



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

Dr. Heriberto Fernández J.

Instituto de Microbiología Clínica

Facultad de Medicina

Profesor Co-Patrocinante

Dra. Inés Vega R.

Instituto de Hematología

Facultad de Medicina

**ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS MÉTODOS DE
GENOTIPIFICACIÓN PARA *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*
y *Arcobacter skirrowii* AISLADOS DE DIVERSOS RESERVORIOS
BIOLÓGICOS**

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y Título
Profesional de *Bioquímico*

INGRID ANICIA MANSILLA CARRASCO

VALDIVIA – CHILE

2006

*A mis padres Haydeé y José, por estar siempre
conmigo, enseñarme su fortaleza y amor en la vida.....
A mis hermanos Catherine y José, por su generosidad y cariño...*

AGRADECIMIENTOS.

Mis primeras palabras de agradecimiento son para mi familia, en especial a mis padres, por su cariño incondicional, consejos oportunos y por instarme a seguir siempre adelante, a mis hermanos por su preocupación y ayuda, a mi tío Pedro por su apoyo y cariño.

Al Dr. Heriberto Fernández por permitirme ser parte de su grupo de investigación, por confiar en mí, guiarme y apoyarme en esta importante etapa de mi formación profesional.

A la Dra. Inés Vega por su apoyo y tiempo en la realización de este proyecto.

A la Dra. Carola Otth por sus consejos, apoyo y disponibilidad durante la realización de esta tesis.

A mis amigos y compañeros de laboratorio les agradezco por su amistad, alegría y por el excelente trabajo en equipo, Maria Paz V., Mario G., Luis Ruiz, Gustavo M., Luis Collado, Fadua L., Patricio M., Maryoris, Cristian del Campo y Miguel. Gracias en especial a Sra. Paty, Sra. Isolde y Don Panchito por ayudarme cuando lo necesité, y también a todo el personal docente por su acogida en el Instituto.

A Carla y Silvana Achiardi por su amistad constante a pesar de la distancia.

A la familia Guarderas Zurita, quienes me han acogido como parte suya, gracias por su cariño y amistad.

A mis compañeros de carrera quienes me acompañaron durante estos últimos años Ingrid O., Andrea V., Paula S., Ariel M., Adriana B. y Susan M.

Esta tesis fue financiada por el proyecto Fondecyt 1030245.

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS.....	i
INDICE DE FIGURAS.....	iii
INDICE DE TABLAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
1. RESUMEN.....	1
1.1 SUMMARY.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 Hipótesis de Trabajo.....	7
2.2 Objetivo General.....	8
2.3 Objetivos Específicos.....	8
3. MATERIAL Y MÉTODO.....	9
3.1 Materiales.....	9
3.1.1 Reactivos.....	9
3.1.2 Equipos y otros.....	11
3.1.3 Materiales Biológicos.....	11
3.1.3.1 Cepas Bacterianas.....	13
3.1.4 Oligonucleótidos.....	13
3.2 MÉTODO.....	13
3.2.1 Recuperación de cepas e identificación presuntiva.....	13
3.2.2 Extracción de DNA genómico bacteriano.....	17
3.2.3 Cuantificación y pureza de DNA.....	17

3.2.4 Condiciones de m- PCR.....	18
3.2.5 m- PCR directo para colonia bacteriana.....	18
3.2.6 Fraccionamiento de DNA en geles de agarosa.....	20
3.2.7 Ensayo de Movilidad del Heteroduplex (HMA).....	22
3.2.7.1 Estrategia para subtipificar.....	22
3.2.7.2 Preparación de DNA homoduplex y heteroduplex.....	22
3.2.7.3 Fraccionamiento de DNA en geles de acrilamida.....	24
4. RESULTADOS.....	27
4.1 Especificidad de los partidores en el m- PCR.....	27
4.1.1 Sensibilidad de m- PCR para cepas de <i>Arcobacter</i> de diversos reservorios biológicos.....	27
4.1.1.1 Efecto de Inhibidores provenientes del medio de cultivo en el m- PCR.....	27
4.1.1.2 Frecuencia de aislamiento de especies de <i>Arcobacter</i> en diversos reservorios biológicos.....	30
4.1.2. Colonia bacteriana utilizada directamente en m- PCR.....	34
4.1.3 Estudio de variabilidad génica HMA.....	34
5. DISCUSIÓN.....	39
6. ANEXO.....	43
7. BIBLIOGRAFÍA.....	46

INDICE DE FIGURAS

Figura Nº 1. Morfología de <i>Arcobacter</i> en microscopía de barrido.....	16
Figura Nº 2. Esquema de formación del Heteroduplex de DNA.....	23
Figura Nº 3. m-PCR para cepas de referencia.....	29
Figura Nº 4. Dilución del inhibidor de m- PCR.....	31
Figura Nº 5. m-PCR para cepas de <i>Arcobacter</i> sembradas en medio agar Müller Hinton.....	32
Figura Nº 6. Frecuencia de aislamiento de <i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i> y de la mezcla de ambas especies en diversos reservorios biológicos.....	35
Figura Nº 7. Prevalencia de las especies de <i>Arcobacter</i> del total de las cepas aisladas de diversos reservorios biológicos.....	36
Figura Nº 8. m-PCR utilizando directamente colonias bacterianas.....	37
Figura Nº 9. Estudio de HMA.....	38

INDICE DE TABLAS

Tabla Nº 1. Fuente de origen y número de cepas sospechosas de <i>Arcobacter</i> analizadas por m-PCR.....	12
Tabla Nº 2. Partidores específicos para identificar por m-PCR las especies <i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i> y <i>A. skirrowii</i>	14
Tabla Nº 3. Características de los partidores.....	15
Tabla Nº 4. Fuente de origen y número de cepas de <i>A. butzleri</i> y <i>A. cryaerophilus</i> analizadas por m-PCR directo de colonia bacteriana.....	19
Tabla Nº 5. Mezcla de reacción de m-PCR para analizar una muestra (1X).....	21
Tabla Nº 6. Mezcla para el ensayo HMA.....	25
Tabla Nº 7. Fuente de origen y número de cepas de <i>A. butzleri</i> analizadas por HMA.....	26
Tabla Nº 8. Cepas de referencia con su producto específico de amplificación.....	28
Tabla Nº 9. Número de cepas y frecuencia de aislamiento de <i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i> y la mezcla de ambas dependiendo de su reservorio biológico.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

ASB	caldo de enriquecimiento selectivo para <i>Arcobacter</i>
CAT	cefaperazona, anfotericina y teicoplanina
DEPC	dietil pirocarbonato
dNTP	desoxirribonucleótido trifosfato
DO	densidad óptica
EDTA	ácido etiléndiamino tetracético
EtBr	bromuro de etidio
HAB	tampón de alineamiento del heteroduplex
HIV-1	Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1
HMA	Ensayo de Movilidad del Heteroduplex
m-PCR	múltiple reacción de la polimerasa en cadena
n	número de muestras
pb	pares de bases
RFLP	Polimorfismo del largo de fragmento de restricción
rpm	revoluciones por minuto
TBE	Tris-Borato- EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
ufc	unidad formadora de colonias
UNAIDS	Naciones unidas para el trabajo en el programa de HIV- SIDA
UV	Ultra- violeta
V	Volt

1. RESUMEN

El género *Arcobacter* (Superfamilia VI de rRNA de Proteobacteria) presenta tres especies de importancia clínica para el hombre. *A. butzleri* y *A. cryaerophilus*, han sido identificados como agentes de bacteremia y diarrea en el ser humano. La especie *A. skirrowii* ha sido aislada recientemente de diarrea humana.

Se compara por multiplex PCR un método de extracción de DNA basado en la lisis bacteriana por calor descrito por Houf y el método propuesto en este trabajo utilizando directamente la colonia bacteriana en la reacción de amplificación, sin necesidad de extracción previa de DNA.

También se estudió la eventual variabilidad génica de las cepas utilizadas.

Fueron analizadas 241 cepas sospechosas de *Arcobacter* aisladas de muestras alimentarias de origen aviar, filtrado de mariscos bivalvos y fecas de ganado bovino y porcino, las cuales se les extrajo el DNA. El 82% de cepas analizadas correspondieron a *A. butzleri*, 10% a *A. cryaerophilus* y 8% a la mezcla de ambas especies. No fue detectada la presencia de *A. skirrowii*.

Del total de cepas identificadas, 60 se volvieron a analizar mediante amplificación directa partir de la colonia, encontrándose un 100% de concordancia en los resultados obtenidos por ambos métodos.

Este método permitiría identificar en forma rápida y a bajo costo los reservorios y rutas de transmisión de estos patógenos emergentes.

El ensayo de HMA no reveló variabilidad génica entre las cepas estudiadas.

1.1 SUMMARY

Genus *Arcobacter*, belonging to the RNA Superfamily VI of Protobacteria, has three species of clinical importance for human beings. *A. butzleri* and *A. cryaerophilus* have been isolated from bacteremia and diarrhea. *A. skirrowii* was isolated recently from a case of diarrhea.

Two DNA extraction methods were compared by multiplex PCR. One of them based on Houf's method and the other one proposed by us using directly the bacterial colony in amplification reaction without needing previous DNA extraction.

The eventual genetic variability of the strains assayed was also studied.

A total of 241 *Arcobacter* suspected strains isolated from avian alimentary products, shellfish filtrates and bovine and porcine fecal material were assayed by Houf's method. From the, 82% corresponded to *A. butzleri*, 10% to *A. cryaerophilus* and 8% to a mixture of both species. *A. skirrowii* was not found.

From all the identified strains, 60 were randomly selected and reanalyzed with the colony direct amplification method obtaining a 100% of concordance when compared with Houf's method.

The colony direct amplification method could allow to identify quickly and at low cost the reservoirs and transmission routes of these emerging pathogens.

The HMA assay did not reveal genetic variability among the strains under study.

2. INTRODUCCIÓN

El género *Arcobacter* (del latín *arcus*: arco, del griego *bacter*: bacteria), pertenece a la División *Gracillicutes*, Superfamilia VI de rRNA de la *Proteobacteria*, Familia *Campylobacteraceae* (Vandamme et al., 1992). Este género comprende cuatro especies: *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, *Arcobacter skirrowii* y *Arcobacter nitrofigilis* (Vandamme et al., 1991; De Oliveira et al., 1999; Johnson et al., 1999; Fernández et al., 2000; Hilton et al., 2000; Houf et al., 2000; Houf et al., 2001; Otth et al., 2001; On et al., 2000; Phillips et al., 2001; Fera et al., 2003).

Arcobacter fue aislado por primera vez en 1977 por Ellis y col. como “*Vibrio/spirillum* organisms”, a partir de fetos bovinos abortados. Luego se consideraron como “*Campylobacter* aerotolerantes” por su capacidad de crecer en presencia de oxígeno y por sus semejanzas fenotípicas y genotípicas con el género *Campylobacter* (Nelly et al 1979 y 1985; On et al., 2001). Más tarde, se realizaron estudios de hibridación de DNA-RNA, los que permitieron comprobar que no existe relación genotípica con *Campylobacter* y se propone, en 1991, el nuevo género *Arcobacter* para este grupo de bacterias (Johnson et al., 1999; Hilton et al., 2000; De Oliveira et al., 2001; Houf et al., 2001 y 2000; On et al., 2002).

