



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Facultad de Ciencias

Escuela de Ciencias

PROFESOR PATROCINANTE

DR. HERIBERTO FERNANDEZ

INSTITUTO MICROBIOLOGIA CLÍNICA

FACULTAD DE MEDICINA

MODIFICACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS PATOGÉNICAS DE ARCOBACTER
BUTZLERI POR PASAJES SUCESIVOS POR PERITONEO DE RATÓN

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

PAULA MACARENA CARRIZO BADILLA

VALDIVIA – CHILE

A MIS QUERIDOS PADRES

GRACIAS

AGRADECIMIENTOS

En la realización de la presente tesis de grado, muchas fueron las personas que participaron para obtener finalmente este trabajo, quiero dar las gracias a todos ellos.

A mi maestro, Dr. Heriberto Fernández, por brindarme la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis en el Instituto de Microbiología Clínica, por su confianza y apoyo así como por su guía durante mi trabajo.

Sras. Priscila Muñoz y Luz Epuante, del Instituto de Inmunología de nuestra Universidad, por su importante ayuda y valiosa colaboración.

Muy especialmente quiero agradecer la colaboración a Mario González y María Paz Villanueva, quienes fueron una ayuda incondicional en mi trabajo.

A Fadua Latif, por su enorme paciencia.

A mis queridas tías Isolde y Pati, y Don Pancho, quienes desinteresadamente colaboraron durante estos meses de trabajo.

También agradecer de forma especial a mi amiga Alexandra que siempre tuvo la disposición de ayudarme.

A Cristian Delarce. , María Teresa Ferrada y a Felipe por su gran ayuda.

A mis padres, por su comprensión, confianza, amor y por estar siempre a mi lado.

A todos mis amigos que siempre me apoyaron.

Finalmente agradezco el financiamiento de esta tesis al Proyecto FONDECYT 1030245, DID UACH- 5- 2007- 37, del profesor Heriberto Fernández.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	4
1.1 SUMMARY.....	5
2. INTRODUCCIÓN.....	6
2.1. HIPOTESIS DE TRABAJO.....	13
2.1.1. OBJETIVO GENERAL	
2.1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
4. RESULTADOS.....	22
5. DISCUSIÓN.....	34
5.1 CONCLUSIONES.....	39
6. BIBLIOGRAFÍA.....	40

RESUMEN

El género *Arcobacter* agrupa bacilos Gram negativos, curvos, móviles por flagelación polar, capaces de crecer en condiciones de aerobiosis y de microaerofilia. De hábitats diversos, reconoce como reservorio a diferentes animales, destacando aves y mamíferos. Sin embargo, *A. butzleri* es considerado un patógeno emergente y es 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 e invasión de 3 cepas de *A. butzleri* aisladas de dos orígenes: hígado de pollo y agua, a la línea celular HEp-2.

Todas las cepas en estudio presentaron capacidad de adherirse a células epiteliales HEp-2, y se observó un aumento gradual de ésta mediante pasajes por peritoneo de ratón, lo que permite inferir que *A. butzleri* es capaz de ocupar este mecanismo como primer paso en el desarrollo del proceso infeccioso.

Con respecto a la capacidad de invasión los niveles más altos fueron presentados por la cepa HP12, seguida de la cepa AP5 y por último la cepa AA10 con valores significativos a partir del tercer pasaje.

1.1 SUMMARY

The genus *Arcobacter* comprises Gram-negative, curved rods, motil by polar flagellation. They are able to grow under aerobic and 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 3 *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.

Referred to the invasion capacity, the highest levels were presented by the HP12 strain, followed by the AP5 strain and finally strain AA10 with significant values after the third intraperitoneal.

2. INTRODUCCIÓN

La microbiología ha tenido uno de los avances más importantes dentro de los últimos años, correspondientes al reconocimiento de agentes infecciosos de los cuales poco o nada se sabía al respecto. 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 del tipo viral, bacteriano, parasitario o fúngicos. Estos agentes reciben el nombre de patógenos emergentes y algunos son causantes de enteritis, diarrea aguda, bacteremia y peritonitis, entre otros.

Dentro de estos patógenos emergentes destacan especies del género *Arcobacter*, (del latín *arcus*: arco y del griego *bacter*: bacteria) capaz de provocar diversas infecciones y abortos en animales, como también diversos cuadros clínicos en el hombre, habiendo sido asociada a cuadros de enteritis, diarrea, bacteremias y peritonitis. También se consideran zoonóticos, por lo que adquieren gran importancia en el área de la veterinaria.

Las especies de este género pertenecen a la división *Gracillicutes*, clase *Proteobacteria*, familia *Campylobacteraceae*, la cual 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 seis especies.

A pesar de su creciente importancia como patógeno, existe escasa información sobre variables tan importantes como las vías de transmisión de la bacteria y de sus mecanismos de patogenicidad, tales como sus niveles de invasión, adherencia y producción de citotoxinas, mecanismos por los cuales produce la infección. El conocimiento de éstos resulta de gran utilidad para lograr establecer la forma y los elementos con qué combatirlo, evitando de esta forma los daños que producen a la población humana y animal.

Esta bacteria se aisló por primera vez en 1977 en la ciudad de Belfast, Reino Unido por Ellis *et al.*, 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).

El género *Arcobacter* está formado por bacilos Gram negativos no esporulados, de 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 um de ancho y 0,5 a 3,0 um de largo.

Son móviles por flagelación polar, capaces de crecer en condiciones de aerobiosis y microaerofilia, en un rango de temperatura que va de los 15°C a los 37°C, a diferencia del genero *Campylobacter* que solo 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 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 la especies *C. cryaerophila*, *C. nitrofigilis*, *C. butzleri* y *C. skirrowii*. Estudios posteriores de inmunotipificación e hibridación del DNA-RNA comprobaron que no existe relación genotípica con *Campylobacter*, por lo que se propuso el género *Arcobacter* para agrupar a estos microorganismos (Vandamme y De Ley, 1991).

Recientes estudios han permitido el descubrimiento de dos nuevas especies de *Arcobacter*; *A. cibarius*, (Houf *et al.*, 2005) y *A. halophilus* (Donachie *et al.*, 2005).

Tanto en humanos como en animales han sido aisladas cuatro de las seis especies pertenecientes a este género, *A. butzleri*, es la especie aislada con mayor frecuencia de pacientes con bacteremia, endocarditis, apendicitis, peritonitis y cuadros diarreicos (Atabay *et al.*, 1998; Boer *et al.*, 1996; Fernández *et al.*, 2000; Lauwers *et al.*, 1996; Vandamme *et al.*, 1993). También ha sido aislada de distintos animales como cerdos, caballos, primates, tortugas, fetos abortados de bovinos, ovinos y porcinos, además de productos alimenticios y aguas contaminadas.

A. cryaerophilus, ha sido aislada a partir de pacientes con bacteremia y diarrea, de ganado con mastitis, carcasas de pollo y de fetos abortados de bovinos, ovinos y porcinos (Atabay *et al.*, 1998; Vandamme *et al.*, 1993).

A. skirrowii ha sido asociado con enteritis y ocasionalmente con bacteremia (Lerner *et al.*, 1994; On *et al.*, 1995; Wybo *et al.*, 2004; Lehner *et al.*, 2005).

A. cibarius, ha sido aislada sólo de productos avícolas (Houf *et al.*, 2005).

A. nitrofigilis se relaciona principalmente con la fijación de nitrógeno habiendo sido aislada de raíces de plantas de agua salada como *Spartina alterniflora*. A diferencia de los otros miembros de la familia *Campylobacteraceae* esta especie necesita altas concentraciones de NaCl para su crecimiento (Anderson *et al.*, 1993; Boer *et al.*, 1996; Fernández *et al.*, 1995; Lerner *et al.*, 1994; Nachmkim y Blaser, 2000; On *et al.*, 2002; Villaruel *et al.*, 2003; Zenetti *et al.*, 1996).

