

ARTICULO CIENTIFICO

La sangre de cerdo y de vaca como substitutos de la sangre de oveja o caballo en medios de cultivo para *Campylobacters* termotolerantes

Álvaro Tresierra-Ayala*¹, Blanca Diaz B.², Julia Bardales G.², María Bendayán A.², Teresa Mori del A.², Mildred García D.², Edith Ruiz S.², Marjorie Donayre R.², Freddy Espinoza C.² y Carlos Dávila F.²

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Pevas 5ta. Cuadra. Iquitos-
Perú

* atresie rraayala@hotmail.com

1 Microbiólogo

2 Biólogo

RESUMEN

En la ciudad de Iquitos (ubicada en la Amazonia peruana), la sangre de oveja y caballo, uno de los suplementos recomendados para los medios de cultivo de campylobacters termotolerantes, no son tan disponibles como la sangre de cerdo y vaca. Por ello, se estudió la capacidad de crecimiento de 60 cepas de *Campylobacter* termotolerantes (37 *C. jejuni* y 23 *C. coli*), usando sangre de vaca y cerdo como potenciales substitutos de la sangre de oveja o caballo. Estas cepas fueron aisladas de vacas, cerdos, pollos y patos (15 cepas de cada tipo de animal).

Recuentos viables fueron realizados empleando el método de Miles y Misra, modificado. Las cepas de *Campylobacter* mostraron mayor crecimiento en presencia de sangre de cerdo u oveja que con sangre de vaca; por lo que se sugiere el uso de sangre de cerdo como un suplemento de los medios de cultivo para *Campylobacter*, cuando no existe disponibilidad de sangre de oveja o caballo.

Palabras clave: *Campylobacter*; termotolerante, sangre de vaca, sangre de cerdo.

ABSTRACT

Pig and cow blood as substitutes for sheep or horse blood in thermotolerant *Campylobacter* culture media

In Iquitos city (in the Peruvian amazon region), sheep and horse blood, one of the recommended supplements for thermotolerant campylobacters culture media, are not readily available, whereas pig and cow blood are. Therefore, the growth capacity of 60 thermotolerant *Campylobacter* strains (37 *C. jejuni* and 23 *C. coli*) using cow and pig blood as potential substitutes for sheep or horse blood, was studied. These strains were isolated from cows, pigs, chickens and ducks (15 strains of each type of animal).

Viable counts were done using a modified Miles and Misra method. *Campylobacter* strains showed better growth in presence of pig or sheep blood than with cow blood; so, we suggest the use of pig blood as a supplement to the *Campylobacter* culture media, when there is no availability of sheep or horse blood.

KEYWORDS: *Campylobacter*; thermotolerant, cow blood, pig blood

INTRODUCCION

Las clásicas bacterias termotolerantes del género *Campylobacter* (*Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*), son bacterias zoonóticas frecuentemente asociadas con diarrea en humanos, tanto en países en desarrollo como en desarrollados. Muchas especies animales portan estos agentes en su tracto intestinal y las vacas, cerdos y aves de corral son los reservorios más importantes (Skirrow & Blaser, 1992; Tresierra-Ayala et al., 1995; Fernández & Pisón, 1996).

Estas bacterias son organismos microaerófilos obligados y crecen óptimamente en una atmósfera conteniendo 5% de oxígeno (Stern and Kazmi 1989). George et al. (1978) reportaron que la aerotolerancia de muchas cepas de *Campylobacter* fue incrementada cuando el medio de cultivo fue suplementado con 0.025% de sulfato ferroso, metabisulfito de sodio y piruvato de sodio (suplemento FBP), sugiriendo que la incorporación de este suplemento en el medio, mejoraba el crecimiento de los organismos y, consecuentemente, su recuperación a partir de muestras podría ser mejorada. Por otro lado, Hoffman et al. (1979) sugirieron que este suplemento podría actuar como un secuestrador de oxígeno o un neutralizador de productos del oxígeno (peróxidos y superóxidos), los cuales podrían producir un efecto tóxico en estos organismos. Además, Stern y Kazmi (1984) reportaron que los suplementos de sulfato ferroso, piruvato de sodio, carbón y sangre previenen la acumulación de derivados tóxicos del oxígeno y permiten el crecimiento de los organismos debido a que estas sustancias actúan como agentes detoxificantes, por ello, la mayoría de medios de cultivo para *Campylobacter* emplean sangre de algunos mamíferos.

Una variedad de sangre de animales y sangre humana son utilizadas para la preparación de algunos medios de cultivo microbiológicos, especialmente para enriquecer y estudiar algunas características tales como la hemólisis.

