muchos años la ciencia ha tenido como principal preocupación la salud mundial y ha luchado por encontrar cura a diferentes enfermedades que aquejan al ser humano, plantas y animales. Es por ello que el estudio de la microbiología se hace indispensable para el conocimiento de la patogénesis y epidemiología de diversos agentes microbianos, ya sean virales, bacterianos, parasitarios o fúngicos.

Uno de ellos corresponde a bacterias que constituyen el género *Arcobacter* (del latín *arcus*: arco y del griego *bacter*: bacteria), patógenos emergentes que fueron descritos por Vandamme et al. 1992. Las especies de éste género pertenecen a la división *Gracillicutes*, clase *Proteobacteria*, familia *Campylobacteraceae*. Esta familia agrupa importantes patógenos para el ser humano que se encuentran clasificados en dos géneros, el género *Campylobacter* que posee especies como *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, entre otras y el género *Arcobacter* que posee cuatro especies, *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* y *A. nitrofigilis* (Atabay y Corry, 1998; Fernández et al. 2000; Vandamme et al. 1991; Vandamme et al. 1992).

El género *Arcobacter* fue descrito inicialmente como “*Vibrio/Spirillum* organisms” y más tarde, como bacterias aerotolerantes, semejantes a *Campylobacter*, capaces de crecer a 30° C (*aerotolerant Campylobacter-like organisms*) e incorporadas al género *Campylobacter*, conformando las especies *C. cryaerophilus*, *C. nitrofigilis*, *C. butzleri* y *C. skirrowii*. Posteriormente, tras estudios de inmunotipificación e hibridación del DNA–

RNA, se pudo comprobar que no existe relación genotípica con *Campylobacter* y fue propuesto, en 1991, el nuevo género *Arcobacter* para agrupar a estos microorganismos (Fernández et al. 1995; Vandamme et al. 1991; Vandamme y De Ley, 1991; Vandamme et al. 1992).

El género *Arcobacter* se caracteriza por agrupa bacilos Gram negativos, no esporulados que presentan una morfología curva, helicoidal o en forma de S itálica. A pesar de ello, en cultivos de varios días adoptan una morfología cocoide bioquímicamente inactiva. Su tamaño puede fluctuar entre 0,2 a 0,9 μm de ancho y 0,5 a 3,0 μm de largo, son móviles por flagelación monótrica o anfítrica, que les proporciona una motilidad característica en forma de sacacorchos. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30° C, aunque pueden crecer en condiciones de aerobiosis y de microaerofilia en un rango de temperatura que va de los 15° C a los 37° C, a diferencia del género *Campylobacter* que sólo lo hace en microaerofilia. Además, poseen un metabolismo quimioorganotrófico, utilizando como fuente de energía aminoácidos o intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico por lo que los carbohidratos no son fermentados ni oxidados. Son oxidasa positiva y catalasa positiva o variable (Fernández et al. 2000; Neil et al. 1985; Vandamme et al. 1992).

El primer aislamiento de esta bacteria fue realizado por Ellis et al. (1977) a partir de fetos bovinos abortados e inicialmente fueron asociados con mastitis bovina y con abortos en ovinos, bovinos y porcinos. Posteriormente también fueron relacionados con

cuadros de enteritis, diarreas y bacteremias en el ser humano (Bordreau et al. 1991; Logan et al. 1982; Neil et al.; 1978; Neil et al. 1985).

De las cuatro especies que conforman el género *Arcobacter*, las especies que más se relacionan con afecciones en el ser humano son *A. butzleri* y *A. cryaerophilus*. Pese a ello, *A. butzleri* es la especie más frecuentemente aislada desde pacientes con bacteremia, endocarditis, apendicitis, peritonitis y cuadros diarreicos. También ha sido aislada de distintos animales como, cerdos, caballos, primates, tortugas, fetos abortados de ovinos y porcinos, además de productos alimenticios y aguas contaminadas. La especie *A. cryaerophilus* ha sido aislada desde pacientes con bacteremia y cuadros diarreicos, de ganado con mastitis, carcasas de pollo y de fetos abortados de bovinos, ovinos y porcinos. Por su parte, *A. skirrowii* ha sido aislada de fluidos de prepucio de toro, desde deposiciones diarreicas y fetos abortados de bovinos, ovinos y porcinos y pese a que esta especie no es característica de seres humanos, recientemente fue aislada por primera vez de un paciente longevo con diarrea crónica. Finalmente, *A. nitrofigilis* se relaciona principalmente con la fijación de nitrógeno en plantas y por lo tanto ha sido aislada desde las raíces y desde la rizosfera de plantas de pantanos salados. A diferencia de los otros miembros de la familia *Campylobacteraceae* esta especie necesita altas concentraciones de NaCl para un óptimo crecimiento (Anderson et al. 1993; Boer et al. 1996; Fernández et al. 1995; Lerner et al. 1994; Nachamkim y Blaser, 2000; On et al. 1995; On et al. 2002; Tee et al. 1988; Wibo et al. 2004; Yan et al. 2000).

Como se ha mencionado anteriormente, el hábitat de este género es muy diverso y se reconocen como reservorio a varias especies de animales incluyendo animales domésticos y salvajes, donde las especies patógenas han sido aisladas de órganos reproductivos, de fetos abortados y desde el tracto intestinal de humanos y animales. Sin embargo, especies de *Arcobacter* también han sido detectadas en reservas de agua, alcantarillados, ambientes salinos y moluscos filtradores. Es por ello que las vías de transmisión al hombre son muy variadas, ya sea por el consumo de carnes, mariscos, leche sin pasteurizar o de aguas contaminadas (Boer et al. 1996; Jacob et al. 1998; Mansfield y Forsythe, 2000; Nachamkim y Blaser, 2000; Villarruel et al 2003; Zenetti et al. 1996).

Con respecto a los mecanismos de patogenicidad aún surgen muchas interrogantes, pero debido a la similitud filogenética que hay con el género *Campylobacter*, especialmente con *C. jejuni*, los procesos de patogénesis, distribución y vías de transmisión que se han descrito hasta el momento podrían ser semejantes en el género *Arcobacter*. Cabe señalar que la patogenicidad y o factores de virulencia del género *Campylobacter* se relacionan principalmente con la capacidad de adherencia -mediante el flagelo-, capacidad invasora y producción de toxinas (Doikoku et al. 1990; Konkel et al. 1990; Morgan, 1985).