Este género se caracteriza por presentar bacilos Gram negativos de morfología curva, helicoidal o en forma de S itálica, no esporulados. Su tamaño fluctúa entre 0,2 a 0,9 μm de ancho y de 1 a 3 μm de largo. Son móviles por flagelación monótrica o anfítrica, que les proporciona un movimiento característico con giros rápidos sobre su propio eje, descrito en forma de sacacorchos. Su aislamiento primario requiere de condiciones de microaerofilia, su temperatura óptima de crecimiento es de 30°C en

aerobiosis, aunque son capaces de crecer en un rango de temperatura entre 15°C a los 37°C, lo que los diferencia del género *Campylobacter* que sólo crecen en microaerofilia. Presentan metabolismo quimiorganotrófico, no utilizan hidratos de carbono obteniendo su energía de aminoácidos o intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Son oxidasa positiva y catalasa positiva o variable e hidrolizan indoxil acetato (Tee et al., 1988; Boudreau et al., 1991; De Oliveira et al., 1997; De Oliveira et al., 1999; Johnson et al., 1999; Fernández et al., 2000 ; González et al., 2001; On et al., 2001; Phillips et al., 2001 ; Rodriguez et al., 2001; Golla et al., 2002; Eifert et al., 2003; Fera et al., 2003; Van Driessche et al., 2003).

A. butzleri se encuentra infectando ganado habiendo sido aislado de fetos ovinos y porcinos, de alimentos de origen animal y de agua, como también de bacteremia, endocarditis, apendicitis, peritonitis y cuadros de diarrea en el ser humano.

A. cryaerophilus ha sido aislado de carcasas de pollo, de fetos abortados de bovinos, porcinos y ovinos, como también de mastitis en ganado y en cuadros diarreicos de pacientes humanos.

A. skirrowii ha sido aislado de fluido preputial de toro, de deposiciones y fetos abortados de ganado. Recientemente se aisló de un paciente con diarrea crónica.

A. nitrofigilis es una bacteria fijadora de nitrógeno, asociada a raíces de *Spartina alterniflora*, una planta de pantanos salinos. No existen antecedentes que la relacionen con animales o infecciones humanas (Neill, S.D. et al., 1978; Boudreau, M. et al., 1991; Anderson, K.F. et al., 1993; De Oliveira, S.J. et al., 1997; Hsueh, P et al., 1997; Manke, T.R. et al., 1998; De Oliveira, S.J. et al., 1999; Johnson, L.G. et al., 1999; Engberg, J. et al., 2000; Fernández, H. et al., 2000; Hilton, C. et al., 2000; Wesley, I.V. et al., 2000; De

Oliveira, S.J. et al., 2001; Houf, K. et al., 2001; Assanta, M.A. et al., 2002; On, S.L.W. et al., 2002; De Oliveira, S.J. et al., 2003; Eifert, J.D. et al., 2003; Moreno, Y. et al., 2003; Wybo, I. et al., 2004).

El hábitat de este género es variado, reconociéndose como reservorios biológicos animales domésticos, ganado (porcino, ovino, bovino y equino), aves de corral (pollo, gallina y pavo) y salvajes, de donde se ha aislado de órganos reproductores, de fetos abortados y deposiciones. También han sido encontrados en raíces de plantas, en reservas de aguas, alcantarillados, ductos de agua potable y en mariscos filtradores. La vía de transmisión al ser humano es fecal oral, por medio de la ingesta de carnes crudas o insuficientemente cocidas, leche sin tratamiento de pasteurización, aguas y mariscos contaminados, provocando cuadros de diarrea (Absolom et al., 1983; Boer, et al., 1996., Atabay et al., 1998; Johnson, L.G. 1999; Phillips Ca 1999; González, I.2001; Houf, K. 2001; Golla, S.C. 2002; Houf, K. 2002; Moreno, Y.; 2003; Eifert, J.D. 2003; Villarruel-López, A. 2003).

Para *A. butzleri* se demostró la presencia de citotoxinas y factores de distensión citoletal en cepas aisladas de agua de ríos (Figura et al., 1993; Musmanno et al., 1997). Se ha observado adherencia al intestino y a líneas celulares como CHO y Vero. El mecanismo de patogenicidad por invasión fue estudiado por Fernández et al., 1995 y Wesley et al., 2000. Además de este mecanismo, *A. butzleri* muestra también actividad alfa hemolítica en varios tipos de sangre (Tsang et al., 1996).

En los últimos años se han introducido métodos diagnósticos basados en biología molecular, PCR y multiplex PCR para la identificación de las especies de *Arcobacter* en pollo, cerdos y aguas residuales entre otros. Estos ensayos moleculares

son más rápidos que los métodos de identificación convencional y tienen una alta especificidad (Bastijns et al., 1995; Harmon et al., 1996; Harmon et al 1997; Hurtado et al., 1997; Gonzalez et al., 2000; Houf et al., 2000; Houf et al., 2002; Oliveira et al., 2003).

Kiehlbauch y col. (1991) y Vandame y col. (1992) encontraron, por medio de hibridación DNA- DNA, que existían dos subgrupos de *A. cryaerophilus*.

Estudios de polimorfismo del largo de fragmento de restricción (RFLP) han sido utilizados para la identificación de *Arcobacter spp.* en seres humanos, agua y ganado; además se ha verificado la diseminación de esta bacteria en niños de edad escolar (Kiehlbauch et al., 1991; Vandamme et al ., 1993; Wesley et al., 1995; Schroeder-Tucker et al., 1996; Oliveira et al., 1997; Rice et al., 1998).

Harmon y col., en 1996, realizaron multiplex PCR para la identificación del género *Arcobacter*, y la diferenciación de *A. butzleri* de otras especies del mismo género. Woo y col., en 2001, identificaron *A. cryaerophilus* en una víctima de accidente de tránsito con bacteremia, por medio de estudios de secuenciación del gen que codifica para rRNA 16S de esta especie.

Houf y col., en 2000, identificaron simultáneamente *A. butzleri*, *A. skirrowii* y *A. cryaerophilus* por medio de un ensayo de multiplex PCR, utilizando partidores que flanquean los genes que codifican para el rRNA 16S y 23S, de cepas provenientes de muestras de piel y carne de pollo, y aisladas de caldo de enriquecimiento selectivo para *Arcobacter* (ASB) (Boer et al. 1996) con CAT (cefaperazona, anfotericina y teicoplanina).

En este trabajo identificamos por m-PCR cepas de *Arcobacter* provenientes de diversos orígenes biológicos, muestras alimentarias de origen aviar, filtrado de mariscos bivalvos y fecas de ganado bovino y porcino, utilizando el método descrito por Houf y col. (2000). Además, proponemos para ésta técnica una modificación, que consiste en utilizar directamente la colonia bacteriana en la reacción de amplificación, sin necesidad de extracción previa de DNA.

Para el estudio de subtipificación de especies se ha descrito el ensayo de movilidad del heteroduplex (HMA). Este es un método que se ha introducido en UNAIDS, para monitorear la distribución de los distintos subtipos de HIV, proporcionando la prevalencia de los subtipos de HIV-1 como también el de los recombinantes (Delwart et al., 1993).

En nuestro estudio se utilizó el ensayo HMA para establecer si existen diferentes subtipos dentro de la especie *A. butzleri*, con la posibilidad de observar variabilidad genética en la secuencia amplificada por m-PCR. Esta variabilidad estaría dada por distorsiones estructurales del DNA, causada por la sustitución de bases o por inserciones o por deleciones en la secuencia de estudio.

Con relación a los aspectos epidemiológicos de este grupo bacteriano, la bibliografía disponible es escasa, más aun en países en vías de desarrollo, donde prácticamente no existe información y la existente es fragmentaria.

2.1 Hipótesis de Trabajo.

Las especies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* tienen como reservorios biológicos alimentos de origen aviar, filtrado de mariscos bivalvos y fecas de ganado

bovino, porcino y aviar, los que representan posibles rutas de transmisión de infecciones intestinales para el ser humano

2.2 Objetivo General.

Identificar las especies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* por m-PCR aisladas de diversos reservorios biológicos.

2.3 Objetivos Específicos.

- Estandarizar el ensayo m-PCR para la detección e identificación de las especies de género *Arcobacter* aisladas de diversos reservorios.
- Detectar e identificar las especies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* por m-PCR a partir de cultivos sospechosos de *Arcobacter* aislados de muestras alimentarias de origen aviar, de filtrado de mariscos bivalvos y de fecas de ganado bovino y porcino.
- Establecer la frecuencia de aislamiento por especie, en los reservorios biológicos que son fuentes de infección en el hombre.
- Comparar, por m-PCR, el método de extracción de DNA por lisis bacteriana y el propuesto en este trabajo, utilizando la colonia sospechosa directamente en la reacción de amplificación.
- Subtipificar *A. butzleri* proveniente de diversos reservorios, detectando variabilidad génica en la secuencia amplificada por medio de HMA.

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Materiales.

3.1.1 Reactivos.

OXOID

5- fluoracil

Agar Base bacteriológico (agar N°1) LP001

Anfotericina B

Caldo *Arcobacter* CM965

Caldo tioglicolato

Cefoperazona

Extracto de levadura L21

Müller Hinton CM0337

Novobiocina

Trimetroprim

Gibco BRL

Agarosa N° catálogo 15510019

Agua destilada libre de ADNasa y ARNasa. N° catálogo 00750024

Buffer de carga Blue Juice gel 10X. N° catálogo 10816015

Tampón Tris Borato EDTA (TBE) 10X. N° de catálogo 15581044

Invitrogen:

DNA Polimerasa Taq 5U/ul. N° catálogo 18038042

Marcador de peso molecular de DNA 100pb 1ug/ul. N° de catálogo 15628-019

Sigma

EtBr N° de catálogo M2128

Winkler W & Z

Ácido Acético Glacial N° de catálogo AC-0030

Acrilamida N° de catálogo BM- 0070

Bis- acrilamida N° de catálogo BM- 0280

EDTA N° de catálogo BM- 068

Formaldehído 37% N° de catálogo BM- 0780

HCL N° de catálogo AC-0202

NaCl N° de catálogo 105300

Nitrato de Plata N° de catálogo PL-1170

Persulfato de Amonio N° de catálogo BM- 0250

Temed N° de catálogo BM-1970

Tris ($C_4H_{11}NO_3$) N° de catálogo BM- 2000

Merck

NaOH N° de catálogo 6498

TCL

Etanol 90°.

3.1.2 Equipos y otros

Cámara electroforesis Horizon 58 Life Technologies

Espectrofotómetro Shimadzu UV-1203

Fuente de poder Life Technologies model 250

Microcentrífuga Cientec Hermle Z233MK

Minicentrífuga Spectrafuge mini Labnet C1301

Termoblock accu block digital dry bath Labnet

Termociclador mini cycler MJ Research

Transiluminador UV Vilber Lourmat

3.1.3 Materiales Biológicos:

3.1.3.1 Cepas Bacterianas

Las cepas de referencia de *Arcobacter* fueron obtenidas de la Colección Bacteriana BCCM/LMG de la Universidad de Ghent (Ghent, Bélgica).

Las 241 cepas a identificar fueron aisladas en el Instituto de Microbiología Clínica a partir de muestras de origen aviar para consumo humano, filtrado de mariscos bivalvos y fecas de ganado bovino y porcino, que se encuentran formando parte de la colección del Instituto, mantenidas a -30°C en leche esterilizada, a continuación se detalla la fuente de origen y número de cepas sospechosas de *Arcobacter* analizadas por m-PCR en la Tabla N° 1.

Tabla N° 1. Fuente de origen y número de cepas sospechosas de *Arcobacter* analizadas por m-PCR

Fuente de origen	Número de cepas
Fecas de porcino	80
Fecas de bovino	28
Filtrado de mariscos	5
Carne de pollo	95
Estómago muscular de pollo	8
Hígado de pollo	19
Fecas de gallina	5
TOTAL	241

3.1.4 Oligonucleótidos

En las Tabla N° 2 y 3 se describe la secuencia y las características de los 5 partidores que se utilizarán para el m-PCR: ARCO, BUTZ, SKIR, CRY1 y CRY2, basados en las secuencias de los genes rRNA 16S Y 23S publicadas en Genbank.

