

# LA SANGRE DE CERDO Y DE VACA COMO SUBSTITUTOS DE LA SANGRE DE OVEJA O DE CABALLO EN MEDIOS DE CULTIVO PARA *CAMPYLOBACTERS* TERMOTOLERANTES

## PIG AND COW BLOOD AS SUBSTITUTES FOR SHEEP OR HORSE BLOOD IN THERMOTOLERANT *CAMPYLOBACTERS* IN GROWING ENVIRONMENTS

Álvaro Tresierra-Ayala<sup>1</sup>, Manuel Navas Vásquez<sup>2</sup>, Josué Flores García<sup>2</sup>, Ramsés Perea Perea<sup>2</sup>, Juan Huanquiri Ahuanari<sup>2</sup>, María Bendayán Acosta<sup>3</sup>, Edith Ruiz Sánchez<sup>3</sup> y Marjorie Donayre Ramírez<sup>3</sup>.

Recibido: enero 2009

Aceptado: abril 2009

### RESUMEN

En la ciudad de Iquitos (ubicada en la Amazonía peruana), la sangre de oveja y de caballo, uno de los suplementos recomendados para los medios de cultivo de *Campylobacter* termotolerantes, no son tan disponibles como la sangre de cerdo y de 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 de cerdo como potenciales substitutos de la sangre de oveja o de 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 o de 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 de caballo.

**Palabras claves:** *Campylobacter*, termotolerante, sangre de vaca, sangre de cerdo.

### ABSTRACT

In Iquitos (capital city of the Peruvian Amazon), sheep and horse blood, one of the recommended supplements for thermo tolerant *Campylobacter* in growing environments, are difficult to obtain in comparison to pig and cow blood. Therefore, the growing capacity of 60 thermo tolerant *Campylobacter* strains (37 *C. jejuni* and 23 *C. coli*) using cow and pig blood as potential substitutes for sheep or horse blood, was studied. The strains were isolated from cows, pigs, chickens and ducks (15 strains of each animal). Accountable measures were used applying a modified Miles and Misra method. *Campylobacter* strains showed better growth in presence of pig or sheep blood in comparison with cow blood, so, we suggest the use of pig blood as a supplement in the *Campylobacter* growing environment, when there is no availability of sheep or horse blood.

**Key words:** *Campylobacter*; thermo tolerant, cow blood, pig blood.

### INTRODUCCIÓN

Las especies termotolerantes de *Campylobacter* (*C. jejuni* y *C. coli*), son bacterias zoonóticas frecuentemente aso-

ciadas con diarrea en humanos. Muchos animales portan estos agentes en su tracto intestinal y las vacas, cerdos y aves de corral son los reservorios más importantes (Tresierra-Ayala et ál., 1995; Fernández y

<sup>1</sup> Doctor en Microbiología. Departamento Académico de Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas de la UNAP. Pevas 5ta. cuadra, Iquitos, Perú. Correo electrónico: atresierraayala@hotmail.com

<sup>2</sup> Biólogo. Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNAP.

<sup>3</sup> Biólogo. Docente adscrito a la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNAP.

Pisón, 1996).

Estos organismos microaerófilos crecen óptimamente en una atmósfera con 5% de oxígeno (Stern y Kazmi, 1989). George et ál. (1978) reportaron que la aerotolerancia de muchas cepas de *Campylobacter* se incrementa al añadir al medio de cultivo 0,025% de sulfato ferroso, metabisulfito de sodio y piruvato de sodio (suplemento FBP), ocasionando una mejora en su crecimiento. Por otro lado, Hoffman et ál. (1979), sugirieron que este suplemento actúa como un secuestrador de oxígeno o un neutralizador de sus productos tóxicos para estos organismos (peróxidos y superóxidos). Stern y Kazmi (1989) expresaron que los suplementos sulfato ferroso, piruvato de sodio, carbón y sangre previenen la acumulación de derivados tóxicos del oxígeno y permiten el crecimiento de los organismos al actuar como agentes detoxificantes.

Una variedad de sangre de animales y humana es utilizada en la preparación de algunos medios de cultivo microbianos, especialmente para enriquecer y estudiar características como la hemólisis. En muchos laboratorios 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'), es muy escasa la crianza de ovejas y caballos, de modo que los laboratorios de microbiología casi no disponen de su sangre para emplearla como suplemento de determinados medios de cultivo. Por esta razón, en el presente trabajo se estudió la capacidad de crecimiento de campylobacters termotolerantes empleando sangre de vaca o