El fenómeno de adherencia bacteriana desempeña un papel patógeno fundamental y se define como la unión estable de la bacteria a diferentes superficies. El rol que juega este fenómeno es promover la colonización y posiblemente incrementar la eficacia de

las enterotoxinas al disminuir la distancia que estas tienen que viajar para alcanzar las células blanco (epiteliales) del intestino. En general las bacterias adherentes se comportan presentando resistencia a la defensa inmunitaria, a veces a la terapia antimicrobiana y tienden a persistir (Baquero, 1987; Maciel, 1996; Pascual, 1987).

Cabe destacar que la unión que se establece entre la bacteria y las diferentes superficies, supone un determinante ecológico muy importante en la colonización de plantas y animales, existiendo en la adherencia bacteriana dos tipos de mecanismos, específicos e inespecíficos.

Los mecanismos inespecíficos están mediados por una serie de fuerzas fisicoquímicas (fuerzas electroestáticas de Van Der Waals e interacciones hidrofóbicas) que permiten un primer contacto entre la bacteria y las superficies celulares, esto permitirá la posterior actuación de los mecanismos específicos ligando-receptor, en donde interactúan moléculas complementarias especializadas, tanto de la bacteria (generalmente proteínas) como de la membrana de la célula eucariótica (carbohidratos o glicocalix) que establecerán y organizarán la adherencia bacteriana (Beachey, 1981; Pascual, 1987).

La participación del flagelo en el proceso de la adherencia bacteriana ha sido ampliamente estudiada en la familia *Campylobacteraceae*. En el año 1985 Newel et al., compararon la capacidad de adherencia de cepas de *C. jejuni* flageladas y aflageladas, éstas independientes de la motilidad de las cepas flageladas, resultaron ser menos

adherentes. Este fenómeno podría explicarse por la presencia de adhesinas en el flagelo que les permite aumentar su capacidad de adherencia independiente de la actividad del flagelo. Por lo demás modelos *in vitro* indican la presencia de otras adhesinas distintas a la proteína flagelar termolábil como son lipopolisacáridos y proteínas de membrana externa. Además se ha sugerido que la bacteria podría interactuar con el mucus del epitelio intestinal, ya que este organismo presenta una particular adaptación a este complejo material. Sin embargo, a pesar de estos estudios las bases moleculares y estructurales del proceso de adherencia específicamente en *C. jejuni* a células epiteliales ha sido descrito parcialmente. Pese a ello, se sugiere que el flagelo es parte importante en el proceso de la adherencia bacteriana (Andrew, 1992; De Melo y Pechere, 1990; Grant et al. 1993; Lee et al. 1986; Mc Sweegan y Walter, 1986; Newel et al. 1984; Newel et al. 1985).

Tomando en cuenta los antecedentes mencionados anteriormente nos hemos planteado evidenciar algunos de los factores de patogenicidad de *A. butzleri*, específicamente relacionados con su capacidad de adherencia a células epiteliales.

2.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las cepas de *A. butzleri*, independiente de su origen, son capaces de adherirse a células epiteliales HEp-2

2.2 OBJETIVO GENERAL

Establecer la capacidad de adherencia y frecuencia en la colonización de las células epiteliales, causada por cepas de *A. butzleri* aisladas de distintos orígenes.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la capacidad de adherencia de las cepas de *A. butzleri* aisladas de distintos orígenes.
- Determinar si el origen de la cepa se relaciona con la capacidad de adherencia.
- Determinar la frecuencia de adherencia, en relación al origen de la cepa.
- Determinar si existe aumento de la capacidad de adherencia mediante pasajes intraperitoneales sucesivos en animales de experimentación en la cepa que presente la menor adherencia.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Materiales Biológicos:

3.1.1.1 Cepas Bacterianas

Para las pruebas de adherencia fueron estudiadas 50 cepas de *A. butzleri* provenientes de distintos orígenes (tabla 1), las que previamente identificadas por PCR, fueron mantenidas congeladas a -35° C en el cepario del Instituto de Microbiología Clínica de la Universidad Austral de Chile.

TABLA 1: Fuente de origen y número de cepas de *A. butzleri* usadas para el ensayo de adherencia.

Fuente de Origen	Número de capas
Fecas de Bovino	5
Mariscos	5
Humano	12
Fecas de Pelicano	6
Carcasa de Pollo	8
Menudencias de Pollo	8
Agua del río Calle-Calle	6
Total	50

3.1.1.2 Línea Celular

Para establecer la capacidad de adherencia de las cepas de *A. butzleri* se utilizó la línea celular HEP-2 derivada de carcinoma de laringe humana.

3.1.1.3 Animales de experimentación

Para establecer aumento de la adherencia mediante pasajes intraperitoneales, fueron utilizados ratones cepa Rockefeller, procedentes del bioterio del Instituto de Inmunología de la Universidad Austral de Chile.

3.1.2. Reactivos

Alcohol-acetona, alcohol, base agar bacteriológico, base caldo OXOID, extracto de levadura, fuccina fenicada, lugol, metanol 40%, Buffer fosfato salino (PBS) estéril, RPMI-1640, suero bovino fetal sin antibióticos, tioglicolato, violeta de metilo.

3.1.3. Equipos

Autoclave Orthmann, balanza Chyo, cámara de flujo laminar, horno pasteur Orsa, incubadora Orthmann, microscopio óptico, contraste fase y fluorescencia Carl Zeiss, refrigerador Sindelen, Vortex Thermoline.

3.1.4. Otros

Aceite de inmersión, algodón, asa de siembra, bálsamo de Canadá, botellas de vidrio, cubreobjetos, gradillas, guantes de latex, lápiz marcador, material quirúrgico, matraces Erlenmeyer, mechero, membranas de filtración, micro-pipetas, pinzas, pipetas

graduadas, pipetas Pasteur, placas de cultivo Nuc Lab-Tek, placas Petri, portaobjetos, probetas, puntas para micro-pipetas, tómulas, tubos de ensayo, tubos Leighton, varilla de agitación.

3.2 MÉTODO

3.2.1 Recuperación de cepas

Las cepas de *A. butzleri* ya identificadas por PCR, fueron descongeladas, para luego ser sembradas en agar sangre y en tubos con caldo tioglicolato, incubando en aerobiosis a 26 ° C por 48 horas.

Se verificó la pureza de los cultivos por medio de una tinción de Gram para corroborar microscópicamente bacilos espirilados Gram negativos. La motilidad fue verificada por microscopia de contraste de fase o campo oscuro, además de las pruebas de catalasa y oxidasa.