3.2 MÉTODO

3.2.1 Recuperación de cepas e identificación presuntiva.

Las cepas sospechosas de *Arcobacter* identificadas previamente por batería de pruebas bioquímicas fueron descongeladas para, luego, ser sembradas en medio Houf e incubadas por 48 horas a 26°C en condiciones microaeróbicas con 80% de evacuación de la atmósfera normal e introduciendo una mezcla de gases (8% CO₂, 8% H₂ y 84% N₂) al interior de la jarra.

Las colonias sospechosas presentan un tamaño de alrededor de 1 mm de diámetro, siendo translúcidas, lisas, convexas, de contorno regular y de aspecto húmedo. Se verificó la pureza de las cepas bacterianas por medio de tinción de Gram, corroborando microscópicamente la morfología típica de bacilos Gram negativos curvos o en S itálica. La motilidad en “sacacorchos” se observó por microscopía de contraste de fase o de campo oscuro. Las pruebas de catalasa y oxidasa fueron positivas.

A continuación se muestra la morfología de *Arcobacter* en microscopía de barrido en la Figura N° 1.

Tabla Nº 2. Partidores específicos para identificar por m-PCR las especies

***A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii*.**

Especie Gen	Partidores	Posición	Secuencia de los Primers	Nº acceso gen bank
<i>A. butzleri</i> 16S rDNA	BUTZ	959-983	5' -CCTGGACTTGACATAGTAAGAATGA-3'	L14626
	ARCO	1357- 1338	5' -CGTATTCACCGTAGCATAGC-3'	L14626
<i>A. skirrowii</i> 16S rDNA	SKIR	705-723	5' -GGCGATTTACTGGAACACA-3'	L14625
	ARCO	1358- 1339	5' -CGT ATTCACCGTAGCATAGC-3'	L14625
<i>A.cryaerophilus</i> 23S rDNA	CRY1	105- 124	5' - TGCTGGAGCGGATAGAAGTA-3'	X80383
	CRY2	359- 340	5' -AACAACCTACGTCCTTCGAC-3'	X80383

Tabla Nº 3. Características de los partidores.

Partidores	Peso molecular ug/ umol	Masa ug	Densidad Optica (DO)	nmol
ARCO	6078	277,95	9,81	45,75
BUTZ	7715	353,85	13,48	45,83
SKIR	5838	277,07	10,33	47,43
CRY1	6247	268,05	10,22	42,92
CRY2	5694	244,41	8,43	42,93

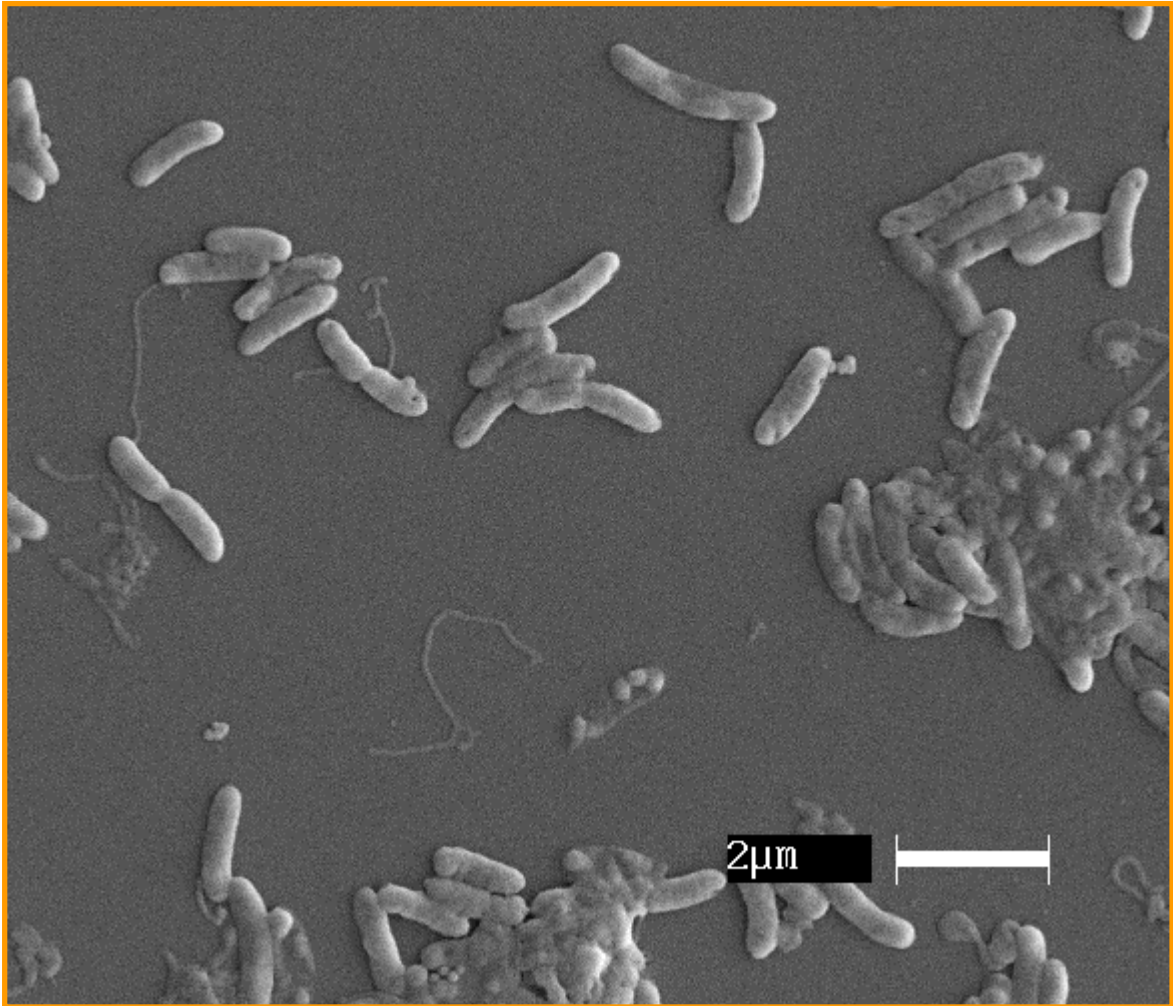


Figura N° 1. Morfología de *Arcobacter* en microscopía de barrido.

Morfología curva, helicoidal o en forma de S itálica, no esporulados. Su tamaño fluctúa entre 0,2 a 0,9 µm de ancho y de 1 a 3 µm de largo, presentan flagelación monótrica o anfítrica.

3.2.2 Extracción de DNA genómico bacteriano.

La extracción de DNA bacteriano se realizó según lo descrito por Houf y col., (2000), que consiste en:

- Suspender en agua estéril aproximadamente 10^6 ufc/ ml de cada cultivo.
- Dejar cada suspensión bacteriana a 4°C por 30 minutos para que las partículas sólidas sedimente pasivamente.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
- Centrifugar a 13000 rpm por 15 min. a 4°C.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet bacteriano lavándolo dos veces en 500 µl de agua destilada estéril.
- Resuspender el pellet en 250 µl de agua estéril y lisar las bacterias someténdolas a ebullición por 10 min.
- Separar el sobrenadante por centrifugación por 5 min. a 13000 rpm a 4°C y almacenar a -20°C hasta ser utilizado para m-PCR.

3.2.3 Cuantificación y pureza de DNA.

La pureza del DNA se determinó realizando mediciones de absorbancia a longitud de onda de 260 y 280 nm. La relación 260/280 debería ser 0,5 a 2,0 para considerar que la preparación es de buena pureza.

Para conocer la concentración aproximada de DNA, se efectuó la medición de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1203. Para determinar esta concentración se considera que 1,0 unidad de absorbancia (OD) corresponde a una solución que contiene 50 µg/ml de DNA de doble hebra (Sambrook *et al.* 1989). En

una cubeta de cuarzo se cargó 1 ml de agua estéril tratada con DEPC y se añadieron 4 µl de la muestra de DNA, calculándose la concentración en µg/µl de DNA total.

3.2.4 Condiciones de la multiple reacción de la polimerasa en cadena (m- PCR).

El ensayo de m-PCR se realiza en una mezcla de reacción que contiene 2 ul de DNA, 5ul de buffer PCR (GibcoBRL 10X), 1.5U de Taq DNA Polimerasa (Gibco), 0.2 mmol/ L de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 1.3mmol/ L de MgCL₂, 50 pmol de los partidores ARCO, BUTZ; CRY1, CRY2 y 25 pmol de partidor SKIR. Los tubos de reacción, incluyendo el control negativo, el cual no contiene templado de DNA, se colocan en el termociclador con el siguiente programa de reacción.

Programa ARCO 1:

- 94°C por 2 min.
- N° de ciclos: 32.
- Denaturación: 94°C por 45 seg.
- Alineación de los partidores: 61°C por 45 seg.
- Extensión de la cadena: 72°C por 30 seg.

3.2.5 m-PCR directo para colonia bacteriana.

En este estudio se analizaron 60 cepas ya antes identificadas por m-PCR, en la Tabla N° 4 se detalla el origen biológico y la especie. Se resuspende homogéneamente una asada (con calibre de 1 ul) de las colonias sospechosas de *Arcobacter* en 100 ul de agua destilada estéril.

Tabla N°4. Fuente de origen y número de cepas de *A. butzleri* y *A. cryaerophilus* analizadas por m-PCR directo de colonia bacteriana.

Fuente de origen	Nº de cepas de <i>A. butzleri</i>	Nº de cepas de <i>A. cryaerophilus</i>
Fecas de porcino	16	13
Fecas de vacuno	2	5
Filtrado de mariscos	3	0
Carne de pollo	5	2
Estómago muscular de pollo	5	0
Hígado de pollo	3	0
Fecas de gallina	2	4
TOTAL	36	24

Para el ensayo de m-PCR, se agrega 2 ul de esta suspensión a la mezcla de reacción de PCR, como se describe a continuación en la Tabla N° 5.

Los tubos de reacción, incluyendo el control negativo, el cual no contiene colonias bacterianas, se colocan en el termociclador con el siguiente programa de reacción.

Programa ARCO:

- 94° C por 5 minutos
- N° de ciclos: 32
- Denaturación: 94°C por 45 seg.
- Alineación de los partidores: 61° C por 45° seg.
- Extensión de la cadena: 72 °C por 30 seg.

3.2.6 Fraccionamiento de DNA en geles de agarosa.

El producto amplificado fue visualizado por electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TBE 0,5 X. La corrida electroforética de DNA se realizó en tampón TBE 0,5 X a 100 V por 40min. Finalizada la electroforesis, se procedió a teñir el gel con EtBr (2 ug/ml en tampón TBE 0,5X), para visualizar en el gel los fragmentos de DNA con luz UV.

Para estimar los tamaños de los fragmentos de DNA separados en el gel de agarosa, se utilizó un estándar de tamaño molecular de 100 pb (0,05 ug/ul) que se corrió en la misma electroforesis, paralelamente con el DNA en estudio amplificado (Sambrook et al. 1989).