A. halophilus una de las especies más recientemente descubiertas. Se aisló por primera vez de las aguas de una laguna hipersalina en la isla de Hawái, siendo considerada el primer halófito obligado de este género.

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, fetos abortados y desde el tracto intestinal de humanos y animales.

Especies de *Arcobacter* también han sido detectadas en reservas de agua, alcantarillados, ambientes salinos y moluscos filtradores. Es por lo cual 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 Blazer; 2000; Villaruel *et al.*, 2003; Zenetti *et al.*, 1996).

La transmisión de *A. butzleri* a humanos se puede llevar a cabo principalmente por la vía de la ingesta de alimentos (mariscos, carnes, subproductos de ave, leche sin pasteurizar y agua contaminada) (Blazer *et al.*, 1983; Fernández, 1988; Fernández *et al.*, 2000; Fox, 1982; Vandamme *et al.*, 1992). Se desconocen mecanismos de transmisión de persona a persona, ya que, hasta el momento sólo se ha trabajado en la identificación de las principales vías de transmisión entre el hombre y los animales (Mansfield *et al.*, 2000).

Debido a la similitud filogenética entre ambos géneros, la patogénesis, distribución y vías de transmisión que se han descrito hasta el momento para *C. jejuni* se podrían aplicar en su conjunto a las especies de *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 (Morgan *et al.*, 1985; Doikoku *et al.*, 1990; Konkel *et al.*, 1990). Estos factores de virulencia, reconocidos en el género *Campylobacter* juegan un rol muy importante en la aparición de una diarrea de tipo secretora, lo que sugiere la producción de enterotoxinas. Por otra parte, la presencia de sangre y leucocitos en las deposiciones de pacientes con enteritis por *Campylobacter Spp.* constituye un síntoma clínico sugerente de un mecanismo invasor, donde la asociación o adherencia de la

bacteria a la superficie de la mucosa intestinal parece ser el evento inicial en la patogénesis de la infección (Lindblom *et al.*, 1989).

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. Por lo 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).

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. Los últimos, 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 estructurales y moleculares 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

(Andrews, 1992; De Melo y Pechere, 1990; por Grant *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1986; Mc Sweegan y Walter, 1986; Newel *et al.*, 1994; Newel *et al.*, 1985).

Por otra parte, dentro de sus mecanismos de patogenicidad, la capacidad de invasión de *Campylobacter* ha sido ampliamente estudiada, habiéndose diseñado variados modelos para tal efecto, tanto *in vivo* como *in vitro*. Los modelos que se han diseñado utilizan embriones de pollo (Field, 1991), intestino de ratones (Newel *et al.*, 1984). Además, se ha estudiado la capacidad invasora en pollos (Ruiz-Palacios, 1981), conejos (Gubina *et al.*, 1982), hámsters (Humphrey *et al.*, 1985), y monos (Russell *et al.* 1989). A su vez, su potencial de invasión ha sido demostrado *in vitro*, utilizando líneas celulares como HeLa, INT 407, Hep-2, CaCo-2 y preparaciones de células de origen no humano (Konkel *et al.*, 1989; Newell *et al.*, 1984; Fauchere *et al.*, 1986; Everest *et al.*, 1992).

Para una determinación rápida *in vitro* en líneas celulares de la internalización de patógenos Gram negativos, Milliotis (1991), propuso el uso de una técnica de tinción simple y rápida, la que utiliza naranjo de acridina y cristal violeta como colorantes.

Con todos los antecedentes antes mencionados, se decidió hacer estudios que permitieran evidenciar si la especie *A. butzleri* presenta como mecanismos de patogenicidad la capacidad de adherencia e invasión, mediante la técnica de adherencia que se conoce convencionalmente y la técnica de invasión usada por Fernández (1983). Para estas pruebas, existe experiencia previa en el laboratorio (Tresierra *et al.*, 1995).

Teniendo en cuenta los antecedentes anteriormente expuestos y con el objeto de reunir mayor información sobre el tema en cuestión, en este trabajo se ha propuesto la siguiente hipótesis de trabajo y sus respectivos objetivos.

HIPOTESIS DE TRABAJO:

A. *butzleri* modifica sus características patogénicas por pasajes sucesivos por peritoneo de ratón.

OBJETIVO GENERAL:

-Establecer si los pasajes por peritoneo de ratón aumentan la patogenicidad de *A. butzleri*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

-Establecer si *A. butzleri* modifica sus capacidades de adherencia e invasión a células epiteliales por pasajes por peritoneo de ratón.

-Establecer cuantitativamente estas modificaciones.

3. MATERIALES Y METODOS

Los ensayos practicados para determinar la capacidad de adherencia y capacidad de invasión de las cepas aisladas de *A. butzleri* fueron realizados en las dependencias del Instituto de Microbiología Clínica de la Facultad de Medicina, de la Universidad Austral de Chile.

MATERIALES

Materiales Biológicos:

Cepas Bacterianas

Para las pruebas de adherencia fueron estudiadas en tres cepas de *A. butzleri*, provenientes del cepario del Instituto de Microbiología Clínica de la Universidad Austral de Chile.

Para este trabajo se utilizaron cepas aisladas a partir de macerados de hígado de pollo obtenidos de subproductos de venta comercial y filtrados de agua del río calle-calle/Valdivia.

Línea Celular

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

Animales de Experimentación:

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

Reactivos:

Alcohol-acetona, alcohol, base agar, extracto de levadura, fucsina fenicada, lugol, metanol 40%, PBS estéril, RPMI, suero bovino fetal sin antibióticos y con antibióticos, naranja de acridina, tioglicolato, violeta de metilo, solución de Hank`s.

Equipos:

Autoclave Orthmann, Balanza Chyo, estufa, microscopio óptico, contraste de fase y fluorescencia Carl Zeiss, refrigerador Sindelen, Vortex Thermoline.

Otros:

Aceite de inmersión, algodón, asa de siembra, esmalte transparente, gradillas, guantes de látex, lápiz marcador, matraces Erlenmeyer, mechero, membranas de filtración, micropipetas, pinzas, pipetas Pasteur, placas Petri, portaobjetos, probetas, puntas para micropipetas, tómulas, tubos de ensayo, varilla de agitación, tubos Eppendorf, tubos Leighton, placas de cultivo Nuc Lab-Tek, nefelómetro de Mcfarland N° 2.

MÉTODO

Recuperación de Cepas

Las cepas de *A. butzleri*, fueron descongeladas y sembradas en agar sangre, incubando en condiciones de 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.

Ensayo del Aumento de la Capacidad de Adherencia por Pasajes Consecutivos en Peritoneo de Ratón.

Se preparó una suspensión bacteriana con una densidad aproximada al tubo N° 2 del Nefelómetro de McFarland para inocular intraperitonealmente con 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 y tomar muestras de líquido peritoneal y de sangre por punción cardiaca, para ser sembradas en agar sangre.

Las placas de agar fueron incubadas por 48 hrs a 26° 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 la capacidad de adherencia e invasión de las cepas recuperadas, mediante el ensayo en células HEp-2 descrito a continuación.

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 e invasión se prepararon monocapas de células HEp-2 en placas de cultivos celulares Nuc Lab-Tek de 24 pocillos, conteniendo cada uno de ellos cubreobjetos estériles. Cada placa fue sembrada con $1,0 \times 10^5$ células HEp-2 por ml, e incubadas por 18 hrs a 36° C. Posteriormente, se controló el estado de las células y la pureza de los cultivos mediante microscopio invertido.

Estudio de la Capacidad de Adherencia e Invasión.

Para el estudio de la capacidad de adherencia e invasión de *A. butzleri*, se pusieron en práctica dos técnicas que permiten apreciar el comportamiento de la bacteria en dos

situaciones diferentes, es decir, variando los periodos de incubación, constituyéndose esto en parte de sus probables mecanismos de patogenicidad.

Ensayo de la Capacidad de Adherencia.