3.2.2 Cultivo de células epiteliales HEp-2

Las células epiteliales HEp-2, fueron mantenidas en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con un 10% de suero bovino fetal, con la presencia de antibióticos, en un ambiente húmedo con 5% de CO₂ hasta obtener un tapiz semiconfluyente de células de aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células HEp-2 por ml.

Para los ensayos de adherencia se prepararon monocapas de células HEp-2 en tubos Leighton y en placas de cultivos celulares de 24 pocillos, conteniendo cada uno de ellos cubreobjetos estériles. Cada tubo y cada placa fueron sembrados con $1,0 \times 10^5$ células HEp-2 por ml y luego fueron incubados por 18 hrs a 36° C. Posteriormente se controló el estado de las células y la pureza de los cultivos mediante microscopio invertido.

3.2.3 Ensayo de la capacidad de adherencia

Se preparó una suspensión bacteriana con una densidad igual a la del tubo N°2 del nefelómetro de Mc Farland (aproximadamente 10^8 bacterias/ml) en RPMI-1640, con un 10% de suero bovino fetal sin antibióticos. De esta suspensión se inoculó 1ml en tubos Leighton que contenían cubreobjetos con las monocapas semiconfluentes de células HEp-2 adheridas a ellos. Posteriormente, para optimizar el procedimiento se utilizaron placas de cultivos celulares de 24 pocillos en reemplazo de los tubos Leighton.

Las monocapas fueron incubadas durante 3 horas a 37° C en un ambiente con 5% de CO_2 para permitir que las bacterias se adhieran a las células.

Las monocapas celulares fueron lavadas 5 veces con PBS estéril para, posteriormente, ser fijadas con metanol 40% durante 15 minutos y luego ser teñidos con May Grunwald-Giemsa.

Finalmente, los cubreobjetos fueron sacados de los tubos Leighton o de las placas de cultivo y se montaron en portaobjetos para cuantificar el fenómeno de adherencia mediante microscopia de contraste de fase (aumento de 1250x).

Los resultados fueron expresados como el porcentaje de células HEp-2 que presentaron bacterias adheridas y el número de bacterias adheridas por célula. Se consideró que una cepa era adherente cuando al menos el 20% de las células HEp-2 presentaban una o más bacterias adheridas, según la proporción definida para *Campylobacter* por Lindblom et al. (1989).

En los ensayos fueron utilizados como control positivo una cepa de *Escherichia coli* de adherencia comprobada y como control negativo células sin bacterias adheridas.

3.2.4. Ensayo del aumento de la capacidad de adherencia por pasajes consecutivos en peritoneo de ratón

De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo de adherencia se seleccionó la cepa que presentó el menor porcentaje de adherencia, (correspondiente a una de las cepas aisladas de agua tabla N° 1) y se preparó una suspensión de ella con una densidad equivalente al tubo N° 2 del Nefelómetro de Mc Farland para inocular intraperitonealmente 1 ml a cada ratón utilizado.

Después de 24 horas el animal fue sacrificado con una sobredosis de éter, para luego realizar una incisión abdominal, tomar muestras de líquido peritoneal y de sangre por punción cardíaca, para ser sembradas en agar sangre y en agar Houf para *Arcobacter*.

Las placas de agar fueron incubadas por 48 hrs a 36° C con el fin de recuperar las cepas inoculadas en el peritoneo del ratón.

Todo el proceso descrito anteriormente corresponde a un pasaje. Fueron realizados cinco pasajes consecutivos con el fin de determinar nuevamente la capacidad de adherencia de las cepa recuperada, mediante el ensayo en células HEp-2 descrito anteriormente.

4. RESULTADOS

El 100% de las cepas presentó capacidad de adherencia a células epiteliales HEp-2 *in vitro*. Los porcentajes de adherencia fluctuaron entre un 46 y un 100% considerando el total de las cepas, lo que se puede observar en la tabla 2 y en el gráfico 1 y entre un 69 y 100% según el origen de las cepas como se puede observar en la tabla 3 y en el gráfico 2.

La cepa AC-11 que presentó el menor porcentaje de adherencia, tras los pasajes por peritoneo de ratón fue capaz de aumentar su capacidad de adherencia como se muestra en el gráfico 3. Los valores de adherencia aumentaron progresivamente desde un 46 a un 83% en el quinto pasaje.

TABLA 2: Capacidad de adherencia a células epiteliales HEp-2 de cepas de *A. butzleri* aisladas de distintos orígenes y cuantificación del promedio de las bacterias adheridas por célula, con su respectiva desviación estándar.

CEPA	ORIGEN	N° de bacterias 50 células X ± SD	ADHERENCIA (%)
BRUG- 0043	Humano	25,74 ± 11,61	100
BRUG-198	Humano	4,39 ± 4,66	88
BRUG-288	Humano	24,89 ± 9,69	100
BRUG-331	Humano	21,12 ± 9,002	100
BRUG-454	Humano	5,46 ± 8,38	90
BRUG-615	Humano	14,88 ± 8,83	100
BRUG-758	Humano	4,76 ± 4,72	90
BRUG-894	Humano	6,51 ± 6,18	84
A -711	Humano	6,17 ± 9,72	88
F-215	Humano	8,15 ± 10,88	94
P-187	Humano	19,46 ± 12,15	92
P-206	Humano	19,27 ± 12,23	100
UAR-159	Carcasa de pollo	6,39 ± 4,25	99
UAR-162	Carcasa de pollo	21,35 ± 12,29	100
UAR-187	Carcasa de pollo	14,29 ± 6,89	98
UAR-205	Carcasa de pollo	13,33 ± 8,89	98
UAR-206	Carcasa de pollo	2,59 ± 2,39	84
UAR-210	Carcasa de pollo	3,28 ± 5,58	70
UAR-212	Carcasa de pollo	4,2 ± 4,02	84
UAR-230	Carcasa de pollo	2,17 ± 2,09	80
UAR-228	Menudencias de pollo	9,31 ± 7,55	100
UAR-270	Menudencias de pollo	7,93 ± 6,07	100
HP-02	Menudencias de pollo	6,65 ± 5,66	92
HP-12	Menudencias de pollo	1,11 ± 1,79	46
HP-22	Menudencias de pollo	4,38 ± 3,64	96
HP-29	Menudencias de pollo	2,27 ± 2,63	68
HP-30	Menudencias de pollo	9,03 ± 8,71	97
HP-206	Menudencias de pollo	3,26 ± 2,43	91
AP-1	Fecas de pelicano	7,76 ± 6,49	99
AP-15	Fecas de pelicano	7,7 ± 6,87	94
AP-25	Fecas de pelicano	9,89 ± 8,90	98
AP-31	Fecas de pelicano	13,03 ± 9,61	97
AP-40	Fecas de pelicano	13,12 ± 10,78	100
AP-5	Fecas de pelicano	1,51 ± 1,50	65
BV-03	Fecas de bovino	11,45 ± 7,47	100
BV-16	Fecas de bovino	27,09 ± 10	100
BV-21	Fecas de bovino	24,41 ± 13,04	100
BV-26	Fecas de bovino	23,35 ± 15,95	99
BV-27	Fecas de bovino	29,6 ± 11,2	100
M-25	Macerado de mariscos	5,01 ± 5,58	94
MC-12	Macerado de mariscos	23,46 ± 11,65	100
MC-13	Macerado de mariscos	7,93 ± 8,28	96
MC-25	Macerado de mariscos	11,61 ± 11,15	93
25-C	Macerado de mariscos	6,51 ± 5,27	90
AC-11	Agua	1,03 ± 1,53	46
AA-10	Agua	1,24 ± 1,57	60
25-A	Agua	8,24 ± 8,96	83
AM-5	Agua	16,44 ± 9,941	96
46-A	Agua	5,34 ± 6,60	71
53-A	Agua	1,94 ± 2,49	58