Tabla Nº 5. Mezcla de reacción de m-PCR para analizar una muestra (1X)

Componentes	Volumen (ul)	Concentración final
Buffer PCR 10X	5	1 X
MgCl₂ 25 mM	2.6	1.3 mM
4 dNTP 10 mM (mix)	1	0.2 mM
Partidores:		
ARCO 50 uM	1	1 uM
BUTZ 50 uM	1	1 uM
CRY1 50 uM	1	1 uM
CRY2 50 uM	1	1 uM
SKIR 25 uM	1	0.5 uM
Taq DNA pol 5U/ul	0.3	0.03 U/ ul
Agua DEPC	34.1	
Suspensión bacteriana	2	
TOTAL	50	

3.2.7 Ensayo de Movilidad del Heteroduplex (HMA).

Los heteroduplex se forman por denaturación y realineamiento de hebras de DNA parcialmente complementarias (Figura N° 2) provenientes de un par de homoduplex. La variabilidad de una secuencia es detectada por una reducida movilidad electroforética del DNA heteroduplex nuevamente formado. Esta variabilidad de secuencia está dada por distorsiones estructurales del DNA causadas, ya sea por sustitución de bases o por inserciones o por deleciones. Estas últimas causan una movilidad aún más retardada.

3.2.7.1 Estrategia para subtipificar.

Los heteroduplex formados entre los homoduplex de la secuencia en estudio y la de referencia más estrechamente relacionada, presentan movilidades más rápidas y por lo tanto indican el subtipo al que se parece esta cepa.

3.2.7.2 Preparación de DNA homoduplex y heteroduplex.

Se toman 2 ul de DNA amplificado por m-PCR del control positivo de *A. butzleri* o de la muestra que resultó ser identificada como *A. butzleri* por esta misma técnica y se mezcla con 1 ul de tampón HAB y 7 ul de agua libre de nucleasas. En la etapa de incubación de 94°C por 2 min. ocurre la denaturación de las hebras de DNA. Luego, se expone a 0°C para la reasociación de las hebras de DNA complementarias entre si, dando un homoduplex del control positivo o de la muestra que fue identificada como *A. butzleri*.

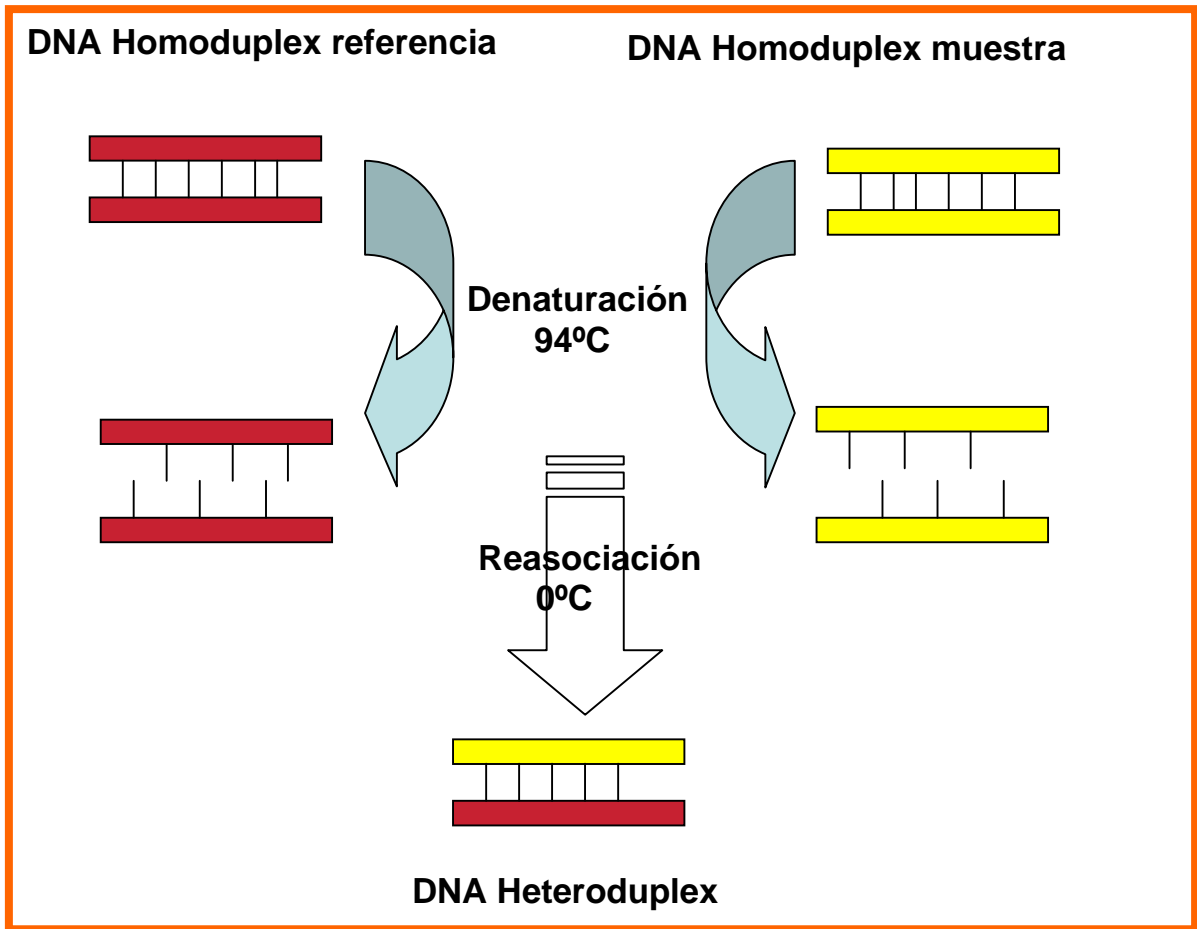


Figura N° 2. Esquema de formación del Heteroduplex de DNA.

Para la preparación del heteroduplex de DNA se utilizó 2 ul del control positivo de *A. butzleri* mezclado con 2 ul de la muestra que fue identificada como *A. butzleri*, 1 ul de tampón HAB y agua libre de nucleasas hasta completar 10 ul. Luego de ser incubadas a 94°C por 2 min. se denaturan las hebras de DNA de la muestra y del control positivo y, después, se reasocian a 0°C las hebras de DNA que son complementarias entre si, formando un heteroduplex compuesto por una hebra de DNA del control positivo para *A. butzleri* y la hebra de DNA de la muestra que fue identificada como *A. butzleri* (Tabla N° 6). (Delwart et al., 1993)

Etapa de incubación:

- **Denaturación de las hebras de DNA:** Incubar a 94°C por 2 min.
- **Reasociación de las hebras complementarias:** 0°C por 10 min.

En la tabla N° 7 se detalla la fuente de origen y número de cepas de *A. butzleri* analizadas por HMA.

3.2.7.3 Fraccionamiento de DNA en geles de acrilamida.

Los homoduplex (muestra o referencia) y heteroduplex (mezcla de muestra y referencia) fueron visualizados por electroforesis en gel de acrilamida-bisacrilamida al 5% en tampón TBE 1X. La corrida electroforética de DNA se realizó en tampón TBE 1X a 150 V por 1 hora 40 min.

Finalizada la electroforesis, se procedió a teñir el gel con nitrato de plata para visualizar los fragmentos de DNA.

Tabla N° 6. Mezcla para el ensayo HMA.

HOMODUPLEX	Volumen (ul)	HETERODUPLEX	Volumen (ul)
Muestra/ Referencia	2	Muestra	2
Tampón HAB 10X	1	Referencia	2
H₂O	7	Tampón HAB 10X	1
		H₂O	5
TOTAL	10		10

Tabla N° 7. Fuente de origen y número de cepas de *A. butzleri* analizadas por HMA.

Fuente de origen	Número de cepas de <i>A. butzleri</i>
Fecas de porcino	30
Fecas de vacuno	15
Filtrado de mariscos	5
Carne de pollo	30
Estómago muscular de pollo	5
Hígado de pollo	5
Fecas de gallina	2
TOTAL	92

4. RESULTADOS

4.1 Especificidad de los partidores en el m-PCR.

Se estandarizó el ensayo de m-PCR utilizando el DNA de las cepas de referencia (tabla N° 8) y los 5 partidores. El par de partidores ARCO-BUTZ amplifica un fragmento de 401 pb que es específico para todas las especies de *A. butzleri*. El par de partidores ARCO-SKIR amplifica un fragmento de 641 pb para todas las cepas de *A. skirrowii*. Los partidores CRY1 y CRY2 amplifica un fragmento específico de 251 pb para todas las cepas de *A. cryaerophilus* de los subgrupos 1 y 2. (Figura 3)

4.1.1. Sensibilidad de m-PCR para cepas de *Arcobacter* de diversos reservorios biológicos.

La sensibilidad de m-PCR para la detección de las especies de *Arcobacter* en cepas provenientes de fecas de porcino, de vacuno y gallina, filtrado de mariscos bivalvos y de carnes, hígado y estómago muscular de pollo, se realizó obteniendo las cepas puras a partir de los medios de crecimiento agar sangre y Müller-Hinton, con la posterior extracción de DNA por lisis bacteriana por calor.

4.1.1.1 Efecto de inhibidores provenientes del medio de cultivo en el m-PCR.

En el templado de DNA obtenido de las cepas provenientes del medio agar sangre, se observó inhibición de la reacción de PCR para las tres especies de *Arcobacter*, ya que había ausencia o escasez de productos de amplificación. Esta inhibición puede ser debido a la presencia de hemoglobina en el medio o un exceso de templado. (Houf et al., 2000; McPherson et al., 2000)

Tabla N° 8. Cepas de referencia con su producto específico de amplificación.

Especie	N° de la cepa BCCM/LMG	Producto de amplificación
<i>Arcobacter butzleri</i>	10828	401 pb
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	6621	257 pb
<i>Arcobacter skirrowii</i>	9904	641 pb

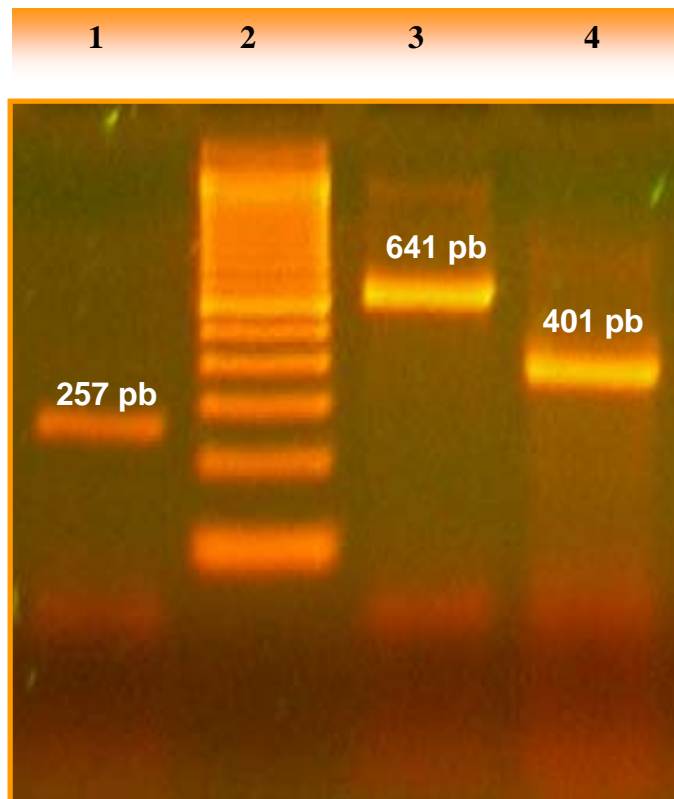


Figura N° 3. m-PCR para cepas de referencia.

Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TBE 0,5X. **Carril 1.** Control positivo *Arcobacter cryaerophilus* 9904 de 257 pb. **Carril 2.** DNA ladder de 100 pb. **Carril 3.** Control positivo *Arcobacter skirrowii* 6621 de 641 pb. **Carril 4.** Control positivo *Arcobacter butzleri* 10828 de 401 pb

Al diluir la concentración de templado de DNA y por lo tanto del inhibidor de PCR, que es un compuesto derivado de la sangre proveniente del medio de cultivo, se disminuye su poder inhibitorio en la reacción. Es por esto que se utilizó un factor de dilución 10 para los templados de DNA de las cepas provenientes de medio agar sangre, tomándose 10 ul del extracto de DNA y agregando 90 ul de agua libre de nucleasas. Con esta modificación se resuelve la inhibición observada en la realización del m-PCR, dando como resultado productos esperados de amplificación específica para cada especie de *Arcobacter* (Figura N° 4).