Para realizar los ensayos de adherencia, los inóculos bacterianos fueron sembrados en placas de agar sangre e incubados a 26° C durante 48 horas, en ambiente de aerobiosis. Posteriormente, y una vez verificada la pureza de los cultivos, se realizó un subcultivo, esta vez durante 24 horas, en idénticas condiciones. Se examinaron las colonias para verificar microscópicamente la forma espiralada del bacilo, y su pureza mediante tinción de Gram.

Se preparó una suspensión bacteriana con una densidad igual a la del tubo N°2 del Nefelómetro de McFarland (aproximadamente 10^8 bacterias/ml) en RPMI, con un 10% de suero bovino fetal sin antibióticos. De esta suspensión se inoculó 1ml en cada pocillo que contenían cubreobjetos con las monocapas semiconfluentes de células HEP-2 adheridas a ellos.

Las monocapas fueron incubadas durante 3 horas a 37° C en un ambiente con 5% de CO₂ (microaerofilia) para permitir que las bacterias se adhieran a las células. Cada ensayo se realizó en duplicado.

Posteriormente las monocapas celulares fueron lavadas 5 veces con solución de Hank`s para luego, ser fijadas con metanol 40% durante 15 minutos y luego ser teñidos con May Grünwald-Giemsa y solución Giemsa al 0,01 %.

Los cubreobjetos fueron sacados de las placas de cultivo y se montaron en portaobjetos para cuantificar el fenómeno de adherencia que se realizó mediante microscopía de contraste de fase (aumento de 100x), contándose un total de 100 células (en duplicado) por portaobjetos.

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.

La metodología y la interpretación de estas pruebas se hicieron de acuerdo con la técnica en uso en el laboratorio (Fernández, *et al.*, 1996).

Capacidad Invasora.

Para realizar los ensayos de invasión, las células en estudio fueron sembradas en placas de agar sangre e incubados a 26° C durante 24 horas en ambiente de aerobiosis. Posteriormente, y una vez verificada la pureza de los cultivos, se realizó un subcultivo durante 24 horas en condiciones idénticas. Se examinaron las colonias para verificar microscópicamente la forma espiralada del bacilo y su pureza, mediante la tinción de Gram. De acuerdo a lo anterior, se hizo una suspensión bacteriana con una densidad igual al tubo N° 2 del Nefelómetro de McFarland en RPMI, con 10% de suero bovino fetal sin antibióticos. Los ensayos se realizaron en duplicado y se utilizó como control negativo a células HEp-2 en RPMI sin inóculo bacteriano y como control positivo una cepa de *Shigella Spp.* de invasión comprobada.

Para que se produzca la infección de las células, las monocapas fueron incubadas a 37° C durante 3 horas, con un 5% de CO₂. Durante este periodo se produce la adherencia y posterior invasión a la célula. Transcurrido este tiempo, las monocapas celulares fueron lavadas 8 veces con solución de Hank`s y se agregó 1 ml de RPMI a cada pocillo. Acto seguido se realizó una segunda incubación de las monocapas celulares, durante 2 horas, en las mismas condiciones descritas anteriormente, para permitir que las bacterias que han invadido a las células se multipliquen dentro de la misma. Transcurrido este periodo, las monocapas fueron lavadas 3 veces con solución de Hank`s para su posterior tinción.

Para evidenciar la capacidad de invasión de las cepas estudiadas, se utilizó la tinción AO-CV (Milliotis, 1991) la que consiste en la tinción de los cubreobjetos, luego del tiempo de incubación, con naranja de acridina al 0,01% en solución de Gey (Gibco) durante 45

segundos, para después lavar con solución de Hank`s, seguido de una tinción con cristal violeta al 0,05% en 0,15N NaCl por 1 minuto.

Los cubreobjetos fueron extraídos de los pocillos, dejándolos secar a temperatura ambiente y posteriormente montados sobre portaobjetos nuevos y sellados con esmalte transparente, quedando listos para su observación con microscopía de epifluorescencia, con aumento de 100x. Los resultados fueron expresados en términos del porcentaje de células invadidas y el número de bacterias que invadió cada célula, realizando el conteo de 100 células por cada preparación y en duplicado.

Para la diferenciación entre bacterias adheridas a las células y bacterias invasoras se utilizaron distintos tipos de tinción.

4. RESULTADOS

Se estudió la capacidad de adherencia e invasión de 3 cepas de *A. butzleri* aisladas de dos orígenes distintos, AP5 y AA10 aisladas de agua de río y la cepa HP12 aislada de hígado de pollo.

Todas las cepas presentaron capacidad de adherencia a células epiteliales HEp-2 *in vitro* tras los pasajes por peritoneo de ratón aumentaron su capacidad de adherencia, los porcentajes de esta fueron aumentando progresivamente desde un 31 a un 80% en el quinto pasaje.

Los resultados obtenidos de la capacidad de adherencia se muestran en las tablas N° 1, 2 y 3. Además, se presentan los resultados de la cuantificación de bacterias por célula.

En el gráfico N° 1 se muestran los porcentajes de adherencia obtenidos para la cepa AP5.

En el gráfico N° 2 se muestran los porcentajes de adherencia obtenidos para la cepa HP12.

Y el gráfico N° 3 muestra los porcentajes de adherencia obtenidos para la cepa AA10.

Los porcentajes de adherencia de cada cepa se muestran en su conjunto en el gráfico N° 7.

Los resultados obtenidos de la capacidad de invasión se muestran en las tablas N° 4, 5 y 6.

En el gráfico N° 4 se muestra los porcentajes de invasión obtenidos de la cepa AP5.

En el gráfico N° 5 se muestran los porcentajes de invasión obtenidos de la cepa AA10 y en el gráfico N° 6 se pueden observar los porcentajes de invasión de la cepa HP12.

Además en el gráfico N° 8, se presentan los resultados de la cuantificación del porcentaje de invasión de cada cepa a lo largo de los cinco pasajes.

Los porcentajes de invasión para la cepa AA10, sólo fueron significativos a partir del pasaje N° 3.

Para la cepa HP12 el menor porcentaje de invasión fue de 22% y el mayor de 34,5 y para la cepa AP5 los porcentajes fueron un 22% llegando a un máximo de invasión del 31%.

En las dos últimas cepas mencionadas los porcentajes de invasión si fueron significativos, pero con valores bastante bajos.

Tabla 1: Capacidad de adherencia de la cepa AP5 de *A. butzleri* a células Hep-2 y cuantificación de bacterias adheridas por célula y su desviación estándar.

Número de pasajes cepa AP5	$\bar{X} \pm D.E$ Nº de bacterias/células	% de Adherencia
0	1,58 ± 1,25	44,5
1	3,77 ± 3,07	51
2	2,96 ± 1,33	62,5
3	4,09 ± 2,43	68
4	2,75 ± 1,75	66,5
5	2,25 ± 1,81	62

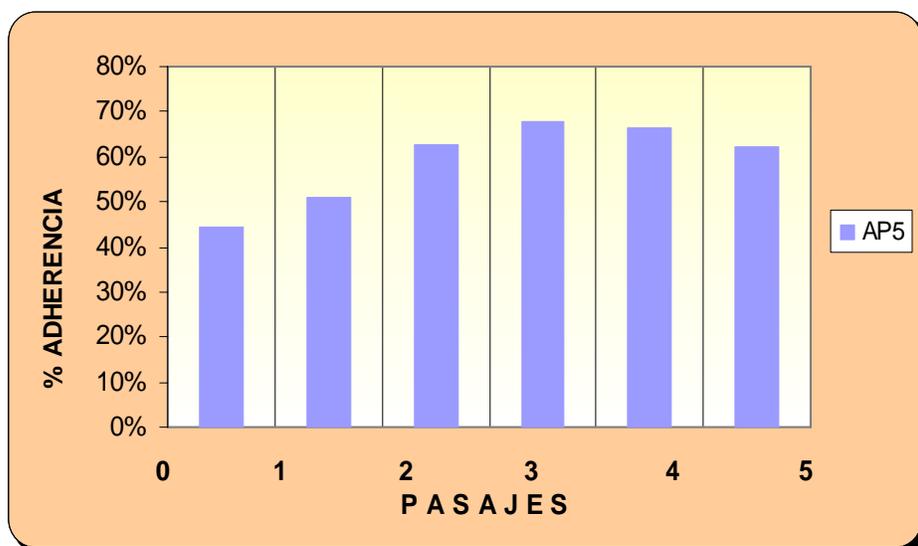


GRÁFICO N ° 1: porcentajes de adherencia de la cepa AP5.