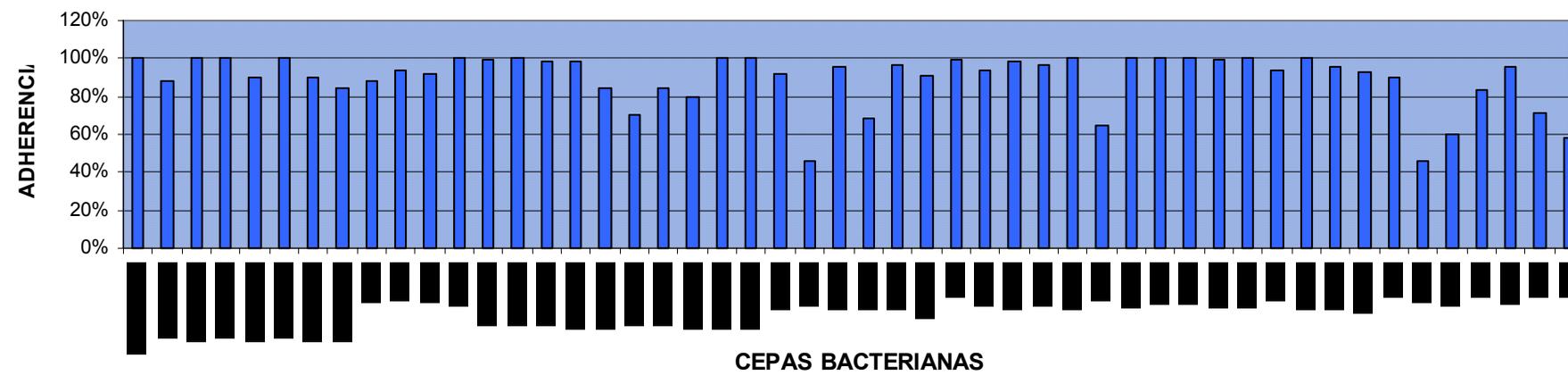


TABLA 3: Capacidad de adherencia expresada en porcentaje, de *Arcobacter butzleri* según origen de la cepa.

Origen de la cepa	Adherencia
Fecas de Bovino	100%
Mariscos	95%
Humano	94%
Fecas de Pelicano	92%
Carcasa de Pollo	89%
Menudencias de Pollo	86%
Agua	69%

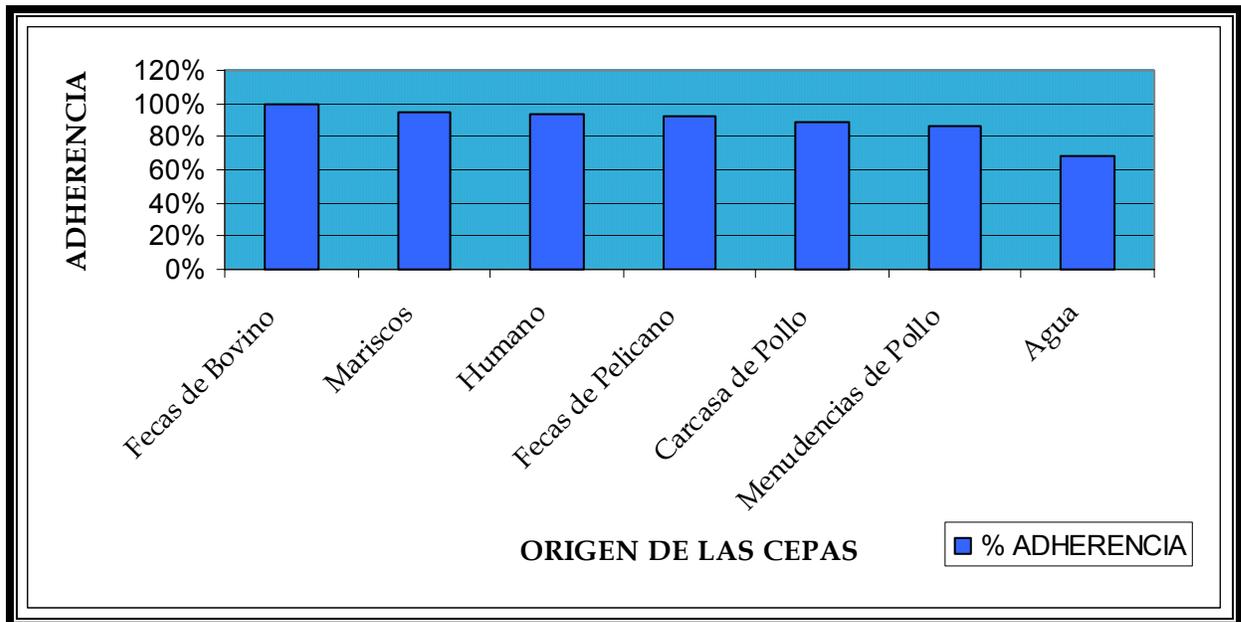


GRÁFICO 2: Resultados de la capacidad de adherencia de *Arcobacter butzleri*, según origen de la cepa.