Para evitar el problema de inhibición del PCR por hemoglobina contenidos en los medios de agar sangre, se trabajó posteriormente con medio agar Müller-Hinton el cual no contiene sangre, obteniéndose productos de amplificación específica para las tres especies de *Arcobacter* como se muestra en la Figura N° 5.

4.1.1.2. Frecuencia de aislamiento de especies de *Arcobacter* en diversos reservorios biológicos.

Se analizaron 241 cepas sospechosas de *Arcobacter* (Tabla N° 9) que, al comparar la frecuencia de aislamiento en los distintos reservorios biológicos, se observa que *A. butzleri* se encuentra en un 100% en filtrado de mariscos y estómago muscular de pollo, 95% en carcasa e hígado de pollo, seguidas de un 71% aisladas de fecas de vacuno y un 69% en cerdos. De fecas de gallina hubo una menor frecuencia de aislamiento (33%).

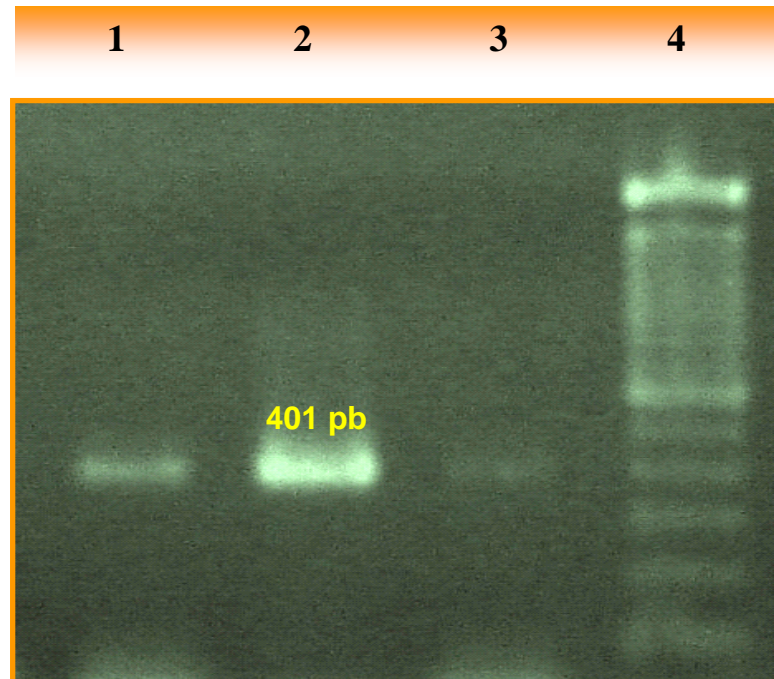


Figura Nº 4. Dilución del inhibidor de m- PCR.

Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TBE 0,5X. **Carril 1.** Templado de DNA de *A. butzleri* con dilución 10 veces del inhibidor obtenido de cepas que crecieron en agar sangre. **Carril 2.** Templado de DNA de *A. butzleri* obtenido de cepas que crecieron en agar de Müller Hinton. **Carril 3.** Templado de DNA de *A. butzleri* obtenido de cepas que crecieron en agar sangre. **Carril 4.** DNA ladder de 100 pb.

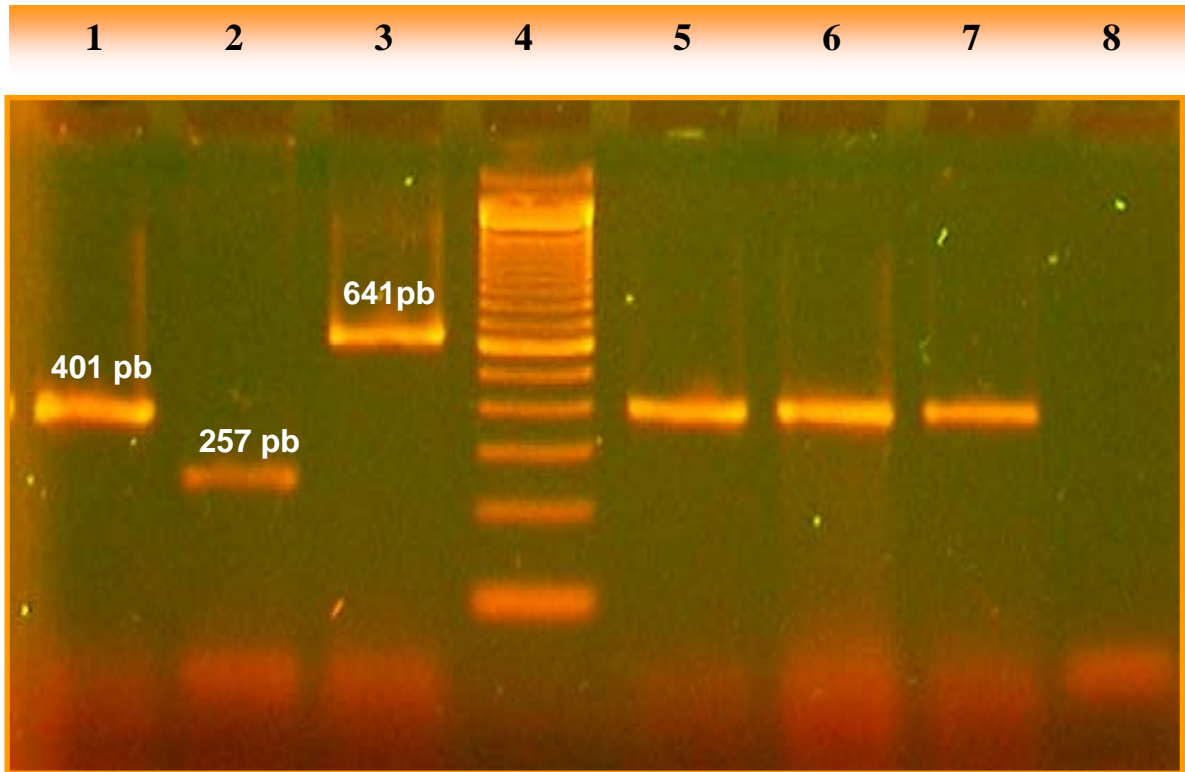


Figura N° 5. m-PCR para cepas de *Arcobacter* sembradas en medio agar Müller Hinton.

Electroforesis en gel de Agarosa al 2% en tampón TBE 0,5X. **Carril 1.** Control positivo *Arcobacter butzleri* 10828 de 401 pb. **Carril 2.** Control positivo *Arcobacter cryaerophilus* 9904 de 257 pb. **Carril 3.** Control positivo *Arcobacter skirrowii* 6621 de 641 pb. **Carril 4.** DNA ladder de 100 pb. **Carril 5, 6 y 7.** Cepas sospechosas de *Arcobacter* PUAR55 de pollo, 34AS1° de cerdo y 13HH3° de bovino, las que corresponden a *A. butzleri*. **Carril 8.** Control negativo agua.

Tabla Nº 9. Número de cepas y frecuencia aislamiento de *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y la mezcla de ambas dependiendo de su reservorio biológico.

Número de cepas y frecuencia de aislamiento				Nº total
Reservorio biológico	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	Mezcla	de cepas
Fecas de porcino	55 (69%)	13 (16%)	12 (15%)	80
Fecas de vacuno	20 (71%)	5 (18%)	3 (11%)	28
Carne de pollo	90 (95%)	2 (2%)	3 (3%)	5
Estómago muscular de pollo	8 (100%)	0	0	95
Hígado de pollo	18 (95%)	0	1 (5%)	8
Fecas de gallina	2 (33%)	4 (67%)	0	19
Filtrado de mariscos	5 (100%)	0	0	5
Nº total de cepas por especie	198 (82%)	24 (10%)	19 (8%)	241

A. cryaerophilus se encuentra pobremente distribuido en estos reservorios biológicos, sin embargo fue encontrado en un 67% en fecas de gallinas, un 18% y 16% en fecas de vacunos y cerdos respectivamente. No se encontró *A. skirrowii*. (Figura N° 6).

De las 241 cepas analizadas de diversos reservorios biológicos, el 82% de los casos fueron positivas para *A. butzleri*, 10% *A. cryaerophilus* y 8% mezcla de las cepas ya mencionadas (Figura N° 7).

4.1.2. Colonia bacteriana utilizada directamente en m-PCR.

A las 241 cepas sospechosas de *Arcobacter* se les extrajo el DNA y posteriormente fueron analizadas por m-PCR para ser identificadas por especie de *Arcobacter*. De ellas, 60 se volvieron a analizar siendo amplificadas directamente a partir de la colonia.

Se encontró un 100% de concordancia en los resultados por ambos métodos. En la Figura N° 8 se muestra un ejemplo: la cepa UAR 177, aislada de carcasa de pollo, corresponde a la especie *A. butzleri* por ambos métodos.

4.1.3. Estudio de variabilidad génica HMA.

En este estudio aparentemente no se encontró variabilidad génica entre las 92 cepas estudiadas, ya que no se observó diferencias en el tamaño de las bandas entre los homoduplex y el heteroduplex, por lo que coinciden entre ellas (Figura N° 9).

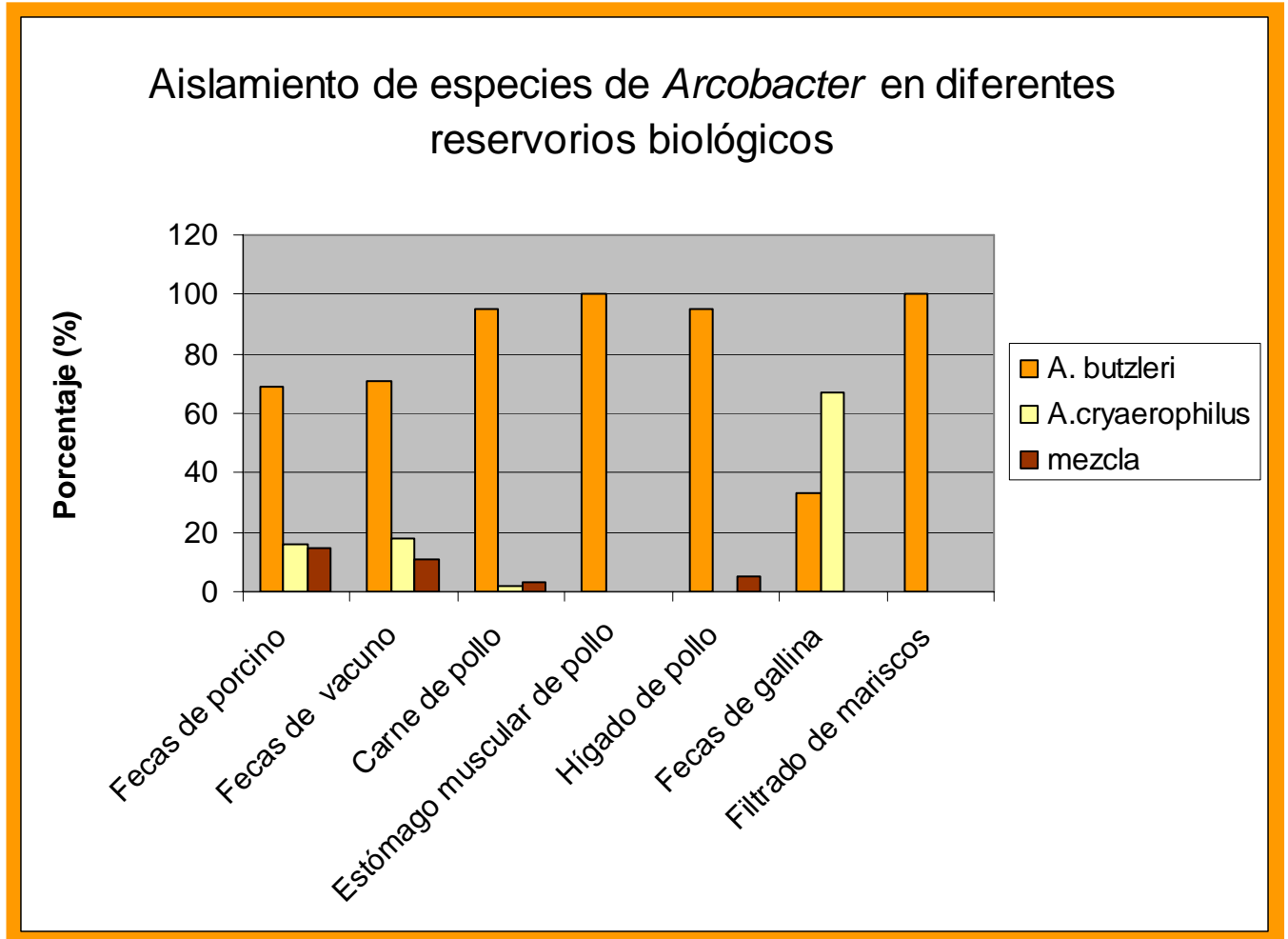


Figura N° 6. Frecuencia de aislamiento de *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* y de la mezcla de ambas especies en diversos reservorios biológicos.