de cerdo en reemplazo de la sangre de oveja o de caballo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras se obtuvieron 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, las cuales 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 mg%; rifampicina 1,5 mg%; colistín 1000 UI%; amfotericina B 1,0 mg% y sangre defibrinada de caballo 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 defibrinada de caballo 5 ml%. Las placas fueron incubadas a 42 °C durante 48 horas, en microaerofilia (método de la jarra con vela). Mediante la observación microscópica de las células de las colonias sospechosas (teñidas con la técnica de Gram) y su caracterización bioquímica empleando pruebas diferenciales propuestas por Lior (1984) y Goossens y Butzler (1992): catalasa y oxidasa, condiciones de crecimiento, susceptibilidad al ácido nalidíxico (30 µg), hidrólisis del hipurato, se aislaron sesenta cepas de campylobacters termotolerantes (15 de cada tipo de animal), perteneciendo 37 a *C. jejuni* y 23 a *C. coli*.

Empleando el método de Miles y Misra modificado (Tresierra-Ayala et ál., 1999), se

realizaron recuentos viables, para lo cual, suspensiones de cada cepa en agua destilada ( $3 \times 10^8$  UFC/ml), se diluyeron decimalmente en agua peptonada al 0,1% y, 20  $\mu$ l de cada dilución se sembraron por quintuplicado, en placas de agar sangre de oveja, agar sangre de vaca y agar sangre de cerdo. A las 36 horas de incubación, a 42 °C y en microaerofilia, se hicieron recuentos viables de cada cepa. Los resultados se compararon mediante análisis de varianza (ANOVA) proporcionado por el programa SPSS.

## RESULTADOS

Las especies de *Campylobacter* estudiadas

mostraron capacidad de crecimiento en los tres medios con diferente tipo de sangre, tal como se muestran 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.

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

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	$3,6 \times 10^8$	$4,5 \times 10^5$	$2,6 \times 10^8$

Continúa...

Viene de la tabla 1

<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. jejuni</i> 22	Pollo	$3,6 \times 10^8$	$2,1 \times 10^6$	$2,6 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 23	Pollo	$1,4 \times 10^8$	$5,3 \times 10^5$	$4,7 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 24	Pollo	$2,0 \times 10^7$	$5,2 \times 10^5$	$4,6 \times 10^7$
<i>C. jejuni</i> 25	Pollo	$2,3 \times 10^8$	$7,1 \times 10^6$	$3,2 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 26	Pato	$3,8 \times 10^8$	$4,5 \times 10^6$	$4,4 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 27	Pollo	$3,6 \times 10^7$	$5,1 \times 10^5$	$6,6 \times 10^7$
<i>C. jejuni</i> 28	Pollo	$4,2 \times 10^8$	$5,3 \times 10^5$	$3,8 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 29	Pato	$3,4 \times 10^8$	$1,1 \times 10^6$	$2,7 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 30	Pollo	$3,5 \times 10^8$	$1,3 \times 10^6$	$4,9 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 31	Pollo	$2,7 \times 10^8$	$1,2 \times 10^6$	$6,4 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 32	Pollo	$2,8 \times 10^8$	$5,2 \times 10^5$	$2,6 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 33	Pollo	$4,2 \times 10^8$	$5,5 \times 10^5$	$3,8 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 34	Pato	$2,3 \times 10^8$	$1,2 \times 10^6$	$4,7 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 35	Pato	$3,6 \times 10^7$	$5,2 \times 10^5$	$6,6 \times 10^7$
<i>C. jejuni</i> 36	Pato	$3,4 \times 10^8$	$5,3 \times 10^5$	$3,8 \times 10^8$
<i>C. jejuni</i> 37	Pato	$4,2 \times 10^8$	$5,1 \times 10^5$	$4,7 \times 10^8$

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

Cepa	Origen	UFC/ml		
		Sangre de oveja	Sangre de vaca	Sangre de cerdo
<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	$5,8 \times 10^8$	$1,7 \times 10^6$	$3,6 \times 10^8$
<i>C. coli</i> 4	Cerdo	$4,2 \times 10^8$	$4,5 \times 10^6$	$3,6 \times 10^8$
<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	$5,1 \times 10^8$	$1,7 \times 10^6$	$4,8 \times 10^8$
<i>C. coli</i> 10	Pollo	$3,7 \times 10^8$	$5,2 \times 10^6$	$5,5 \times 10^8$
<i>C. coli</i> 11	Pollo	$3,1 \times 10^8$	$1,7 \times 10^6$	$4,8 \times 10^8$
<i>C. coli</i> 12	Pato	$1,7 \times 10^8$	$5,2 \times 10^5$	$3,6 \times 10^8$
<i>C. coli</i> 13	Pato	$5,9 \times 10^6$	$5,3 \times 10^5$	$5,7 \times 10^7$

Continúa...