TABLA 4: Capacidad de adherencia de la cepa AC-11 tras pasajes por peritoneo de ratón.

Número de pasaje cepa AC-11	Adherencia
0	46%
1	51%
2	65%
3	68%
4	67%
5	83%

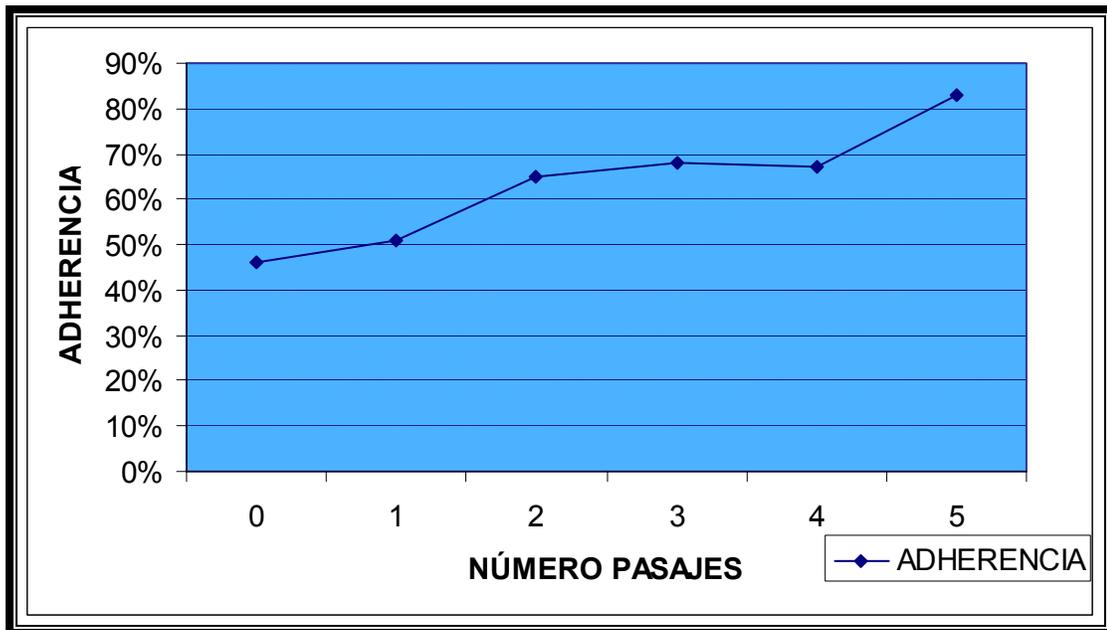


GRÁFICO 3: Resultados de la capacidad de adherencia de la cepa AC-11, tras pasajes por peritoneo de ratón.

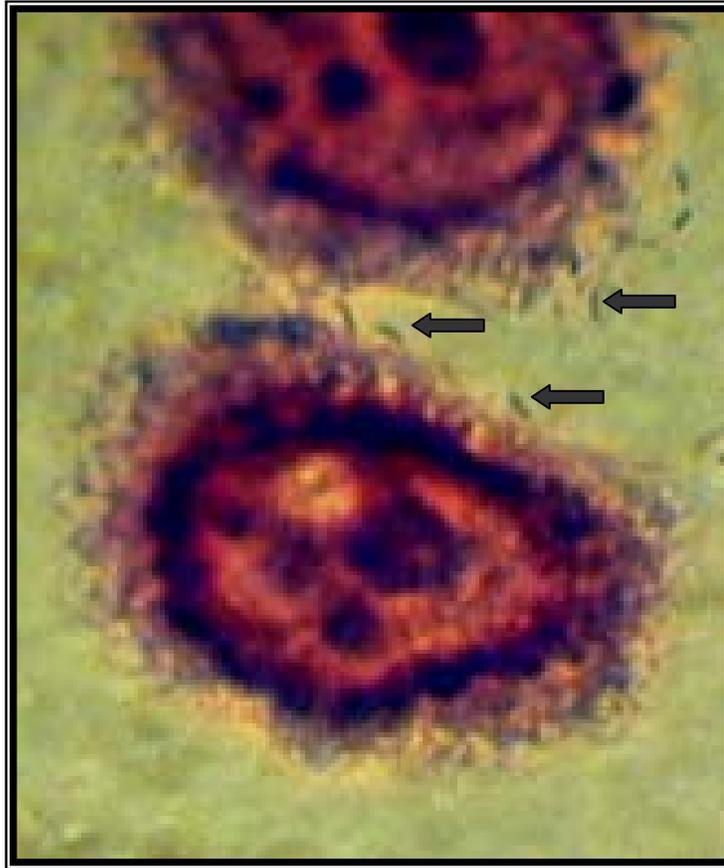


FIGURA 1: Células HEp-2 con *A. butzleri* adheridas a la superficie celular.
Microscopía de contraste de fase (aumento 1250x)

5. DISCUSION

A. butzleri forma parte de una gama de patógenos emergentes y es capaz de causar diversos cuadros clínicos en el hombre, siendo asociado a bacteremias, apendicitis, peritonitis, enteritis y diarrea aguda, además de distintas infecciones y abortos en animales, reconociendo a estos como reservorios y vehículos de transmisión, sin descartar ríos y aguas contaminadas. Es por ello que esta bacteria está ampliamente distribuida, lo que se ejemplifica con los animales mencionados anteriormente y los orígenes de las cepas en estudio.

La escasa información que aun existe sobre *A. butzleri*, nos ha llevado a comparar los resultados con *C. jejuni*, que como ya se ha mencionado, es su pariente filogenético más cercano, además de compartir características de patogénesis, distribución y vías de transmisión.

Estudios realizados por Vandenberg et al. en el año 2004 sugieren, que *A. butzleri* presenta factores clínicos y microbiológicos muy similares a *C. jejuni*. Con respecto a la patogénesis de *Campylobacter*, la infección involucra una complejidad de mecanismos dados principalmente por su capacidad de adherencia mediante el flagelo, su capacidad invasora y la producción de toxinas. Estos factores de virulencia reconocidos en el género *Campylobacter* son parte importante en la aparición del cuadro diarreico lo que sugiere la producción de enterotoxinas. Se plantea, además, que la presencia de sangre en las deposiciones de pacientes con enteritis por *Campylobacter* sp. sugiere la

expresión de un mecanismo invasor donde la adherencia bacteriana a la superficie de la mucosa intestinal pareciera ser el evento inicial en la patogénesis de la infección (Beachey, 1981; Doikoku et al. 1990; Lindblom et al. 1989; Morgan et al. 1985; Morooka et al. 1985; Newel et al. 1984).