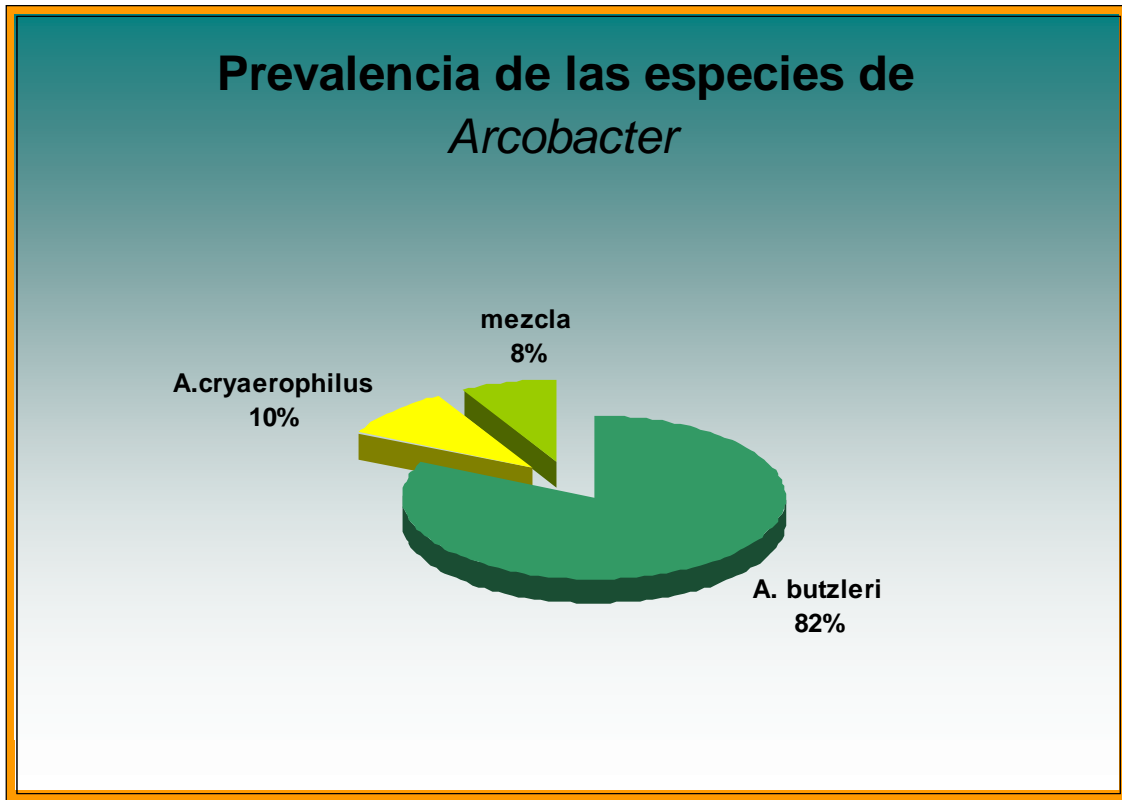


Figura N° 7. Prevalencia de las especies de *Arcobacter* del total de las cepas aisladas de diversos reservorios.

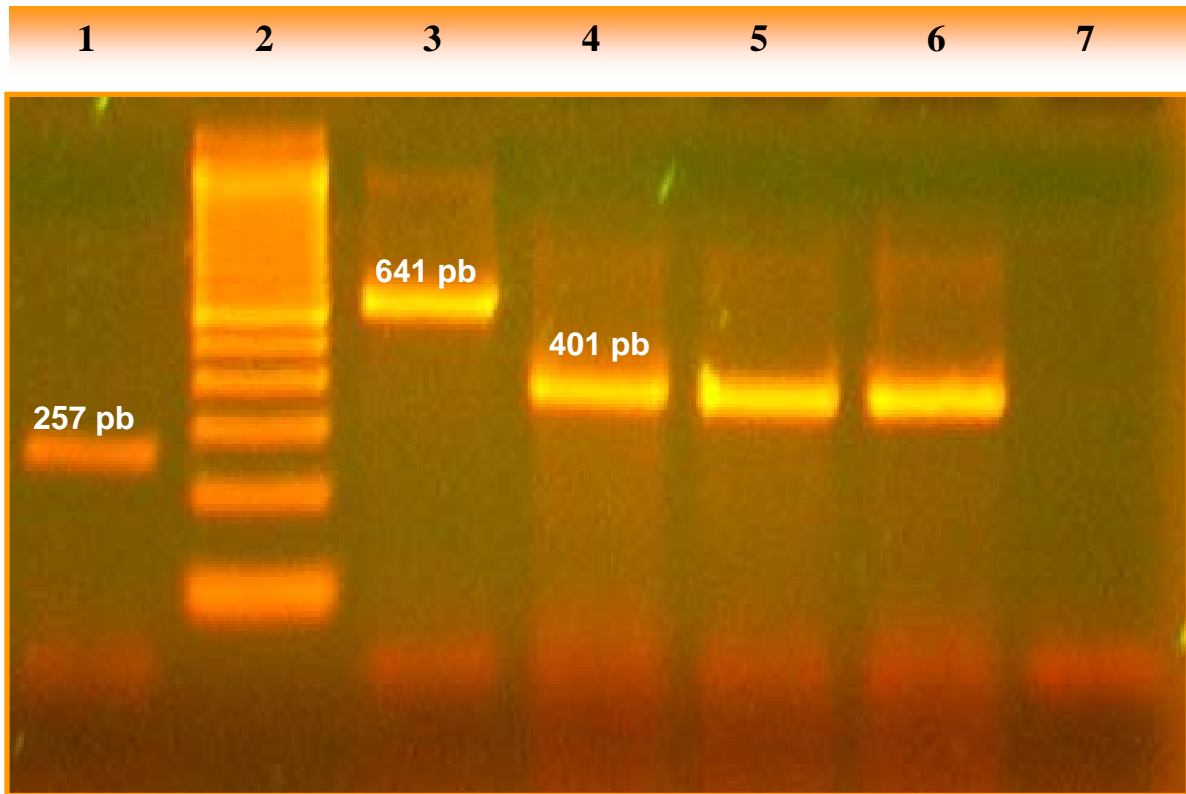


Figura N° 8. m-PCR utilizando directamente colonias bacterianas.

Electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TBE 0,5X. **Carril 1.** Control positivo *Arcobacter cryaerophilus* 9904 de 257 pb. **Carril 2.** DNA ladder de 100 pb. **Carril 3.** Control positivo *Arcobacter skirrowii* 6621 de 641 pb. **Carril 4.** Control positivo *Arcobacter butzleri* 10828 de 401 pb. **Carril 5.** Cepa sospechosa de *Arcobacter* UAR 177, sometida a extracción de DNA. **Carril 6.** Cepa sospechosa de *Arcobacter* UAR 177, analizada por Método de amplificación directa a partir de colonia bacteriana. **Carril 7.** Control negativo agua.

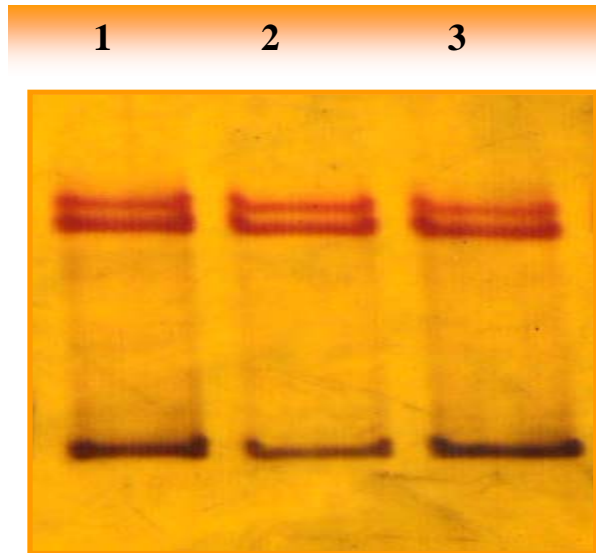


Figura N° 9. Estudio de HMA.

Gel de acrilamida- bis acrilamida al 5% tampón TBE 1X. **Carril 1.** Homoduplex de la cepa de referencia *Arcobacter butzleri* 10828. **Carril 2.** Heteroduplex (cepa de referencia *A. butzleri* + *A. butzleri* UAR 181). **Carril 3.** Homoduplex de la cepa *Arcobacter butzleri* UAR 181 (carne de pollo).

5. DISCUSIÓN

La disponibilidad de métodos rápidos para la detección específica de *Arcobacter* en los alimentos facilita el monitoreo de esta bacteria en el procesamiento de alimentos y contribuye a proteger la salud pública. El ensayo de m-PCR ofrece exactitud y es una alternativa rápida para la detección de microorganismos patógenos, lo que depende de la especificidad del set de partidores usados. Los partidores utilizados en este trabajo amplifican un fragmento del gen que codifica para *rRNA 16S* y *23S*, que corresponden a regiones filogenéticamente conservadas entre especies. Los partidores ARCO-BUTZ flanquean una región del gen *rRNA 16S*, amplificando un fragmento de 401 pb que es específico para *A. butzleri*, los partidores ARCO-SKIR flanquean otra región del gen *rRNA 16S* amplificando un fragmento de 641 pb, para identificar específicamente *A. skirrowii* y por último los partidores CRY1-CRY2 flanquean un fragmento del gen *rRNA 23S*, amplificando un fragmento de 257 pb que corresponde para *A. cryaerophilus* (Figura N° 3) (Houf et al., 2000).