En muchos laboratorios clínicos de Norteamérica, la sangre de oveja defibrinada es considerada como el suplemento sanguíneo más eficiente en el análisis rutinario y la sangre de caballo, que es ampliamente empleada en los países europeos, es recomendada como la segunda elección (Vera y Power, 1980).

En la ciudad de Iquitos (ubicada en la región de la amazonía peruana, latitud sur 3°45'), las ovejas y caballos no son disponibles, probablemente debido a las prácticas locales de crianza de los animales, de modo que los laboratorios de microbiología clínica no pueden emplear este suplemento para preparar el agar sangre. Por esta razón, en el presente trabajo se pretende estudiar la capacidad de crecimiento de campylobacters termotolerantes empleando sangre de vaca o de cerdo en reemplazo de la sangre de oveja o caballo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras fueron obtenidas mediante hisopado cloacal o rectal a partir de animales domésticos sanos (pollos, patos, vacas y cerdos), procedentes de diferentes zonas periurbanas de la ciudad de Iquitos. Todas las muestras fueron inmediatamente colocadas en un medio de transporte y enriquecimiento propuesto por Fernández (1992), consistente en: caldo *Brucella* 2,8%; agar-agar 0,15 g%; sulfato ferroso 0,05%; metabisulfito de sodio 0,05 g%, piruvato de sodio 0,05%; trimetoprim 1,0 mg%, rifampicina 1,5 mg%; colistín 1000 UI%, amfotericina B 1,0 mg% y sangre de caballo desfibrinada 3 ml%. Luego, las muestras fueron sembradas en placas de agar Skirrow modificado (Fernández 1983), consistente en: agar *Brucella* 4,3 g%; sulfato ferroso 0,05 g%, metabisulfito de sodio 0,05 g%; piruvato de sodio 0,05 g%, vancomicina 1,0 mg%; trimetoprim 0,5 mg%; polimixina B 250 UI%; cefalotina 1,0 mg%; amfotericina B 0,1 mg% y sangre desfibrinada de caballo 5 ml%. Las placas fueron incubadas a 42°C durante 48 h, en una atmósfera de 5% O₂, 10% CO₂ y 85% N₂. Las células de las colonias sospechosas fueron identificadas morfológicamente (mediante la tinción de Gram) y la caracterización bioquímica de los aislados fue realizada empleando pruebas diferenciales propuestas por Lior (1984) y Goossens & Butzler (1992): pruebas de la catalasa y oxidasa, condiciones de crecimiento, susceptibilidad al ácido nalidíxico (30µg), hidrólisis del hipurato. Se aislaron sesenta cepas de campylobacters termotolerantes (37 *C. jejuni* y 23 *C. coli*).

Empleando el método de Miles y Misra modificado (Tresierra-Ayala et al., 1999), se realizaron recuentos viable, para lo cual, suspensiones bacterianas de cada cepa fueron preparadas en agua destilada (3×10^8 UFC/ml); luego, se prepararon diluciones decimales de cada suspensión, en agua peptonada al 0.1% y, 20 µl de cada dilución

fueron sembrados, por quintuplicado, en placas de agar sangre de oveja, agar sangre de vaca y agar sangre de cerdo. Luego de 36 h de incubación, a 42°C durante 36 h y bajo condiciones de microaerofilia, se hicieron recuentos viables de cada cepa. Los resultados fueron comparados mediante análisis de varianza (ANOVA), proporcionado por el programa SPSS.

RESULTADOS

Las especies termotolerantes del género *Campylobacter* estudiadas mostraron capacidad de crecimiento en medios de cultivo suplementados con sangre de vaca y sangre de cerdo, tal como se muestra en las Tablas 1 y 2; sin embargo, el análisis de los resultados mostró que el crecimiento en el medio de cultivo que contenía sangre de cerdo fue mayor que el crecimiento en el medio de cultivo con sangre de vaca, esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$); sin embargo, el crecimiento en el medio de cultivo que contenía sangre de cerdo fue similar al crecimiento en el medio de cultivo con sangre de oveja, puesto que la diferencia existente no fue significativa ($p > 0,05$). Esta tendencia fue similar, independientemente de la especie bacteriana estudiada y la procedencia de las cepas.