Diversos modelos *in vitro* e *in vivo* han sido utilizados para estudiar la capacidad de adherencia de campylobacterias a una gran variedad de líneas celulares, animales de experimentación y embriones de pollo. Así se ha determinado que *C. jejuni* coloniza las células de la mucosa intestinal por medio de un puente que se forma de la interacción entre la bacteria y el mucus, facilitando la posterior invasión intracelular (De Melo y Pachere 1990; Mc Sweegan y Walker 1986; Konkel y Joens 1989; Velasco et al. 2002).

En este estudio se determinó la capacidad de adherencia *in vitro* de cepas *A. butzleri* aislada de distintos orígenes con el fin de aportar antecedentes sobre los mecanismos de patogenicidad de esta bacteria para, eventualmente elaborar estrategias de prevención y disminuir el potencial daño de este patógeno tanto en seres humanos como en animales.

Las 50 cepas estudiadas presentaron capacidad de adherencia. Los porcentajes de adherencia fluctuaron entre un 46 y un 100% y el número de bacterias adheridas por célula fluctuó entre $1,03 \pm 1,53$ y $29,6 \pm 11,2$, correspondiente a una de las cepas de agua y a una de las cepas de bovino respectivamente, lo que se puede observar en la tabla 2.

Al comparar las cepas según su origen, las que presentaron mayor capacidad de adherencia fueron aquellas aisladas de fecas de bovino, cuyos valores fluctuaron desde un 99 a un 100%, seguidas de las cepas de filtrado de mariscos, humanas y de pelícano, las que presentaron cierta uniformidad en los porcentajes de adherencia y cuyos valores corresponden a un 95, 94 y 92% respectivamente. Las cepas aisladas de pollo, ya sea de carcasas o menudencias, también presentaron cierta similitud en los resultados y sus porcentajes de adherencia corresponden a un 89 y un 86% respectivamente. Finalmente, las cepas aisladas de agua presentaron el menor porcentaje de adherencia (69%), que aun siendo bajo, no descarta su capacidad patogénica.

Diversos estudios realizados acerca de la capacidad de adherencia de *C. jejuni* se corresponden con nuestras observaciones. El estudio realizado por Musmanno et al. 1997 en cepas de *A. butzleri* aisladas de agua, revelan su capacidad de adherencia a células Hela, permitiendo inferir que *A. butzleri* presenta capacidad de adherencia a líneas celulares y ocuparía este fenómeno como primer paso de infección, (Andrews, 1992; Konkel y Joens 1989; Lindblom et al. 1989; Naes et al. 1988; Russell y Blake, 1994).

Los resultados obtenidos especialmente con las cepas de origen humano y las aisladas de agua, se corresponden con el trabajo realizado en *C. jejuni* por Newel et al. 1984, donde se establece que las cepas de agua serían menos virulentas que aquellas cepas de *Arcobacter* aisladas de muestras clínicas, por lo que se sugiere que las cepas

ambientales serían menos patógenas. Por lo demás postulan que la presencia de cepas no patógenas en el medio ambiente podría deberse a la alta incidencia de portadores asintomático tanto en animales silvestres como en humanos (Newel et al. 1985).

El estudio realizado por Fauchere et al. (1986), refuerza nuestros altos resultados obtenidos en las cepas de origen humano, en donde se demuestra que las cepas de *Campylobacter* que eran capaces de interactuar con líneas celulares de origen epitelial, eran frecuentemente aisladas de pacientes con fiebre y diarrea, denominándolas cepas asociativas.

Con respecto a los resultados obtenidos tras los pasajes por peritoneo de ratón de la cepas AC-11, que presentó el menor porcentaje de adherencia, es posible inferir que las cepas e *A. butzleri* son capaces de aumentar su capacidad de adherencia luego de ser sometida a pasajes por peritoneo de ratón, al igual como ocurre con *C. jejuni* y *C. coli*, que aumentan sus capacidades patogénicas luego de estos pasajes (Fernández et al. 1999; Fernández et al. 2000).

Como consecuencia de este estudio es posible establecer que *A. butzleri*, independiente de su origen, presenta capacidad de adherencia *in vitro* lo que podría indicar que estas bacterias podrían ocupar este fenómeno como primer paso para desarrollar la infección.

Por lo tanto, es posible suponer que la expresión de la enfermedad o más bien las variaciones que puedan haber entre pacientes sintomáticos o asintomáticos, se van a relacionar con el huésped, la participación de la respuesta inmune y con el origen de la cepa involucrada. Es por eso que es muy importante conocer variables tan importantes como las vías de transmisión de la bacteria y los mecanismos de patogenicidad por los cuales produce la infección, sin descartar los factores que influyan en la presencia o ausencia de la enfermedad en cada portador.

Finalmente, sería necesario que en estudios posteriores se diera énfasis en la participación del flagelo en el fenómeno de la adherencia y el comportamiento de *A. butzleri* frente a otro tipo de líneas celulares, considerando también las bases moleculares que pudieran complementar estos estudios.

5.1 CONCLUSIONES

- *A. butzleri* presenta como eventual mecanismo de patogenicidad la adherencia a células epiteliales.
- *A. butzleri* es capaz de adherirse a células epiteliales HEP-2 independiente del origen de la cepa.
- De las cepas en estudio las cepas de agua presentaron la menor capacidad de adherencia a células epiteliales HEP-2.
- Las cepas aisladas de fecas de bovino presentaron la mayor capacidad de adherencia a células epiteliales HEP-2.
- La cepa AC-11 fue capaz de aumentar su capacidad de adherencia luego de ser sometida a pasajes por peritoneo de ratón, por lo que es posible inducir o aumentar la capacidad de adherencia en *A. butzleri*.

6. LITERATURA CITADA

Anderson, K.F., Kiehlbauch, J.L., Anderson, D.C., Mc Clure, H.M. and Wachsmuth, I.K. (1993) *Arcobacter (Campylobacter) butzleri*-Associated Diarrheal Illnes in a Nonhuman Primate Population. *Infect. Immun.* 61, 2220-2223.