Tabla 2: Capacidad de adherencia de la cepa HP12 de *A. butzleri* a células Hep-2 y cuantificación de bacterias adheridas por célula y su desviación estándar.

Número de pasajes cepa HP12	$\bar{X} \pm D.E$ N° de bacterias/células	% de Adherencia
0	1.49 ± 0.93	45
1	2.66 ± 1.32	53
2	1.87 ± 1.33	47.5
3	1.65 ± 0.96	53
4	2.26 ± 1.51	59
5	1.57 ± 1.10	53

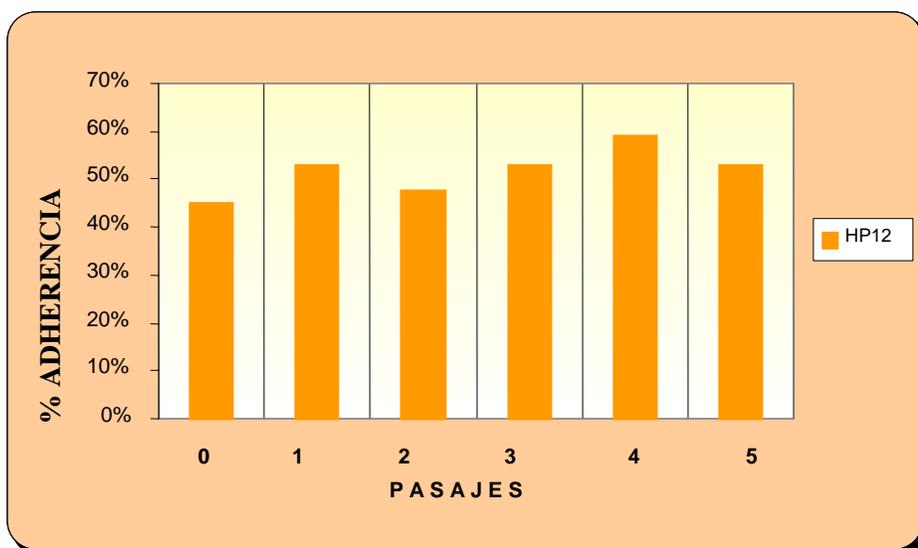


GRÁFICO N ° 2: porcentaje de adherencia de la cepa HP12.

Tabla 3: Capacidad de adherencia de la cepa AA10 de *A. butzleri* a células Hep-2 y cuantificación de bacterias adheridas por célula y su desviación estándar.

Número de pasajes cepa AA10	$\bar{X} \pm D.E$ N° de bacterias/células	% de Adherencia
0	0.96 ± 0.61	31
1	1.72 ± 1.04	46.5
2	1.74 ± 1.01	59.5
3	2.14 ± 1.62	58.5
4	3.55 ± 1.18	73.5
5	4.09 ± 3.42	80.5

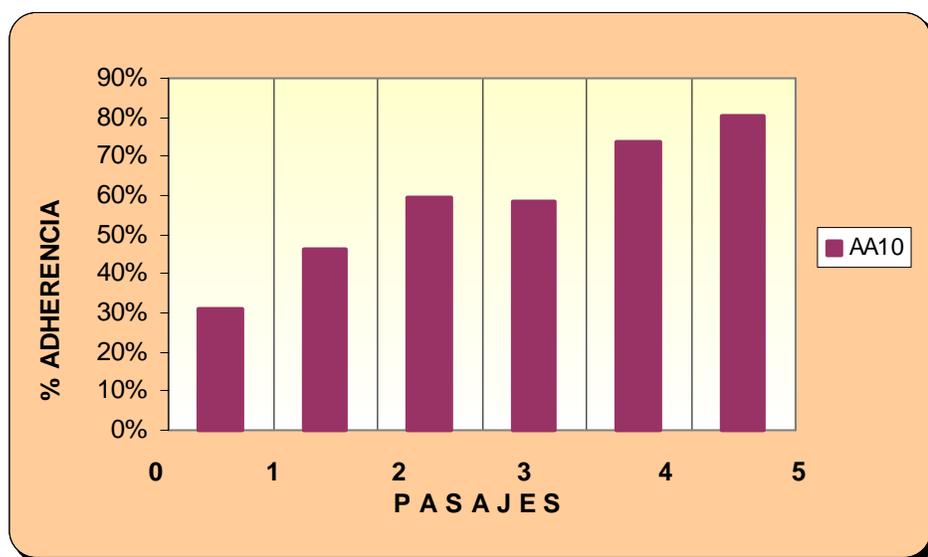


GRÁFICO N ° 3: porcentaje de adherencia de la cepa AA10.

Tabla 4: Capacidad de invasión a células epiteliales HEP-2 de la cepa AP5 de *A. butzleri* y cuantificación del promedio de las bacterias invasivas por célula, con su respectiva desviación estándar.

Número de pasajes cepa AP5	$\bar{X} \pm D.E$ N° de bacterias/células	% de Invasión
0	0.51 \pm 0.36	22
1	0.53 \pm 0.41	22
2	1.00 \pm 0.71	26
3	0.90 \pm 0.83	28
4	0.91 \pm 0.63	27.5
5	0.71 \pm 0.56	31

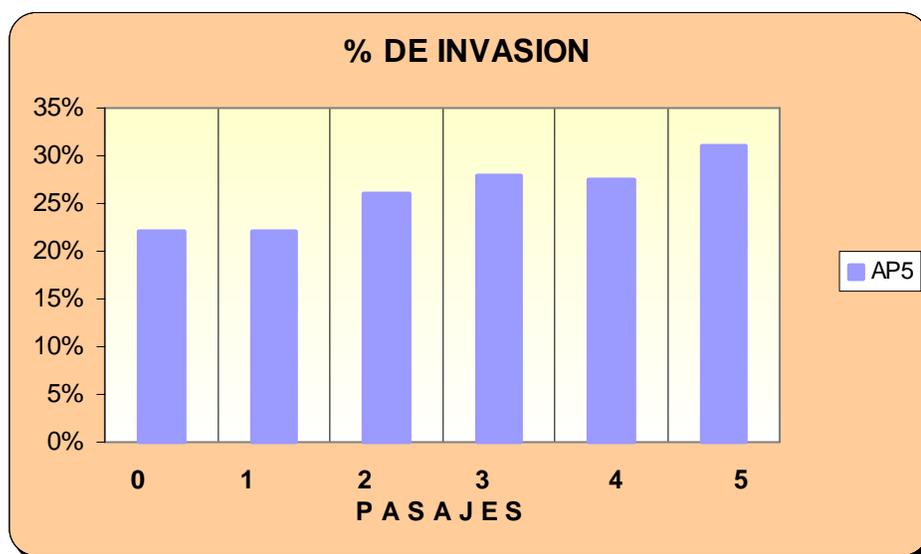


GRÁFICO N° 4: porcentaje de invasión de la cepa AP5.

Tabla 5: Capacidad de invasión a células epiteliales HEp-2 de la cepa AA10 de *A. butzleri* y cuantificación del promedio de las bacterias invasivas por célula, con su respectiva desviación estándar.