DISCUSIÓN

El cultivo de campylobacters ha sido considerado una actividad algo dificultosa de desarrollar, especialmente si se toma en consideración las condiciones atmosféricas requeridas para su cultivo así como sus respectivos requerimientos nutricionales (Goossens & Butzler, 1992), por ello, la sangre como componente de los medios de cultivo para estas bacterias, suple ambas funciones.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo conllevan a pensar que las cepas de *Campylobacter* muestran un mayor crecimiento en presencia de sangre de cerdo u oveja que con sangre de vaca. Por ello, nos permitimos sugerir el uso de la sangre de cerdo como suplemento de los medios de cultivo para *Campylobacter*, cuando no existe disponibilidad de sangre de oveja o de caballo. Esta apreciación coincide con lo manifestado por Anand et al. (2000), quienes expresaron que en muchos países en vías

de desarrollo, los cerdos y las cabras o ambos son más disponibles que las ovejas o caballos y constituyen una fuente alternativa de sangre para la preparación de algunos medios bacteriológicos.

En 1984, Bolton et al. sugirieron que la sangre como suplemento de los medios de cultivo bacteriano, previene la acumulación de derivados tóxicos del oxígeno (peróxidos y superóxidos), ya que actúa como agente quelante o detoxificante y posibilita el crecimiento de los organismos.

Se ha determinado que los eritrocitos poseen algunas enzimas como la superóxido dismutasa y la catalasa (Chauhan et al., 1982), algunos con mayor actividad enzimática que otros, de modo que este hecho podría influir sobre la capacidad detoxificante de la sangre. Probablemente, los eritrocitos de la sangre de vaca pueden tener actividades enzimáticas más bajas que los eritrocitos de la sangre de cerdo u oveja, posibilitando una disminución en la aerotolerancia de estos microorganismos; por ello, la capacidad de crecimiento de las cepas de *Campylobacter* fue menor en presencia de sangre de vaca que en la de los otros mamíferos estudiados.

Finalmente, sostenemos que la sangre de cerdo es una alternativa más adecuada para reemplazar a la sangre de oveja en los medios de cultivo para campylobacters, especialmente en aquellos lugares donde la sangre de ovino o equino no son disponibles.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Anand, C.; Rhonda, G.; Helene, S.; Fonseca, K. & Olsen, M. 2000. Pig and goat blood as substitutes for sheep blood in blood-supplemented agar media. J. Clin. Microbiol. 38:591-594.
2. Chauhan DP, Gupta PH, Nampoothiri MR, Singhal PC, Chugh KS, Nair CR. 1982. Determination of erythrocyte superoxide dismutase, catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, reduced glutathione and malonyldialdehyde in uremia. Clin Chim Acta. 123: 153-159.

3. Fernández H. 1983. Thermophilic species of *Campylobacter*: Bacteriological, epidemiological and pathogenical aspects. Doctoral Thesis – School of Medicine of São Paulo – Escola Paulista de Medicina, Brasil. 144 p.
4. Fernández H. 1992. Increase of *Campylobacter* isolation rates using an enrichment médium, Rev. Microbiol. (S. Paulo), 23: 5-7.
5. Fernández H, Pisón V. 1996. Isolation of thermotolerant species of *Campylobacter* from commercial chicken livers. Int. J. Food Microbiology 29: 75-80.
6. George HA, Hoffman PS, Smibert RM and Krieg NR. 1978. Improved media for growth and aerotolerance of *Campylobacter fetus*. J Clin Microbiol. 8: 36-41
7. Goossens H & Butzler JP. 1992. Isolation and identification of *Campylobacter* spp. In: Nachamkin I, Blaser JM & Tompkins LS; ed. *Campylobacter jejuni*: Current status and future trends. Washington. American Society for Microbiology. pp 93-109.
8. Hoffman P, Krieg N, Smibert R. 1979. Studies of the microaerophilic nature of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. I. Physiological aspects of enhanced aerotolerance. Can. J. Microbiol. 25: 1-7.
9. Lior H. 1984. New, extend biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and “*Campylobacter laridis*”. J. Clin. Microbiol. 20: 636-640.
10. Skirrow M, Blaser J. 1992. Clinical and Epidemiologic Considerations. In: Nachamkin I, Blaser J and Tompkins L.eds. *Campylobacter jejuni*: Current status and future trends. American Society for Microbiology. Washington. pp 3-8.
11. Stern NJ and Kazmi SU. 1989. *Campylobacter jejuni*. In: Doyle MP, ed. Foodborne Bacterial Pathogens. Marcell Dekker, Inc. New York. pp 71-110
12. Tresierra-Ayala A, Bendayan M, Bernuy A, Espinoza F and Fernandez H. 1995. Carriage of the classical thermotolerant campylobacters in healthy domestic animals from eastern Perú. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 37: 537-539.