Andrews, E. (1992) Inhibición de la adherencia de *Campylobacter jejuni* a células HEp-2 por anticuerpos monoclonales. Tesis de Magíster en Ciencias con mención en Inmunología y Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile, 81 pp.

Atabay, H. and Corry, J. (1998) Evaluation of a new *Arcobacter* enrichment medium and comparison with two media developed for enrichment of *Campylobacter spp.* *Int. J. Food Microbiol.* 41, 53-58.

Baquero, F. (1987) Adhesividad bacteriana e infección ósea. *Enf. Infect. Microbiol. Clin.* 5, 514-516.

Beachey, E.H. (1981) Bacterial adherence: adhesion receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.* 143, 325-345.

Boer, E., Tilburg, J., Woodward, D., Lior, H. and Johnson, W. (1996) A selective medium for the isolation of *Arcobacter* from meats. *The society for applied bacteriology, letters in applied microbiology.* 23, 64-66.

Bordreau, M., Higgins, R., Mital, R. (1991) Biochemical and serological characterization of *Campylobacter cryaerophila*. J. Clin. Microbiol. 29, 54-58.

De Melo, M. and Pechere, J.C. (1990) Identification of *Campylobacter jejuni* surface protein that bind to eukaryotic cell in vitro. Infect Immun. 58, 1749-1756.

Doikoku, T., Kaweguchi, M., Takanana, K. and Suzuki, S. (1990) Partial purification and characterization of the enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni*. Infect. Immun. 58, 2414-2419.

Ellis, W.A., Neil, S.D., O'Brien, J.J., Ferguson, H.W. and Hanna, J. (1977) Isolation of *Spirillum/Vibrio*-like organisms from bovine fetuses, Vet Rec. 100, 451-452.

Fauchere, J., Rosenau, A., Veron, M., Moyon, E., Richard, S. and Pfister, A. (1986) Association with Hela cells of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter Coli* isolated from human feces. Infect. Immun. 54, 283-287.

Fernández, H., Eller, G., Paillacar, J., Gajardo, T. and Riquelme, A. (1995) Toxigenic and Invasive Capacities: Possible Pathogenic Mechanisms in *Arcobacter cryaerophilus*. Men Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 90, 633-634.

Fernández, H., Lobos, M. and Concha, M. (1999) Inducing Enterotoxigenic Properties in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by Serial Peritoneal Passage in Mice. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 94, 101-102.

Fernández, H., Rojas, X. and Gajardo, T. (1995) Primer aislamiento de *Campylobacter cryaerophilus* a partir de un aborto bovino en Chile. Arch. Med. Vet., XXVII N° 2, 111-114.

Fernández, H., Vivanco, T. and Eller, G. (2000) Expresión of Invasiveness of *Campylobacter jejuni* ssp. *Jejuni* after Serial Intraperitoneal Passages in Mice. J. Vet. Med. 47, 635-639.

Fernández, H., Zaror, L., Wilson, M., Otth, L. and Tejeredo, A. (2000) Manual de Laboratorio 2000. Microbiología Sistemática y Clínica. Universidad Austral de Chile. Familia *Campylobacteraceae* y género *Helicobacter*. 35-40 pp.

Grant, C.C., Konkel, M.E., Cieplak, W. and Tompkins, L.S. (1993) Role of flagella in adherence, internalization, and translocation of *Campylobacter jejuni* in nonpolarized and polarized epithelial cell cultures. Infect. Immun. 61, 1764-1771.

Jacob, J., Woodward, D., Feurpfeil, I. and Johnson, W.M. (1998) Isolation of *Arcobacter butzleri* in Raw Water and Drinking Water Treatment Plants in Germany. J. Hyg Umweltmed. 20, 189-198.

Konkel, M., Babakhani, F. and Lynn, A. (1990) Invasion-related antigens of *Campylobacter jejuni*. J. Infect. Dis. 162, 888-895.

Konkel, M.E. and Joens, L.A. (1989) Adhesion to and invasion of HEP-2 Cells by *Campylobacter* sp. Infect. Immun. 57, 2984-2990.

Lee, A., O'Rourke, J.L., Barrington, P.J. and Trust, T.J. (1986) Mucus colonization as a determinant of pathogenicity in intestinal infection by *Campylobacter jejuni* a: mouse cecal Model. Infect. Immun. 51, 536-546.

Lerner, J., Brumberg, V. and Preac-Mursic, V. (1994) Several diarrhea associated whit *Arcobacter butzleri*. Eur. J. Clin Microbiol. Dis. 13, 660-662.

Lindblom, C.B., Cervantes, L.E., Sjogren, E., Kaijser, B. and Ruiz-Palacios, G.M. (1989) Adherence enterotoxigenicity, invasiveness and serogroup characteristics for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from adult patients with acute enterocolitis. En G.M. Ruiz-Palacios, E. Calva and B.R. Ruiz Palacios (Eds.) *Campylobacter* V. Proceeding of the fifth Internacional Workshop on *Campylobacter* infections. 199-201 pp.

Logan, E. F., Neil, S.D. and Mackie, D. P. (1982) Mastitis in dairy cows associated whit an aerotolerant *Campylobacter*. Vet. Rec. 110, 229-230.

Maciel, M.C. (1996) Methods to assess bacterial interaction whit cultured mammalian cells. *Rev. Microbiol.* 27, 143-149.

Mansfield, L.P. and Forsythe, S.J. (2000) *Arcobacter butzleri*, *A. skirrowii* and *A. cryaerophilus*- potential emerging Human Pathogens. *Rev. Med. Microbiol.* 11, 161-170.

Mc Sweegan, E. and Walker, R. (1986) Identification and Characterization of Two *Campylobacter jejuni* adhesions for Cellular and Mucous Substrates. *Infect. Immun.* 53,141-148.

Morgan, G. (1985) *Campylobacter jejuni*, mastitis in cow. A. Zoonosis related incident. *The Veterinary Record.* 116-119 pp.

Morooka, T., Umeda, A. and Amako, K. (1985) Motility as an intestinal colonization factor for *Campylobacter jejuni*. *J. Gen. Microbiol.* 131, 1973-1980.

Musmanno, R., Russi, M., Lior. H. and Figura, N. (1997) In vitro virulence factors of *Arcobacter butzleri* strains isolated from superficial water samples. *New Microbiol.* 20, 63-68.

Nachamkim, I. and Blaser, M. (2000) *Campylobacter*. 2^a Ed. ASM Press, Washington D.C. 3-18 pp.