Número de pasajes cepa AA10	$\bar{X} \pm D.E$ N° de bacterias/células	% de Invasión
0	0.50 ± 0.31	17.5
1	0.51 ± 0.33	16.5
2	0.64 ± 0.46	19.5
3	0.63 ± 0.42	22
4	0.73 ± 0.55	20.5
5	0.64 ± 0.46	21

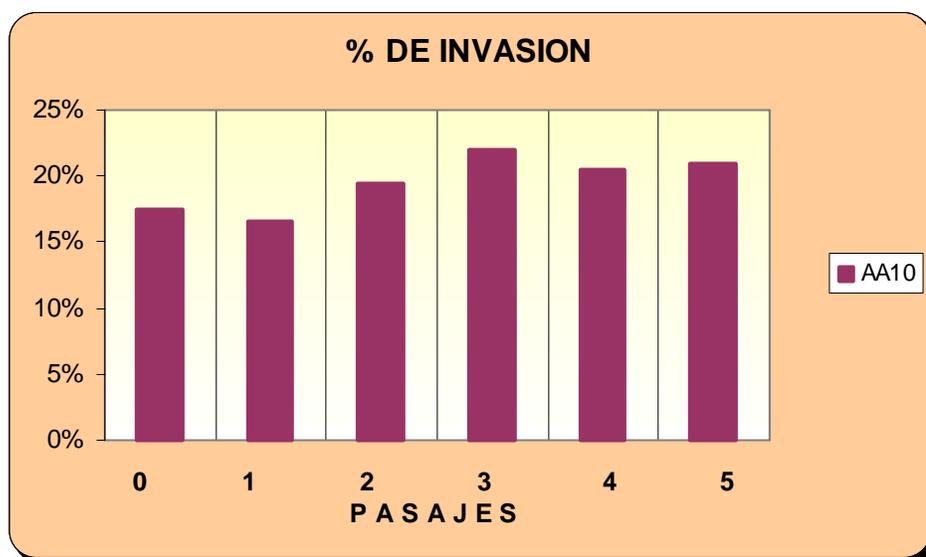


GRÁFICO N° 5: porcentaje de invasión de la cepa AA10.

Tabla 6: Capacidad de invasión a células epiteliales HEp-2 de la cepa HP12 de *A. butzleri* y cuantificación del promedio de las bacterias invasivas por célula, con su respectiva desviación estándar.

Número de pasajes cepa HP12	$\bar{X} \pm D.E$ N° de bacterias/células	% de Invasión
0	0.72 ± 0.41	28
1	0.65 ± 0.47	22
2	0.78 ± 0.46	34.5
3	0.78 ± 0.54	25.5
4	0.86 ± 0.70	31
5	0.79 ± 0.69	28.5

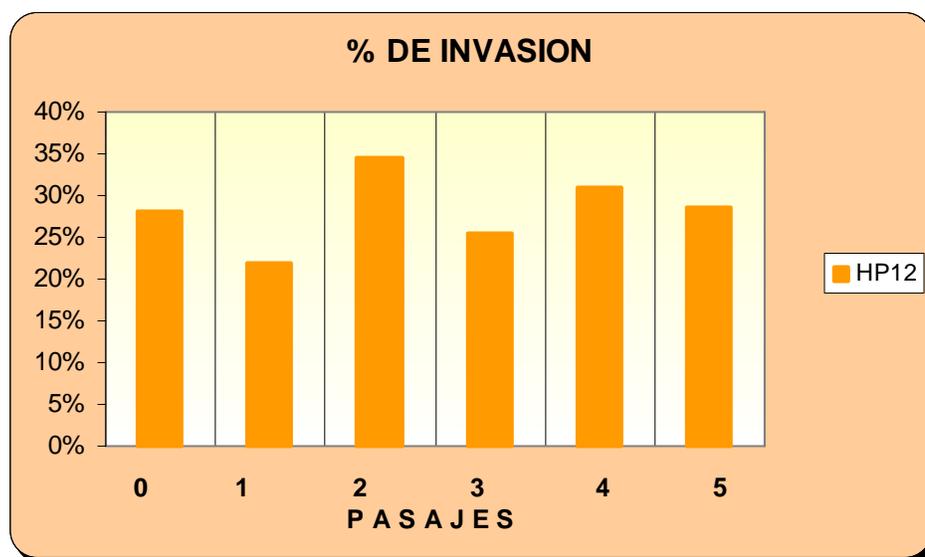


GRÁFICO N° 6: porcentaje de invasión de la cepa HP12.

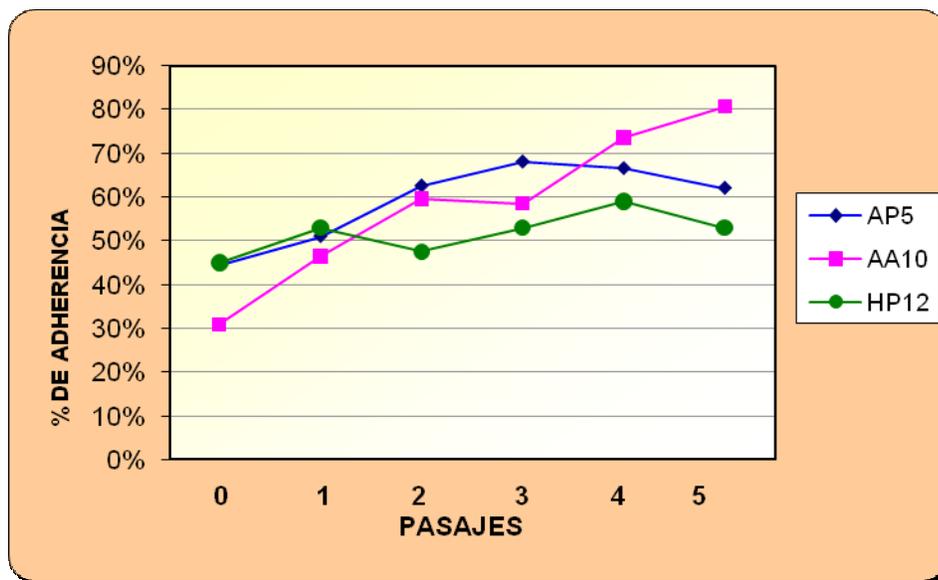
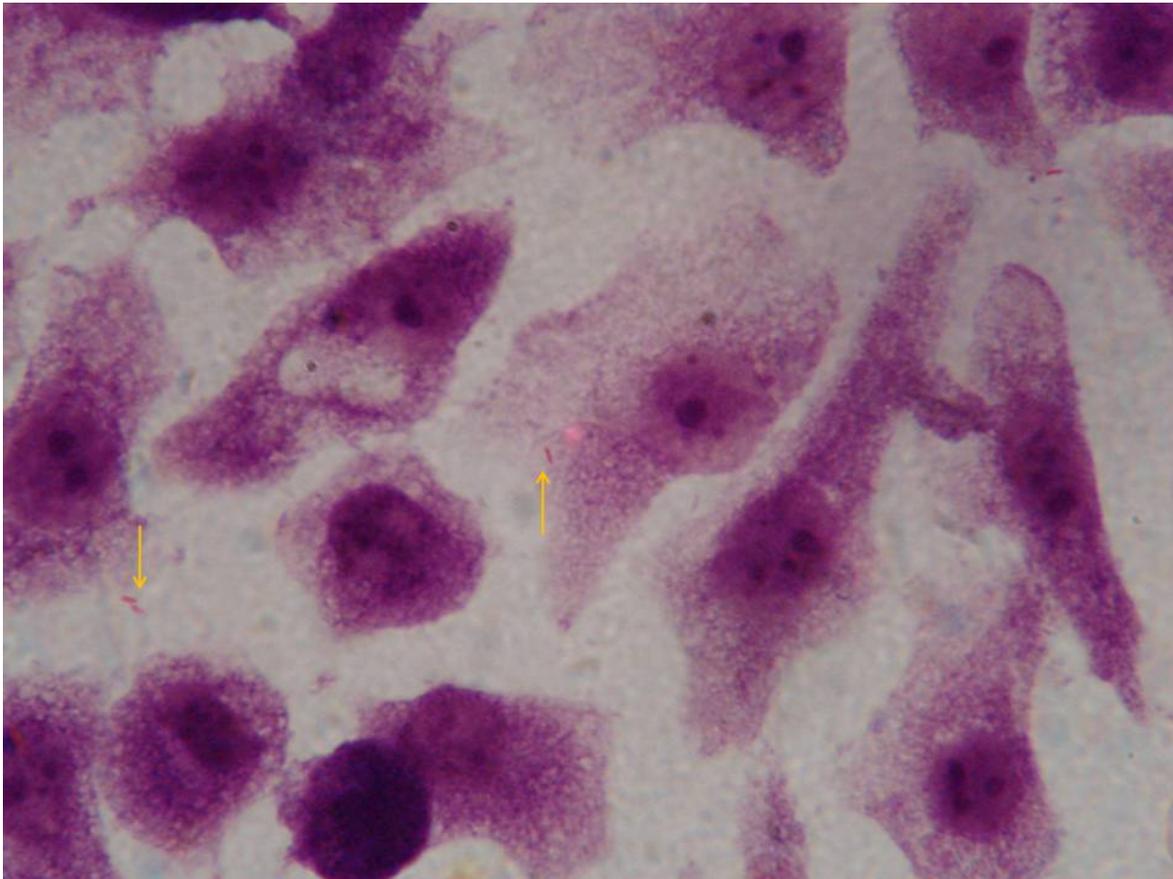


Gráfico N° 7: capacidad de adherencia de cada una de las cepas estudiadas.