13. Tresierra-Ayala A, Ruiz R, Bendayan M and Fernández H. 1999. Survival times of *Campylobacter coli* in sterilized buffalo milk. J. Vet. Med. 46: 141-144.
14. Vera HD and Power DA. 1980. Culture media, p. 965-999. In Lennette EH, Ballows A, Housler WJ, Shadomy HJ. eds. Manual of Clinical Microbiology, 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington. pp 965-999.

Tabla N° 1. Capacidad de crecimiento de cepas de *Campylobacter* aisladas de mamíferos domésticos, según el tipo de sangre empleada en el medio de cultivo.

Table N° 1. Growth capacity of *Campylobacter* strains isolated from domestic mammals, according to blood type used in the culture medium.

Cepa	Origen	UFC/ml		
		Sangre de oveja	Sangre de vaca	Sangre de cerdo
<i>C. jejuni</i> 1	Vaca	$3,0 \times 10^8$	$4,3 \times 10^6$	$2,5 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 2	Vaca	$6,5 \times 10^8$	$4,5 \times 10^5$	$4,5 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 3	Vaca	$4,0 \times 10^7$	$4,5 \times 10^5$	$4,0 \times 10^7$
<i>C. jejuni</i> 4	Vaca	$4,3 \times 10^8$	$7,5 \times 10^6$	$3,3 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 5	Cerdo	$1,8 \times 10^8$	$8,5 \times 10^6$	$4,2 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 6	Vaca	$3,6 \times 10^6$	$4,5 \times 10^5$	$6,6 \times 10^6$
<i>C. jejuni</i> 7	Vaca	$4,5 \times 10^8$	$4,5 \times 10^5$	$3,3 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 8	Cerdo	$3,6 \times 10^8$	$1,2 \times 10^6$	$2,7 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 9	Vaca	$8,5 \times 10^8$	$1,6 \times 10^6$	$5,9 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 10	Cerdo	$6,7 \times 10^8$	$1,2 \times 10^6$	$6,4 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 11	Cerdo	$2,8 \times 10^8$	$4,5 \times 10^5$	$1,6 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 12	Vaca	$4,8 \times 10^8$	$4,5 \times 10^5$	$3,8 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 13	Cerdo	$6,7 \times 10^8$	$4,5 \times 10^5$	$5,7 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 14	Cerdo	$5,1 \times 10^8$	$1,7 \times 10^6$	$3,6 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 15	Vaca	$4,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^6$	$4,0 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 16	Vaca	$4,3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^6$	$4,2 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 17	Vaca	$1,2 \times 10^8$	$3,5 \times 10^6$	$2,4 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 18	Cerdo	$3,6 \times 10^8$	$4,5 \times 10^5$	$2,6 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 19	Vaca	$4,5 \times 10^8$	$5,0 \times 10^6$	$3,3 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 20	Cerdo	$3,0 \times 10^8$	$1,2 \times 10^6$	$2,7 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 21	Cerdo	$6,5 \times 10^8$	$1,6 \times 10^6$	$5,7 \times 10^8$
<i>C. coli</i> 1	Cerdo	$5,7 \times 10^8$	$1,6 \times 10^6$	$3,6 \times 10^8$
<i>C. coli</i> 2	Vaca	$5,6 \times 10^6$	$4,5 \times 10^5$	$5,5 \times 10^6$
<i>C. coli</i> 3	Cerdo	$5,8 \times 10^8$	$4,5 \times 10^5$	$3,4 \times 10^8$
<i>C. coli</i> 4	Cerdo	$4,2 \times 10^8$	$4,5 \times 10^5$	$3,6 \times 10^8$
<i>C. coli</i> 5	Vaca	$1,7 \times 10^8$	$2,3 \times 10^7$	$4,2 \times 10^8$
<i>C. coli</i> 6	Cerdo	$7,5 \times 10^7$	$4,6 \times 10^6$	$4,6 \times 10^7$
<i>C. coli</i> 7	Vaca	$4,3 \times 10^8$	$4,5 \times 10^5$	$5,7 \times 10^8$

<i>C. coli</i> 8	Cerdo	$6,7 \times 10^8$	$4,5 \times 10^5$	$5,9 \times 10^8$
<i>C. coli</i> 9	Cerdo	$5,1 \times 10^8$	$1,7 \times 10^6$	$4,8 \times 10^8$

Tabla N° 2. Capacidad de crecimiento de cepas de *Campylobacter* aisladas de mamíferos domésticos, según el tipo de sangre empleada en el medio de cultivo.