Viene de la tabla 2

<i>C. coli</i> 14	Pollo	$5,8 \times 10^8$	$5,8 \times 10^5$	$3,4 \times 10^8$
<i>C. coli</i> 15	Pollo	$4,2 \times 10^8$	$6,0 \times 10^6$	$3,8 \times 10^8$
<i>C. coli</i> 16	Pato	$1,7 \times 10^8$	$2,3 \times 10^7$	$3,2 \times 10^8$
<i>C. coli</i> 17	Pollo	$7,8 \times 10^7$	$5,6 \times 10^5$	$4,6 \times 10^7$
<i>C. coli</i> 18	Pato	$3,4 \times 10^8$	$1,3 \times 10^6$	$2,6 \times 10^8$
<i>C. coli</i> 19	Pato	$3,8 \times 10^8$	$1,3 \times 10^6$	$4,9 \times 10^8$
<i>C. coli</i> 20	Pato	$3,1 \times 10^8$	$6,7 \times 10^6$	$4,8 \times 10^8$
<i>C. coli</i> 21	Pato	$3,4 \times 10^8$	$1,7 \times 10^6$	$2,6 \times 10^8$
<i>C. coli</i> 22	Pato	$3,8 \times 10^8$	$1,2 \times 10^6$	$3,8 \times 10^8$
<i>C. coli</i> 23	Pato	$3,6 \times 10^8$	$1,1 \times 10^6$	$3,4 \times 10^8$

## DISCUSIÓN

El cultivo de campylobacters ha sido considerado una actividad algo dificultosa de desarrollar, especialmente si se toman en consideración las condiciones atmosféricas requeridas para su cultivo así como sus requerimientos nutricionales (Goossens y 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 en sangre de vaca. Por ello, se sugiere el uso de la sangre de cerdo como suplemento de los medios de cultivo para *Campylobacter*, cuando no exista disponibilidad de sangre de oveja o de caballo. Esta apreciación coincide con lo manifestado por Anand et ál. (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 ál. 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 favorece el crecimiento de ciertos microorganismos en presencia de cantidades de oxígeno similares o menores a la atmosférica; por ello, la mayoría de medios de cultivo para campylobacters emplean sangre de algunos mamíferos.

Se ha determinado que los eritrocitos poseen enzimas como la superóxido dismutasa y catalasa (Chauhan et ál., 1982), unos con mayor actividad enzimática que otros, de modo que esto podría influenciar sobre la capacidad detoxificante de la sangre. Probablemente, los eritrocitos de vaca puedan tener actividades enzimáticas más bajas que los eritrocitos de cerdo u oveja, que posibilitan 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.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.

- Bolton NF, Hutchinson D, Coates D. 1984. Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *J Clin Microbiol* 19:169-171.
- Chauhan D, Gupta P, Nampoothiri M, Singhal P, Chugh K, Nair C. 1982. Determination of erythrocyte superoxide dismutase, catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, reduced glutathione and malonyldialdehyde in uremia. *Clin Chim Acta* 123: 153-159.
- 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 pp.
- Fernández H. 1992. Increase of *Campylobacter* isolation rates using an enrichment medium. *Rev Microbiol (S. Paulo)* 23: 5-7.
- Fernández H, Pisón V. 1996. Isolation of thermotolerant species of *Campylobacter* from commercial chicken livers. *Int J Food Microbiol* 29: 75-80.
- George H, Hoffman P, Smibert R, Krieg N. 1978. Improved media for growth and aerotolerance of *Campylobacter fetus*. *J Clin Microbiol* 8: 36-41.
- Goossens H, Butzler J. 1992. Isolation and identification of *Campylobacter* spp. In: *Campylobacter jejuni*: Current status and future trends. Nachamkin I, Blaser J & Tompkins L (eds.). Washington. American Society for Microbiology. Pp 93-109.
- 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.
- Lior H. 1984. New, extend biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and "*Campylobacter laridis*". *J Clin Microbiol* 20: 636-640.
- Stern N, Kazmi S. 1989. *Campylobacter jejuni*. In: Foodborne Bacterial Pathogens. Doyle M (ed.). Marcell Dekker, Inc. New York. Pp 71-110.
- Tresierra-Ayala A, Bendayán M, Bernuy A, Espinoza F, Fernández H. 1995. Carriage of the classical thermotolerant campylobacters in healthy domestic animals from eastern Peru. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 37: 537-539.
- Tresierra-Ayala A, Ruiz R, Bendayán M, Fernández H. 1999. Survival times of *Campylobacter coli* in sterilized buffalo milk. *J Vet Med* 46: 141-144.
- Vera H, Power D. 1980. Culture media. In: Manual of Clinical Microbiology. Lennette E, Ballows A, Housler W, Shadomy H (eds.). 3<sup>rd</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington. Pp 965-999.