Figura N° 1: bacilos Gram negativos curvos adheridos a células HEp-2, donde se utilizó técnica convencional para adherencia y fueron teñidos con May Grünwald-Giemsa.



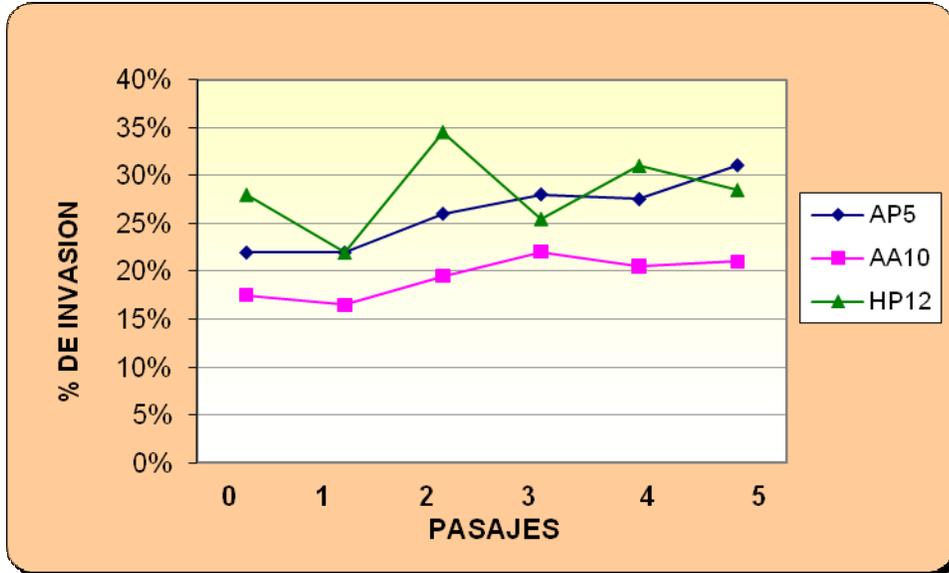
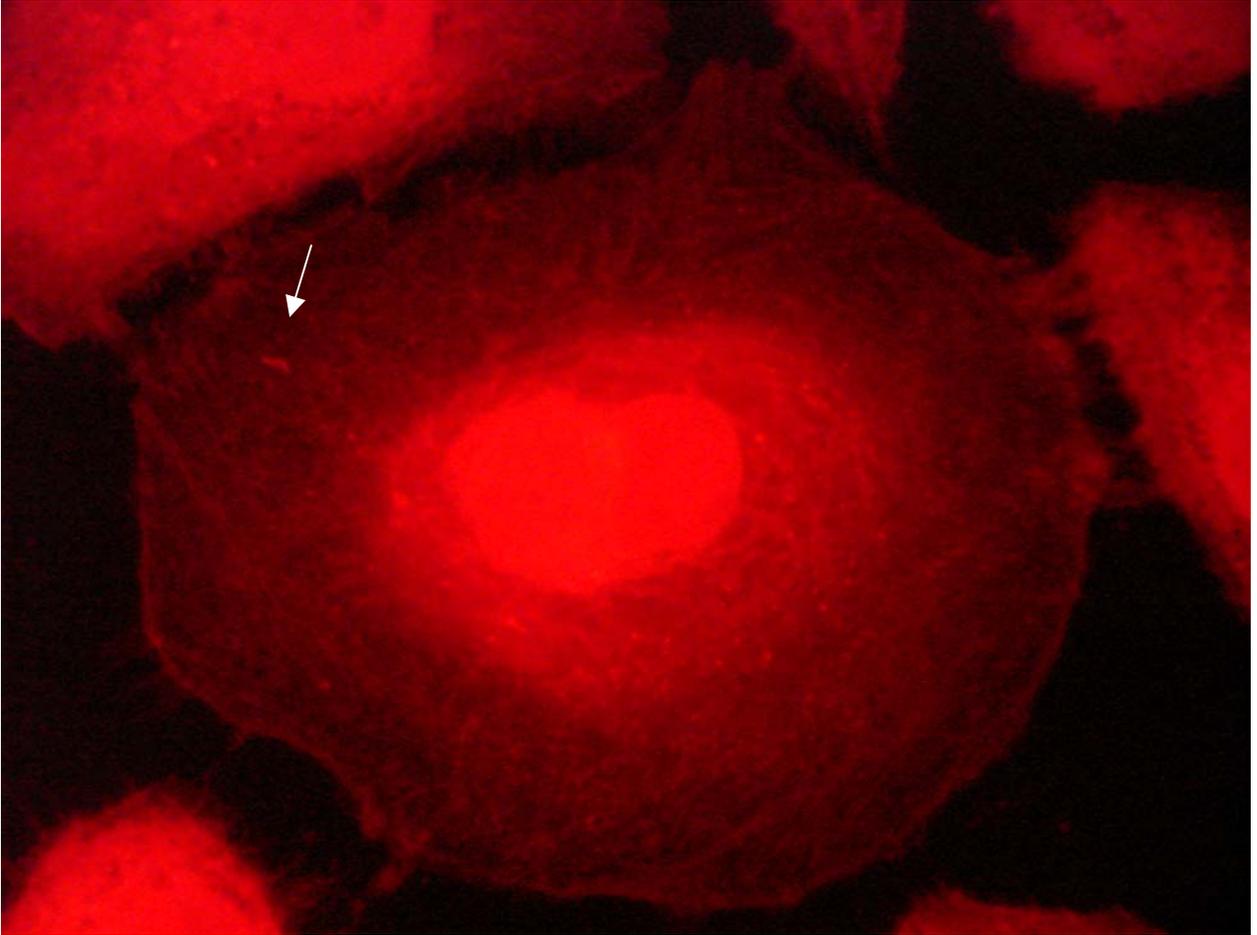


Gráfico N° 8: capacidad de invasión de cada una de las cepas estudiadas.

Figura N° 2: bacilos Gram negativos curvos en el interior de células HEp-2, la foto fue obtenida por microscopía de epifluorescencia. Aumento de 1000x.



5. DISCUSIÓN

Como ya se ha mencionado, *A. butzleri* forma parte de una gama de patógenos emergentes, y es capaz de causar diversos cuadros clínicos en el hombre, siendo asociada a bacteremias, apendicitis, peritonitis, enteritis y diarrea aguda, además de distintas infecciones y abortos en animales, los que pueden ser ovinos bovinos y porcinos, 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.

Debido a la similitud entre *C. jejuni* y *A. butzleri* en cuanto a características filogenéticas, patogénesis, distribución y vías de transmisión, es posible establecer similitudes y diferencias entre ambas especies.