Table N° 2. Growth capacity of *Campylobacter* strains isolated from domestic birds, according to blood type used in the culture medium.

Cepa	Origen	N° UFC/ml		
		Sangre de oveja	Sangre de vaca	Sangre de cerdo
<i>C. jejuni</i> 22	Pollo	3,6 x 10 ⁸	2,1 x 10 ⁶	2,6 x 10 ⁸
<i>C. jejuni</i> 23	Pollo	1,4 x 10 ⁸	5,3 x 10 ⁵	4,7 x 10 ⁸
<i>C. jejuni</i> 24	Pollo	2,0 x 10 ⁷	5,2 x 10 ⁵	4,6 x 10 ⁷
<i>C. jejuni</i> 25	Pollo	2,3 x 10 ⁸	7,1 x 10 ⁶	3,2 x 10 ⁸
<i>C. jejuni</i> 26	Pato	3,8 x 10 ⁸	4,5 x 10 ⁶	4,4 x 10 ⁸
<i>C. jejuni</i> 27	Pollo	3,6 x 10 ⁷	5,1 x 10 ⁵	6,6 x 10 ⁷
<i>C. jejuni</i> 28	Pollo	4,2 x 10 ⁸	5,3 x 10 ⁵	3,8 x 10 ⁸
<i>C. jejuni</i> 29	Pato	3,4 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁶	2,7 x 10 ⁸
<i>C. jejuni</i> 30	Pollo	3,5 x 10 ⁸	1,3 x 10 ⁶	4,9 x 10 ⁸
<i>C. jejuni</i> 31	Pollo	2,7 x 10 ⁸	1,2 x 10 ⁶	6,4 x 10 ⁸
<i>C. jejuni</i> 32	Pollo	2,8 x 10 ⁸	5,2 x 10 ⁵	2,6 x 10 ⁸
<i>C. jejuni</i> 33	Pollo	4,2 x 10 ⁸	5,5 x 10 ⁵	3,8 x 10 ⁸
<i>C. jejuni</i> 34	Pato	2,3 x 10 ⁸	1,2 x 10 ⁶	4,7 x 10 ⁸
<i>C. jejuni</i> 35	Pato	3,6 x 10 ⁷	5,2 x 10 ⁵	6,6 x 10 ⁷
<i>C. jejuni</i> 36	Pato	3,4 x 10 ⁸	5,3 x 10 ⁵	3,8 x 10 ⁸
<i>C. jejuni</i> 37	Pato	4,2 x 10 ⁸	5,1 x 10 ⁵	4,7 x 10 ⁸
<i>C. coli</i> 10	Pollo	3,7 x 10 ⁸	5,2 x 10 ⁶	5,5 x 10 ⁸
<i>C. coli</i> 11	Pollo	3,1 x 10 ⁸	1,7 x 10 ⁶	4,8 x 10 ⁸
<i>C. coli</i> 12	Pato	1,7 x 10 ⁸	5,2 x 10 ⁵	3,6 x 10 ⁸
<i>C. coli</i> 13	Pato	5,9 x 10 ⁶	5,3 x 10 ⁵	5,7 x 10 ⁷
<i>C. coli</i> 14	Pollo	5,8 x 10 ⁸	5,8 x 10 ⁵	3,4 x 10 ⁸
<i>C. coli</i> 15	Pollo	4,2 x 10 ⁸	6,0 x 10 ⁶	3,8 x 10 ⁸
<i>C. coli</i> 16	Pato	1,7 x 10 ⁸	2,3 x 10 ⁷	3,2 x 10 ⁸
<i>C. coli</i> 17	Pollo	7,8 x 10 ⁷	5,6 x 10 ⁵	4,6 x 10 ⁷
<i>C. coli</i> 18	Pato	3,4 x 10 ⁸	1,3 x 10 ⁶	2,6 x 10 ⁸
<i>C. coli</i> 19	Pato	3,8 x 10 ⁸	1,3 x 10 ⁶	4,9 x 10 ⁸
<i>C. coli</i> 20	Pato	3,1 x 10 ⁸	6,7 x 10 ⁶	4,8 x 10 ⁸
<i>C. coli</i> 21	Pato	3,4 x 10 ⁸	1,7 x 10 ⁶	2,6 x 10 ⁸
<i>C. coli</i> 22	Pato	3,8 x 10 ⁸	1,2 x 10 ⁶	3,8 x 10 ⁸
<i>C. coli</i> 23	Pato	3,6 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁶	3,4 x 10 ⁸