Naess, V., Johannessen, A. and Hofstad, T. (1988) Adherence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* to porcine intestinal brush border membranes. APMIS 96: 681-687.

Neil, S.D., Campbell, J.N., O'Brien, J.J., Weatherup, S.T. and Ellis, W.A. (1985) Taxonomic position of *Campylobacter cryaerophila* sp. Nov., Int. J. Syst. Bacteriol. 35, 342-356.

Neil, S.D., Ellis, W.A. and O'Brien, J.J. (1978) Bioquimical characteristic of *Campylobacter like organisms* from cattle and pigs, Res.Vet.Sci. 25, 368-372.

Newel, D.G., Mc Bride, H. and Dolby, J.M. (1985) Investigations on the role of flagella in the colonization of infant mice with *Campylobacter jejuni* and attachment of *campylobacter jejuni* to human epithelial cell ill. J. Hyg. Camb. 95, 217-227.

Newel, A., Mc Bride, H. and Pearson, D. (1984) The identification of outer membrane protein and flagella of *Campylobacter jejuni*. J. Gen. Microbiol. 130, 1201-1208.

Newel, A. and Pearson, D. (1985) The invasion of epithelial cell lines and the intestine epithelium of infant mice by *Campylobacter jejuni/coli*. J. Diar. Dis. Res. 2, 19- 26.

On, S.L.W., Jensen, T.K., Hansen, V.B., Jorsal, S.E. and Vandamme, P. (2002) Prevalence and diversity of *Arcobacter* ssp. Isolated from the internal organs of spontaneous porcine abortion in Denmark. *Vet. Microbiol.* 85, 159-167.

On, S.L.W., Stacey, A. and Smyth, J. (1995) Isolation of *Arcobacter butzleri* a neonate With bacteraemia. *J. infect.* 31, 225-227.

Pascual, A. (1987) Adherencia bacteriana. *Enf. Infec. y Microbiol. Clin.* 5, 67-70.

Russell, R. G. And Blake, D.C. (1994) Cell Association Invasion of Caco-2 Cells by *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 62, 3773-3779.

Tee, W., Baid, R., Dyll-Smith, M. and Dwyer, B. (1988) *Campylobacter cryaerophila* Isolated from a Human. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2469-2473.

Vandamme, P. and De Ley, J. (1991) Proposal for a New Family, *Campylobacteraceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 451-455.

Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Sergers, P., Tytgat, R. and De Ley, J. (1991) Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter* and *Wolinella* Taxonomy: Emendation of Generic Description and Proposal of *Arcobacter*. *Gen Nov. Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 88-103.

Vandamme, P., Vancanneyr, M., Pot, B., Mels, L., Hoste, B., Deweittink, D., Vlaes, L., Van Den Borre, C., Higgins, R., Ghommez, K., Kertters, K., Butzler, J.P. and Goosens, H. (1992) Polyphasic Taxonomy Study of the Emended Genus *Arcobacter Skirrowii* sp. Nov., an Aerotolerant Bacterium Isolated from Veterinary Specimens. Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 344-356.

Vandenberg, O., Dediste, A., Houf, K., Ibekwem, S., Cadranel, S., Douat, N., Zissis, G., Butzler, J. and Vandamme, P. (2004) *Arcobacter* Species in Humans. Emerg. Infect. Dis. 10, 1863-1867.

Velasco, J., Vizcaya, L., Nieves, B. and Pérez, I. (2002) Thermophilic *Campylobacter* species adherence and invasion in HEp-2 cells. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 22.

Villarruel, A., Márquez, M., Garay, L., Zepeda, H., Castillo, A., Mota, L., Murano, E. and Torres, R. (2003) Isolation of *Arcobacter butzleri* ssp. from Retail Meats and Cytotoxic Effects of Isolated against Vero Cells. J. Food Protect. 66, 1374-1378.

Yan, J.J., Ko, W.C., Huang, A.H., Chem, Y.T. and Wu, J.J. (2000) *Arcobacter butzleri* bacteremia in a patient with liver cirrhosis. J. Formosa Med. Assoc. 99, 166-169.

Wibo, I., Breinaert, J. and Lauwer, S. (2004) Isolation of *Arcobacter skirrowii* from a patient with Chronic Diarrhea. J. Clin. Microbiol. 42, 1851-1852.

Zenetti, F., Varoli, O., Stampi, S. and De Luca, G. (1996) Prevalence of thermophilic *Campylobacter* and *Arcobacter butzleri* in food of animal origin. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 315-321.

ANEXO

Medios De Cultivo Y Soluciones De Trabajo

AGAR SANGRE

Preparación para 1000 ml:

Base agar bacteriológico	43 g
Extracto de levadura 1%	15 g
Sangre	50 ml
Agua destilada	950 ml

Una vez disuelto el agar base en agua destilada, fue esterilizado en autoclave (121°C por 15min) y se dejó enfriar hasta una temperatura promedio de 40°C para posteriormente adicionar los 50 ml de sangre. Finalmente fue alicuatado en placas petri.

CALDO TIOGLICOLATO

Preparación para 1000 ml:

Base caldo OXOID	29 g
Agua destilada	1000 ml

Una vez disuelto el caldo base en agua destilada, fue alicuatado en tubos de ensayo, para posteriormente ser esterilizado en autoclave por 15 min a 121°C.

BUFFER FOSFATO SALINO (PBS)

Preparación para 1000 ml

Fosfato disódico dodecahidratado	29 g
Fosfatomonopotásico	0,2 g
Cloruro de sodio	8,0 g
Agua destilada	1000 ml

Una vez preparada la solución fue esterilizado en autoclave por 15 min a 121°C. Luego se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura aproximada a los 25°C para medir el pH de la solución, el que debió ser de 7,4.

MEDIO HOUF

Preparación para 1000 ml:

Agar <i>Arcobacter</i>	36 mg
Sangre	50 ml
Mezcla antibiotica:	
Anfotericina B	10 mg
Cefoperazona	16 mg
5-Fluoracil	100 mg
Novobiocina	32 mg
Trimetoprim	64 mg
Agua destilada	950 ml

Una vez disuelto el agar base en agua destilada, se lleva a ebullición para ser esterilizado en autoclave por 15 min a 121° C, posteriormente se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura promedio de 40° C, para adicionar la sangre y la mezcla antibiótica. Finalmente fue alicuatado en placas petri.