La penetración a la matriz viscosa se ve facilitada por la forma en espiral y la motilidad de *C. jejuni* (movimiento típico en “tirabuzón o sacacorchos”), que es igual al movimiento que presenta *A. butzleri* (Fernández *et al.*, 2000). Además se ha sugerido que la patogenicidad de *C. jejuni* podría atribuirse a una adaptación particular al mucus de las criptas intestinales, las cuales parecen ser un lugar importante para la colonización por *C. jejuni* (Fauchere *et al.*, 1986).

Diversos modelos *in vitro* e *in vivo* han sido utilizados para estudiar la capacidad de adherencia en *campylobacterias* a una gran variedad de líneas celulares, animales

de experimentación y embriones de pollo, donde 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 el presente trabajo se determinó *in vitro* los fenómenos de adherencia e invasión en cepas de *A. butzleri* aislados de distintos orígenes, a líneas celulares HEP-2 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.

Los resultados obtenidos en este estudio, muestran que todas las cepas de *A. butzleri* estudiadas fueron adherentes.

En esta investigación, se pudo determinar la relación entre el número de bacterias que se adhieren a la célula y el porcentaje de adherencia de la cepa, con lo que se pudo observar finalmente que a mayor porcentaje de adherencia de la cepa, se encuentra un mayor número de bacterias adheridas a la célula. Esto sugiere la existencia de una posible asociación entre el porcentaje de adherencia y el número de bacterias adheridas por célula.

Los resultados obtenidos para *A. butzleri* son similares a las observaciones de algunos autores acerca de la capacidad de adherencia de *C. jejuni* (Konkel y Joens 1989;

Andrews 1992). Estas observaciones permiten inferir que *A. butzleri* utiliza la adherencia como primer paso en la producción de una infección.

Los resultados obtenidos con cepas de *A. butzleri* aisladas de agua de río difieren en forma importante de los obtenidos en diversos trabajos en relación con *C. jejuni* aislado también de agua. Newel *et al.* (1984) establecieron que las cepas aisladas de agua fueron menos virulentas que las cepas aisladas de muestras clínicas, lo que para ellos sugería que las cepas ambientales serían menos patógenas. En este trabajo no se estudiaron cepas de *Arcobacter* aisladas de muestras clínicas por lo que no podemos hacer comparaciones semejantes a las realizadas con *Campylobacter*.

En cuanto a la capacidad invasora, se puede decir que este mecanismo involucra factores tanto de la bacteria, como de la célula huésped. Inicialmente ocurre la adherencia al epitelio y las estructuras bacterianas involucradas en este proceso, los que son llamados factores de colonización, los que han sido ampliamente estudiados y entre ellos se encuentran proteínas de membrana externa (OMPs), el flagelo y la motilidad bacteriana (Soto-Ramirez *et al.*, 1989; Grant *et al.*, 1993).

Diversos modelos *in vitro* han sido utilizados para estudiar la capacidad invasora de *C. jejuni* a una gran variedad de líneas celulares, a través de los cuales se ha podido determinar que la bacteria es internalizada en la célula huésped por un mecanismo directo, tipo fagocitosis (Fauchere, 1986; De Melo, 1989).

En este estudio se determinó la capacidad invasora de cepas de *A. butzleri* a líneas celulares HEp-2, utilizando la técnica de tinción de naranjo de acridina-cristal violeta (AO-CV) descrita por Milliotis (1991), mediante la cual es posible observar bacterias espiraladas viables de color verde fluorescente ubicadas intracelularmente.

Esta técnica de doble tinción (AO-CV) permite la observación en forma directa mediante el uso de microscopía de epifluorescencia únicamente a las bacterias internalizadas, como fue demostrado por Milliotis (1991) para enteropatógenos con capacidad invasora, diferentes a *Campylobacter*, en comparación con otros métodos, en los cuales es difícil diferenciar entre las bacterias intracelulares y las extracelulares. Esta técnica requiere monocapas celulares no fijadas, lo que puede ser considerado una desventaja, ya que las preparaciones no pueden ser almacenadas por períodos muy largos de tiempo. Sin embargo, la realización de esta técnica de tinción resultó ser relativamente simple, reproducible y cuantitativa.

En el estudio del fenómeno de invasión, realizado a las cepas de *A. butzleri*, los resultados obtenidos muestran que un 83% de las cepas trabajadas fueron invasoras, dato obtenido mediante la diferencia entre los porcentajes significativos y los que no lo fueron.

Para expresar los resultados de esta técnica, se aplicó el criterio de Lindblom, en donde también se debe tener un mínimo de 20% de invasividad para considerar una cepa como invasora. Con estos resultados se puede inferir que *A. butzleri*, utiliza la invasión como parte de los mecanismos que llevan a la producción de una infección.

En cuanto al número de bacterias por células, este presentó una distribución muy similar a la observada para el fenómeno de adherencia, encontrándose células con pocas bacterias, lo que coincide con las cepas que presentaron los más bajos porcentajes de invasión y a la vez se presentaron células con una gran cantidad de bacterias, coincidiendo esto con las cepas de mayor porcentaje de invasión. En este punto también se puede decir que las cepas que presentaron altos porcentajes de adherencia también presentaron altos porcentajes de invasión.

Con este estudio se ha podido establecer que la especie *A. butzleri* presenta capacidad de adherencia y capacidad de invasión a líneas celulares HEP-2 luego de ser sometidas a pasajes intraperitoneales de ratón., luego de este primer paso se vuelve necesario realizar otro tipo de estudios en donde se pueda determinar a cabalidad el mecanismo preciso que utiliza la especie para adherirse y para invadir líneas celulares y lo que sería más importante aún, establecer el comportamiento frente a otro tipo de líneas celulares y diferentes estímulos que permitieran dilucidar de buena forma la manera de actuar de las cepas de *Arcobacter butzleri* en el interior de un huésped como el hombre.

6. CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos y analizados se puede concluir lo siguiente:

- *A. butzleri* presenta como eventual mecanismo de patogenicidad la adherencia a células epiteliales.
- Las tres cepas estudiadas aumentaron su capacidad de adherencia luego de ser sometidas a pasajes por peritoneo de ratón por lo que es posible inducir o aumentar la capacidad de adherencia en *A. butzleri*.
- Las cepas de *A. butzleri* AP5 y HP12, resultaron ser invasoras de las células utilizadas en el ensayo, en un 100%.
- La cepa AA10 fue invasora solo a partir del pasaje N° 3.
- La capacidad invasora de la cepa AA10 es menor que las de las cepas HP12 y AP5, por lo que se puede concluir que los pasajes por peritoneo de ratón no influyen de manera significativa en su capacidad invasora.

7. LITERATURA CITADA

- Anderson. K; Kiehlbauch. J; Anderson. D; McClure. H y Wachsmuth. I., 1993. *Arcobacter (Campylobacter) butzleri*-associated diarrheal illness in a nonhuman primate population. *Infection Immunology* 61: 2220-2223.
- Assanta. M; Denis. R; Lemay. M y Montpetit. D., 2002. Attachment of *Arcobacter butzleri*, a New Waterborne Pathogen, to Water Distribution Pipe Surfaces. *Journal of Food Protection* 65: 1240-1247.
- Atabay. H y Aydin. F., 2001. Susceptibility of *Arcobacter butzleri* to 23 antimicrobial agents. *Lett Appl Microbiology* 33: 430-433.
- Atabay. H y Corry. J., 1997. The prevalence of *Campylobacter* and *Arcobacter* in broiler chickens. *J Appl Microbiology* 83: 619-626.
- De Oliveira. S; Baetz. A; Wesley. I y Harmon. K., 1997. Classification of *Arcobacter* species isolated from aborted pig fetuses and sows with reproductive problems in Brazil. *Vet Microbiology* 57: 347-354.
- Dickson. J; Manke. T; Wesley. I y Baetz. A., 1995. Biphasic culture of *Arcobacter* spp. *International Journal of Food Microbiology* 22: 195-198.
- Fernández, H.; Folch, H.; Eller, G.; Navarrete, N.; Andrews, E.; Gajardo, T. Intervención del flagelo de *Campylobacter jejuni* Subs. *jejuni* en la adherencia a cultivos celulares: evidencias bacteriológicas e inmunológicas. *Rev. Méd. Chile* 124:1029-1035,1996.