La sensibilidad de m-PCR para la detección de las especies de *Arcobacter* en cepas provenientes de fecas de porcino, de vacuno y de gallina, filtrado de mariscos bivalvos y de carnes, hígado y estomago muscular de pollo, se estudió en medio agar sangre y Müller-Hinton, con la posterior extracción de DNA por lisis bacteriana por calor. Los productos de amplificación para el templado de DNA obtenido de las cepas que crecieron en agar sangre era escaso o no se obtenían amplicones, debido a la inhibición de la reacción de PCR por compuestos porfirínicos derivados del grupo Hem o por exceso de templado. Ello porque junto con las colonias bacterianas se arrastra

sangre del medio de cultivo y, por lo tanto, estos inhibidores se liberan en el proceso de extracción de DNA después de lisar las bacterias, inactivando a la enzima Taq DNA Polimerasa. Por este motivo se decidió diluir 10 veces el extracto de DNA obtenido de la cepa proveniente de agar sangre, diluyendo también el compuesto inhibidor de la reacción de PCR, obteniendo así los productos de amplificación esperados (Figura N° 4).

El efecto de dilución del templado de DNA de la muestra aumenta la especificidad de la m-PCR, ya que si la muestra contiene contaminantes o inhibidores de la reacción de PCR, al diluir el templado de DNA permite también la dilución de estos interferentes y por lo tanto, se revierte el problema de inhibición de la reacción de amplificación.

Posteriormente, se prefirió trabajar las mismas cepas en agar Müller Hinton, un medio de cultivo libre de sangre, para evitar el problema de inhibición de la m-PCR, obteniendo los productos de amplificación esperados (Figura N° 5).

Arcobacter spp. ha sido aislado con una mayor frecuencia en carne de ave (pollo) que de carnes rojas, sugiriendo que el pollo puede ser un reservorio importante de estos microorganismos. *A. butzleri* fue aislado en un 81% de carne de pollo en Francia (Marinescu et al. 1996). En otros estudios hechos en Canadá para productos derivados de pollo, *A. butzleri* fue aislado en un 97% de las muestras de carne obtenidas de cinco diferentes plantas procesadoras de pollo (Lammerding et al. 1996). En contraste, *A. butzleri* fue identificado en un 24% de muestras de pollo en los Países Bajos (de Boer et al., 1996).

Gonzalez y col. 2000 detectaron un 53% de *Arcobacter spp.* en muestras de pollo. Oliveira y col. en el 2001 encontró un 42,5% de *A. butzleri* en carne de pollo y en el 2003 identificó un 29,3% de *A. butzleri* en cerdos de abate y 32% en matrices descartadas.

En nuestro trabajo (Figura N° 6), al comparar la frecuencia de aislamiento en los distintos reservorios biológicos, se observa que *A. butzleri* se encuentra en un 100% en filtrado de mariscos y estómago muscular de pollo, 95% en carne e hígado de pollo, 71% en fecas de bovino y un 69% en cerdos. En menor proporción (33%) se aisló de fecas de gallina.

A. cryaerophilus se encuentra distribuido en baja frecuencia en estos reservorios biológicos. Sin embargo, fue encontrado en un 67% en fecas de gallinas, un 18% y 16% en fecas de bovinos y cerdos respectivamente.

En este trabajo no se encontró *A. skirrowii* en ninguna de las muestras analizadas.

La prevalencia encontrada (Figura N° 7) para *A. butzleri* fue de 82%, *A. cryaerophilus* 10% y 8% para la mezcla de las cepas ya mencionadas, de un total de 241 cepas sospechosas de *Arcobacter* aisladas de diferentes reservorios biológicos.

Las diferencias entre los porcentajes de aislamiento para *Arcobacter* en los distintos estudios publicados puede ser atribuido a múltiples factores, tales como condiciones de higiene en la producción y procesamiento en las plantas de faenamiento, o a diferencias en la sensibilidad y especificidad en los métodos de aislamiento e identificación utilizados (Wesley and Baetz 1999).

Por otra parte, por medio del ensayo de m-PCR, constatamos que al utilizar la colonia sospechosa directamente en la reacción de amplificación y comparándola con la extracción previa de DNA, se encontró un 100% de concordancia en los resultados por ambos métodos (Figura N° 8). Es por esto que la amplificación directa de la colonia bacteriana resulta ser un método específico, rápido y de bajo costo para la detección de las especies de *Arcobacter*, siendo una buena alternativa de identificación molecular.

Este método tiene como proyección facilitar el estudio de la epidemiología de estas bacterias, su frecuencia de aislamiento y la potencial importancia de los alimentos de origen animal contaminados con ellas, como fuentes de infección para el hombre.

Por medio del ensayo de HMA no se encontró variabilidad génica entre las cepas estudiadas (Figura N° 9), ya que presentaron el mismo tamaño de las bandas entre los homoduplex y el heteroduplex. Para comprobar si esto se cumple se deben hacer, en el futuro, estudios de secuenciación de estos fragmentos.

Por lo tanto, podemos señalar que con esta tesis se ha aportado información relevante a cerca de la identificación de las especies de *Arcobacter* a nivel molecular, por medio del ensayo de m-PCR directo de colonia bacteriana, siendo éste un avance que tiene aplicación en el laboratorio de microbiología clínica, como ensayo de rutina para la identificación de especies de *Arcobacter* y su diferenciación de los otros géneros que componen la familia *Campylobacteraceae*, representando un gran aporte en sanidad pública, en relación a medidas de control y prevención de la transmisión de este patógeno entérico emergente, responsables de diarreas, bacteremias y otras infecciones en humanos y animales.

6. ANEXO

Medios de Cultivo y Soluciones de Trabajo

AGAR SANGRE

Preparación para 1000 ml:

- Agar Müeller – Hinton (CM 337) 38 g
- Extracto de levadura 5 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 alicuotado en placas de Petri.

AGAR PARA AISLAMIENTO SELECTIVO DE *ARCOBACTER* (MEDIO DE HOUF)

Preparación para 1000 ml:

- Arcobacter broth (Oxoid, CM965) 24g
- Agar technical N° 3 (Oxoid L13) 12 g
- Sangre desfibrinada de cordero o humana 50 ml
- Agua destilada 950 ml

Mezcla antibiotica:

- Anfotericina B 10 mg
- Cefoperazona 16 mg

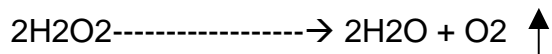
- 5-Fluoracil 100 mg
- Novobiocina 32 mg
- Trimetoprim 64 mg

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 alicuotado asépticamente en placas de Petri.

PRUEBAS DE IDENTIFICACION PRESUNTIVA PARA EL GENERO *ARCOBACTER*

- **Prueba de la catalasa:**

La catalasa es una enzima del citocromo, que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias, que en presencia de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) hace que éste se desdoble en agua y oxígeno.



Procedimiento: En un portaobjeto se deposita una gota de agua; en ella suspender una colonia de la cepa a estudiar y se le adiciona una gota de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) de 10 vol. (3%).

Reacción positiva: se observa un desprendimiento de burbujas, correspondiente a la oxidación del peróxido.

- **Prueba de la oxidasa:**

Esta basada en la producción de la enzima oxidasa, la que al encontrarse en presencia de oxígeno atmosférico, citocromo C y el reactivo de oxidasa (reactivo de Kovacs), oxidan el reactivo para formar indofenol, que es un compuesto coloreado.

Procedimiento: impregnar un trozo pequeño de papel filtro sobre un portaobjeto, con gotas del reactivo de oxidasa utilizando pipeta pasteur depositar un inóculo de la cepa en estudio, para evitar falsos positivos que se puedan obtener al utilizar asa de micrón.

Reacción positiva: se visualiza después de 10 seg. por un cambio de color gradual de la colonia, desde rosa pálido a púrpura oscuro.

TINCIÓN DE NITRATO DE PLATA PARA GELES DE ACRILAMIDA.

1. **Tinción:** Sumergir el gel en 100ml de nitrato de plata 1X e incubar durante 30 min. con agitación leve y constante. Lavar rápidamente el gel con poco agua.
2. **Revelado:** mezclar 100ml de NaOH al 3% con 1ml de formaldehído al 37% y sumergir el gel por 30 min. hasta la aparición de bandas.
3. **Detención de la reacción de revelado:** sumergir el gel en 100 ml de la solución de fijación 1X.

Solución de detención 10X: etanol 287ml + ácido acético glacial 3 ml.

BUFFER DE ALINEAMIENTO DEL HETERODUPLEX 10X (HAB):

1000 mM de NaCl

100mM Tris HCl, pH 7.8

20 mM de EDTA

7. BIBLIOGRAFIA.

Absolom, D.R., Lamberti F.V, Policova Z., Zingg W., Van Oss C.J. and Neumann A.W. (1983). Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Applied Environ. Microbiol.*, 46: 90-97.

Anderson, K.F., Kiehlbauch J.A., Anderson D.C., McClure H.M. and Wachsmuth I.K. (1993). *Arcobacter (Campylobacter) butzleri*- associated diarrheal illness in a non human primate population. *Infection and Immunity*. 61: 2220-2223.

Assanta, M.A., Roy D., Lemay M. and Montpeit. (2002). Attachment of *Arcobacter Butzleri*, a new water born pathogen, to water distribution pipe surfaces. *J. Of Food Protect.*, 65: 1240-1247.

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

Atabay, H., Corry J. and Post D. (1996). Comparison of the productivity of a variety of selective media for *Campylobacter* and *Arcobacter* species. In: Newell, D.; Ketley, J. and Feldman, R. (Ed) *Campylobacters, Helicobacters, and Related Organisms*, Plenum Press. New York, Pp. 19-23.

Atabay, H.I. and Corry J.E.L. (1997). The prevalence of *Campylobacters* and *Arcobacter* in broiler chickens. *J. Appl. Microbiol.*, 83: 619-626.

Bastijns, K., Cartuyvels D., Chapelle S., Vandamme P., Goossens H. and De Wachter R. (1995). A variable 23S rDNA region is a useful discriminating target for genus- specific

and species- specific PCR amplification in *Arcobacter* species. *System.Appl. Microbiol.* 18: 353-356.

De Boer, E., Tilburg J., Woodward D., Lior H. and Johnson W. (1996). A selective medium for the isolation of *Arcobacter* from meats. *Letters In Appl. Microbiol.*, 23: 64-66.

Boudreau, M.; Higgins R. and Mittal K.R. (1991). Biochemical and serological characterization of *Campylobacter cryaerophilus*. *J. Of Clinical Microbiol.* 29: 54-58.

De Oliveira, S.J., Baetz A.L., Wesley I.V. and Harmon K.M. (1997). Classification of *Arcobacter* species isolated from aborted pig fetuses and sows with reproductive problems in Brazil. *Veterinary Microbiol.* 57: 347-354.

De Oliveira, S.J.; De Souza Moraes H.L, Kuchenbecker B., Ikuta N., Lunge V., Fonseca A. and Coiro J.R. (2001). Isolation of *Arcobacter* spp from poultry carcasses, in Brazil. *Ciência Rural, Santa María.*, 31: 639-643.

De Oliveira, S.J.; Ikuta, N.; Lunge, V.R.; Fonseca, A.; Moraes, H.L.; Kuchenbecker, B.S. and Passos, D.T. (2003). Isolamento de *Arcobacter butzleri* de musculos de carcassas de suínos de terminação e de matrizes descartadas abatidos em um matadouro no estado do Ríó Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural, Santa María.*, 33: 889-892.

De Oliveria, S.J.; Wealey, I.; Baetz, A.L.; Harmon, K.M.; Kader, I. T. A. and De Uzeda, M. (1999). *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter butzleri* isolated from preputial fluid of boars and fattening pigs in Brazil. *J. Vet. Invest.*, 11: 462-464.

Delwart E.L., Shper E.G., E.McCutchan F., Louwagie J., Grez M., Rúbsamen-Waigmann H., Mullins J.I. (1993). Genetic relationships determined by a DNA Heteroduplex mobility assay: Analysis of HIV- 1 env genes. *Science.* 262: 1257-1261.