- Fernández. H; Eller. G; Paillacar. J; Gajardo. T y Riquelme. A., 1995. Toxigenic and Invasive Capacities: Possible Pathogenic Mechanisms in *Arcobacter cryaerophilus*. Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 90: 633-634.
- Fernández. H; Krause. S; Villanueva. M., 2004. *Arcobacter butzleri* an Emerging Enteropathogen: Communication of two cases with chronic diarrhea. Brazilian Journal of Microbiology 35: 216-218.
- Fernández. H; Lobos. M y Concha. M., 1999. Inducing Enterotoxigenic Properties in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by Serial Intraperitoneal Passage in Mice. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94: 101-102.
- Fera. M; Maugeri. T; Giannone. M; Gugliandolo. C; La Camera. E; Blandino. G y Carbone. M., 2003. *In vitro* susceptibility of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* to different antimicrobial agents. International Journal of Antimicrobial Agents 21: 488-491.
- Figueroa. G., 2000. Estratégias para prevenir la contaminación microbiana: Patógenos Alimentarios Emergentes. Revista Chilena de Nutrición 27: 332-339.
- Golla. S; Murano. E; Johnson. L; Tipton. N; Cureington. E y Savell. J., 2002. Determination of the Occurrence of *Arcobacter butzleri* in Beef and Dairy Cattle from Texas by Various Isolation Methods. Journal of Food Protection 65: 1849-1853.
- Gude. A; Hillman. T; Helps. C; Allen. V y Corry. J., 2005. Ecology of *Arcobacter* species in chicken rearing and processing. Letters in Applied Microbiology 41: 82-87.

- Harrass. B, Schwarz S y Wensel S., 1998. Identification and characterization of *Arcobacter* isolates from broilers by biochemical tests, antimicrobial resistance patterns and plasmid analysis. Zentralbl Veterinarmed 45: 87-94.
- Higgins. R; Messier. S; Daignault. D y Lorange. M., 1999. *Arcobacter butzleri* isolated from a diarrheic non-human primate. Lab Anim 33: 87-90.
- Ho. T; Lipman. L; Van der Graaf. L; Van Bergen. M y Gaastra. W., 2006. Potential routes of acquisition of *Arcobacter* species by piglets. Veterinary Microbiology 114: 123-133.
- Ho. T; Lipman. L y Gaastra. W., 2006. *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential fooborne zoonotic agent. Veterinary Microbiology 115: 1-13.
- Houf. K; Devriese. L; De Zutter. L; Van Hoof. J y Vandamme. P., 2001. Development of a new protocol for the isolation and quantification of *Arcobacter* species from poultry products. International Journal of Food Microbiology 71: 189-196.
- Houf. K y Stephan. R., 2006. Isolation and characterization of the emerging foodborn pathogen *Arcobacter* from human stool. Journal of Microbiological Methods 20: 30-30.
- Jacob. J; Woodward. D; Feuerpfeil. I y Johnson. W., 1998. Isolation of *Arcobacter butzleri* in raw water and drinking water treatment plants in Germany. Zentralbl Hyg Umweltmed 201: 189-198.

- Jacob. J; Lior. H y Feuerpfeil. I., 1993. Isolation of *Arcobacter butzleri* from a drinking water reservoir in eastern Germany. Zentralbl Hyg Umweltmed 193: 557-562.
- Johnson. G y Murano. A., 1999. Comparison of Three Protocols for the Isolation of *Arcobacter* from Poultry. Journal of Food Protection 6: 610-614.
- Johnson. G y Murano. A., 1999. Development of a new medium for the isolation of *Arcobacter* spp. Journal of Food Protection 62: 610-614.
- Konkel. M y Joens. L., 1989. Adhesion to and Invasion of HEp-2 Cells by *Campylobacter* spp. Infection and Immunity 57: 2984-2990.
- Lerner. J; Brumberger V y Preac-Mursic V., 1996. Severe diarrhea associated with *Arcobacter butzleri*. Lett Appl Microbiology 13: 660-662.
- Lehner. A; Tasara. T y Stephan. R., 2005. Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen. International Journal of Food Microbiology 102: 127-135.
- Maugeri. T; Gugliandolo. C; Carbone. M; Caccamo. D y Fera. M., 2000. Isolation of *Arcobacter* spp. From a brackish environment. New Microbiology 23: 143-149.
- Moreno. Y; Alonso. J; Botella. S; Ferrús. M y Hernández. J., 2004. Survival and injury of *Arcobacter* after artificial inoculation into drinking water. Research in Microbiology 155: 726-730.

- On. L; Stacy. A y Smyth. J., 1995. Isolation of *Arcobacter butzleri* from a neonate whit bacteremia. *Journal of Infection* 31: 225-227.
- On. L; Jensen. K.; Hansen- Bille. V; Jorsal. E. y Vandamme, P., 2001. Prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. Isolated from the internal organs of spontaneous porcine abortions in Denmark. *Veterinary Microbiology* 85: 159-167.
- Phillips. C., 2001. *Arcobacter* as emerging human foodborne pathogens. *Food Control* 12: 1-6.
- Phillips C., 2001. *Arcobacter* spp in food: isolation, identification and control. *Food Science and Technology* 12: 263-275.
- Rice. E; Rodgers. M; Wesley. I; Johnson. C y Tanner. S., 1999. Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water. *Lett Appl Microbiology* 28: 31-35.
- Rivas. L; Fegan. N y Vanderlinde. P., 2004. Isolation and characterization of *Arcobacter butzleri* from meat. *International Journal of Food Microbiology* 91: 31-41.
- Snelling. W; Matsuda. M; Moore. J y Dooley. J., 2005. Under the Microscope: *Arcobacter*. Journal compilation, *Letters in Applied Microbiology*, The Society for Applied Microbiology 42: 7-14.
- Stampi. S; De Luca. G; Varoli. O y Zanetti. F., 1999. Occurrence, removal and seasonal variation of thermophilic *Campylobacters* and *Arcobacter* in sewage sludge. *International Journal of Food Microbiology* 62: 456-462.

- Suarez. D; Wesley. I y Larson. D., 1997. Detection of *Arcobacter* species in gastric samples from swine. *Vet Microbiology* 57: 325-336.
- Vandamme. P y De Ley. J., 1991. Proposal for a New Family, *Campylobacteraceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41: 451-455.
- Villarruel. L; Garay Martínez. L; Jimenes Pelayo. P; Torres Vitela. R y Mota de la Garza. L., 2000. Investigación de la Patogenicidad de cepas de *Arcobacter* spp. aisladas de carnes. Laboratorio de Microbiología Sanitaria, Universidad de Guadalajara.
- Wesley. I y Baetz. A., 1999. Natural and Experimental Infections of *Arcobacter* in Poultry. *Poultry Science* 78: 536-545.
- Wesley. I; Baetz. A y Larson. D., 1996. Infection of cesarean-derived colostrums-deprived 1-day-old piglets with *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii*. *Infection Immunology* 64: 2295-2299.
- Wesley. I., 1997. *Helicobacter* and *Arcobacter*: Potential human foodborne pathogens? *Trends in Food Science & Technology* 8: 293-298.
- Wybo. I; Lindenburg. F y Houf. K., 2004. Isolation of *Arcobacter skirrowii* from a Patient with Chronic Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 1851-1852.
- Yan. J; Ko. W; Huang. A; Chen. H; Jin. Y y Wu J., 2000. *Arcobacter butzleri* bacteremia in a patient with liver cirrhosis. *J Formos Med Assoc* 99: 166-169.

- Winters. D y Slavik. M., 2000. Multiplex PCR detection of *Campylobacter jejuni* and *Arcobacter butzleri* in food products. Mol Cell Probes 14: 95-99.

- Zanetti. F; Varoli. O; Stampi. S y De Luca. G., 1996. Prevalence of thermophilic *Campylobacter* and *Arcobacter butzleri* in food of animal origin. International Journal of Food Microbiology 33: 315-321.