- Eifert, J.D.; Castle, R.M.; Pierson, F. W.; Larsen, C.T. and Hackney, C.R. (2003). Comparison of sampling techniques for detection of *Arcobacter butzleri* from chickens. *Poultry Science*. 82: 1898-1902.
- Ellis, W. A., Neill S. D., O'Brien J. J., Ferguson H. W. and Hanna J. (1977). Isolation of Spirillum/ Vibrio like organisms from bovine fetuses. *Vet. Rec.* 10: 451- 452.
- Engberg, J.; On, S.; Harrington, C.S. and Gerner-Smidt, P. (2000). Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, and *Sutturella* spp. In human fecal samples as estimated by a reevaluation of isolation methods of *Campylobacters*. *J. Of Clin. Microbiol.*, 38: 286-291.
- Fera, M.T; Maugeri, T.L.; Giannone, M.; Gugliandolo, C.; La Camera, E.; Blandino, G. and Carbone, M. (2003). In vitro susceptibility of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* to different antimicrobial agents. *I. Journal of Antimicrobial Agents*. 21: 488-491.
- Fernández, H.; Eller, G.; Paillacar, J.; Gajardo, T. and Riquelme, A. (1995). Toxigenic and invasive capacities: posible pathogenic mechanisms in *Arcobacter cryaerophilus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río De Janeiro.*, 90: 633-634.
- Fernández, H.; Zaror, L.; Wilson, M.; Otth, L. and Tejero, A. Manual de laboratorio 2000. Microbiología Sistemática y Clínica. Universidad Austral De Chile. Familia *Campylobacteraceae* y Género *Helicobacter.*, page: 67-70.
- Golla, S.C.; Murano, E.A.; Johnson, L.G.; Tipton, N.C.; Cureington, E.A. and Savell, J.W. (2002). Determination of the occurrence of *Arcobacter butzleri* in beef and dairy cattle from Texas by various isolation methods. *J. of Food Protection*. 12: 1849-1853.

- González, I.; García, T.; Antolín, A.; Hernández, P.E. and Martín, R. (2000). Development of a combined PCR- culture technique for the rapid detection of *Arcobacter* spp. In chicken meat. *Lett. Appl. Microbiol.* 30: 207- 212.
- González, I.; García, T.; Antolín, A.; Hernández, P.E. and Martín, R. (2001). Development of a combined PCR- culture technique for the rapid detection of *Arcobacter* spp in chicken meat. *Lett. Appl. Microbiol.*, 30: 207-212.
- Harmon, K.M. And Wesley, I.V. (1996). Identification of *Arcobacter* isolates by PCR. *Lett. Appl. Microbiol.*, 23: 241-244.
- Harmon, K.M. And Wesley, I.V. (1997). Multiplex PCR for the identification of *Arcobacter* and differentiation of *Arcobacter butzleri* from other *Arcobacter*. *Vet. Microbiol.* 58: 215-227.
- Hilton, C.; Homes, K.; Spears, K.; Mansfield, L.P.; Hargreaves, A. and Forsythe, S.J. (2000). *Arcobacter*, newly emerging food and waterborne pathogens. *Reviews in Medical Microbiology.* 11: 161-170.
- Houf, K.; De Zutter, L.; Van Hoof, J. and Vandamme, P. (2002). Occurrence and distribution of *Arcobacter* species in poultry processing. *J. Of Food Protection.* 65: 1233-1239.
- Houf, K.; Devriese, L.; Hoof, J. And Vandamme, P. (2001). Development of a new protocol for the isolation and quantification of *Arcobacter* species from poultry products. *J. Of Food Microbiology.* 71: 189-196.
- Houf, K.; Devriese, L.A.; De Zutter, L.; Van Hoof, J. and Vandamme, P. (2001). Susceptibility of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii* to antimicrobial agents used in selective media. *J. Of Clin. Microbiol.* 39: 1654-1656.

- Houf, K.; Tutenel, A.; De Zutter, L.; Van Hoof, J. and Vandamme, P. (2000). Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*. *Fems Microbiology Letters*. 193: 89-94.
- Hsueh, P.; Teng, L.; Yang, P.; Wang, S.; Chang, S.; Ho, S.; Hsieh, W. and Luhk, K. (1997). Bacteremia caused by *Arcobacter cryaerophilus* 1b. *J. Of Clinical Microbiology*. 35: 489-491.
- Hurtado, A. and Owen R. (1997). A molecular scheme based on 23S rRNA gene polymorphisms for rapid identification of *Campylobacter* and *Arcobacter* species. *J. Clin. Microbiol.*, 35: 2401- 2404.
- Johnson, L.G. And Murano, E.A. (1999). Comparison of three protocols for the isolation of *Arcobacter* from poultry. *J. Of Food Protection*. 62: 610-614.
- Johnson, L.G. And Murano, E.A. (1999). Development of a new medium for the isolation of *Arcobacter* spp. *J. Of Food Protection*. 62: 456-462.
- Johnson, L.G. And Murano, E.A. (2002). Lack of a cytotoxic distending toxin among *Arcobacter* isolates from various sources. *J. Of Food Protection*. 65: 1789-1795.
- Lammerding, A.; Harris, J.; Lior, H.; Woodward, D.; Cole, L. And Muckle, C. (1996). Isolation method for recovery of *Arcobacter butzleri* from fresh poultry and poultry products. In: Newell, D.; Ketley, J. and Feldman, R. (Ed) *Campylobacters, Helicobacters, and Related Organisms*, Plenum Press. New York. pages: 329-333.
- McPherson, M.J.; Moller, S. G. (2000). The basics PCR. BIOS Scientific Publishers Limited. p.76-77.

- Manke, T.R.; Wesley, I.V.; Dickson, J.S. And Harmon, K. (1998). Prevalence and genetic variability of *Arcobacter* species in mechanically separated turkey. *J. of Food Protection*. 61: 1623-1628.
- Marinescu, M., Collignon A., Squinazi F., Woodward D. and Lior H. (1996). Biotypes and serogrupos of poultry strains of *Arcobacter* spp isolated in France. *Campylobacter VIII*. D. G. Newall and J. H. Ketley, ed. Plenum Publishing Corp. New York, NY. pages: 519-520.
- Moreno, Y.; Botella, S.; Alonso, J.L.; Ferrús, M.A.; Hernández, M. and Hernández, J. (2003). Specific detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* strains in water and sewage by PCR and fluorescent in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 1181-1186.
- Musmanno, R.A., Russi M., Lior H. and Figura N. (1997). In vitro virulence factors of *Arcobacter butzleri* strains isolated from superficial water samples. *Microbiologica*. 20: 63- 68.
- Neill, S.; Campbell, J.; O'Brien, J.; Weatherup, S. And Ellis, W. (1985). Taxonomic Position of *Campylobacter cryaerophilus* Sp. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35: 342-356.
- Neill, S.D.; Ellis W.A. and O'Brien J.J. (1978). The Biochemical characteristics of *Campylobacter*-like organisms from cattle and pigs. *Research in Veterinary Science*. 25: 368-372.
- Oliveira, S. J. De et al. (1997). Classification of *Arcobacter* species isolated from aborted pig fetuses and sows with reproductive problems in Brazil. *Vet. Microbiol.*, v.57, p.347-354.

Oliveira, S. J. De et al. (2003). Isolation of *Arcobacter butzleri* from muscles of the carcasses of fattening pigs and culled sows slaughtered in abattoir in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Ciência Rural*, v.33, n.5, p. 889- 892.

Oliveira, S. J. DE et al. (2001). Isolation of *Arcobacter* spp from poultry carcasses, in Brazil. *Ciência Rural*, v.31, n.4, p. 639- 643.

On, S.L.W. (2001). Taxonomy Of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *J. Of Applied Microbiology*. 90: 1s-15s.

On, S.L.W.; Jensen T.K.; Bille-Hansen, V.; Jorsal, S.E. and Vandamme, P. (2002). Prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. isolated from the internal organs of spontaneous porcine abortions in denmark. *Veterinary Microbiology*. 85: 159-167.

Oth, L.; Wilson, L. and Fernández, H. (2001). Desiccation resistance in *Arcobacter butzleri*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 32: 311-312.

Phillips, C.A. (2001). *Arcobacter* spp in food: isolation, identification and control. *Trends in Food Science & Technology*., 12: 263-275.

Phillips, C.A. (1999). The effect of citric acid, lactic acid, sodium citrate and sodium lactate, alone and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri*. *Letters in Applied Microbiology*. 29: 424-428.

Rice E., Rogers M.R., Johnson C.H., et al. (1998). Isolation of *Arcobacter* spp. from ground water. *Lett. Appl. Microbiol*. 28: 36- 40.

Schroeder- Tucker, L. et al. (1996). Phenotypic and ribosomal RNA characterization of *Arcobacter* species isolated from porcine aborted fetuses. *J. Vet. Diagn. Invest*. v.8, p.86-195.

- Ridsdale, J.; Atabay, H. And Corry, J. (1999). *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. isolated from the carcasses and caeca of commercially reared ducks. *Anaerobe*. 5: 317-320.
- Ridsdale, J.; Atabay, H. and Corry, J. (1998). Prevalence of *Campylobacters* and *Arcobacter* in ducks at the abattoir. *J. Appl. Microbiol.*, 85: 567-573.
- Tee, W.; Baird, R.; Dyall-Smith, M. And Dwyer, B. (1988). *Campylobacter cryaerophila* Isolated from A Human. *J. Of Clinical Microbiology*. 26: 2469-2473.
- Van Driessche, E.; Houf, K.; Van Hoof, J.; De Zutter, L. and Vandamme, P. (2003). Isolation of *Arcobacter* species from animal feces. *Fems Microbiology Letters*. 229: 243-248.
- Vandamme, P., Falsen E., Rossau R., Hoste B., Segers 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. Bacterial*.41: 88-103.
- Vandamme, P., Pugina P., Benzi G., Van Etterijck R., Vlaes L., Kesters K., Butzler J.P., Lior H. and Lauwers S. (1992). Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school. *J. Clin. Microbiol*. 30: 2335- 2337.
- Vandamme, P., Vancanneyt M., Pot B., Mels L., Hoste B., Dewettinck D., Vlaes L., Van Den Borre C., Higgins R., Hommez J., Kesters K., Butzler J.P. and Goznes H. (1992). Poliphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* comb.nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. Nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. *Int. J. Syst. Bacterial*. 42: 344- 356.

- Villarruel-López, A.; Márquez-González, M.; Garay-Martínez, L.E.; Zepeda, H.; Castillo, A.; Mota De La Garza, L.; Murano, E.A. and Torres-Vitela, R. (2003). Isolation of *Arcobacter* spp. from retail and cytotoxic effects of isolates against vero Cells. *J. Of Food Protection.*, 66: 1374-1378.
- Wesley, I.A. and Baetz, A.L. (1999). Natural and experimental infections of *Arcobacter* in poultry. *Poultry Science.* 4: 536-545.
- Wesley, I.A.; Baetz, A.L. and Larson, D.J. (1994). Recovery of *Arcobacter* from pigs in iowa. *Swine Research Report.* page: 165-167.
- Wesley, I.V.; Wells, S.L.; Harmon, K.M.; Green, A.; Schroeder-Tucker, L.; Glover, M. and Siddique, I. (2000). Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp in dairy cattle. *Applied and Environmental Microbiology.* 66: 1994-2000.
- Woo, P. C., Chong K. T., Leung K., Que T., Yuen K. (2001). Identification de *Arcobacter cryaerophilus* isolated from a traffic accident victim with bacteremia by 16S ribosomal RNA gene sequencing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 40: 125-127.
- Wybo, I.; Breynaert, J.; Lauwers, S.; Linderburg, F. and Houf, K. (2004). Isolation of *Arcobacter skirrowii* from a patient with chronic diarrhea. *J. Of Clin. Microbiol.*, 42: 1851-1852.