

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA  
PERUANA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**"Uso de sangre de vacuno y porcino para el crecimiento de *Campylobacter*  
*termotolerantes e influencia del pH del medio sobre su capacidad*  
*hemolítica"***

**Br. JOSUE FLORES GARCIA**

**Br. MANUEL ENRIQUE NAVAS VASQUEZ**

**TESIS PRESENTADA A LA FACULTAD DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNAP,  
COMO REQUISITO PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
BIÓLOGO.**

**IQUITOS-PERU**

**2009**

## DEDICATORIA

A Dios, por ser la fuerza que impulsa nuestra existencia y el camino que recorreremos en la vida.

Dedico el presente trabajo a mis padres, familiares e hija, por todo el apoyo incondicional brindado y mostrado, especialmente durante nuestro tiempo de estudiantes, ya que sin ellos no sería lo que soy.

Muchas Gracias.

Manuel Navas Vásquez

## **DEDICATORIA**

A Dios, por ser la fuerza que impulsa nuestra existencia y el camino que recorreremos en la vida.

Dedico el presente trabajo a mi madre, a mi padre y a mi hermanita, por todo su amor y apoyo incondicional brindado, durante nuestro tiempo de estudiantes. Muchas Gracias.

Josué Flores García

## **AGRADECIMIENTO**

Los autores expresan su profundo agradecimiento:

Al Dr. Álvaro B. Tresierra Ayala, por su amistad, el asesoramiento y el apoyo brindado para la elaboración del presente trabajo.

Al Dpto. Académico de Microbiología y Parasitología de La Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, por las facilidades brindadas durante el periodo que nos tomó la realización de nuestro trabajo de Tesis.

Al Blgo. Carlos Dávila Flores por su colaboración en la ejecución del presente trabajo de investigación.

Al Sr. Manuel Del Águila Vásquez por la valiosa ayuda prestada durante el tiempo que nos tomó culminar nuestro trabajo.

## INDICE

	Pág.
I. Introducción.....	5
II. Revisión de Literatura.....	7
III. Materiales y Metodología.....	10
3.1. Materiales.....	10
a. Material Biológico.....	10
b. Material de Laboratorio.....	10
c. Medios de Cultivo.....	11
d. Materiales de Vidrio.....	11
e. Otros.....	11
f. Materiales de Escritorio.....	12
3.2. Metodología.....	13
a. Área de Estudio.....	13
b. Procedencia de la Muestra.....	13
c. Obtención de la sangre.....	14
d. Aislamiento de la Cepa de <i>Campylobacter</i> spp.....	14
e. Identificación presuntiva.....	14
f. Identificación confirmativa.....	15
g. Determinación de la Capacidad de Crecimiento.....	16
h. Análisis de la influencia del pH.....	17
i. Análisis de los Resultados.....	17
IV. Resultados.....	18
V. Discusión.....	24
VI. Conclusiones.....	27
VII. Recomendaciones.....	28
VIII. Resumen.....	29
IX. Referencias Bibliográficas.....	31
X. Anexos.....	35

## I. INTRODUCCIÓN

El género *Campylobacter* fue descrito por primera vez, en 1913 por Mac Fadyean y Stockman bajo la denominación de “vibrio microaerofílico” al estudiar casos de abortos en ovinos y vacunos. Sin embargo, durante los últimos 20 años las especies termotolerantes de *Campylobacter* vienen adquiriendo una gran importancia en salud pública, especialmente como agentes infecciosos de humanos. (FERNANDEZ, 1992), (TRESIERRA *et al.*, 1996) y (TRESIERRA & FERNANDEZ, 1997).

Hoy en día, se pueden emplear diferentes medios de aislamiento selectivo, entre los que destacan: el medio Skirrow, el medio de Blaser, el medio de Butzler, etc.; caracterizándose todos estos por utilizar antibióticos como agentes restrictivos de la flora fecal acompañante (BLASER *et al.*, 1983), tal es el caso del medio de Skirrow que contiene Vancomicina, Polimixina B, Trimetoprim y Anfotericina B. (BUTZLER & SKRROW, 1979)

Las clásicas especies termotolerantes de *Campylobacter* (*Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Campylobacter lari*) son bacterias Gram negativas con forma de bastón, delgadas, curvas y móviles con un flagelo polar. Estas especies se desarrollan en ambientes microaerófilos necesitando de 3 a 5 % de oxígeno y de 2 a 10 % de dióxido de carbono. Antes de 1977, se desarrollaron los métodos para su aislamiento a partir de heces de humano en el Reino Unido (SKIRROW, 1977), en ese entonces, se creía que se trataban principalmente de patógenos de animales, que causaban abortos y enteritis en ovejas y ganado vacuno. Actualmente, estas bacterias son reconocidas como enteropatógenos humanos de gran importancia (CANALS & ROSELL, 2001). Desde 1990 se viene determinando que, la incidencia de la infección va incrementándose en todos los países industrializados, tal como lo señalan: (CAMASCA, 1986) y (LUND *et al.*, 2004).

Aunque las especies termotolerantes de *Campylobacter* no han sido consideradas como agentes hemolíticos en agar sangre (SMIBERT, 1984), algunas cepas han sido reportadas como productoras de hemolisinas (ARIMI *et al.*, 1990); capacidad que puede estar asociada a la virulencia de la cepa. Por otro lado, se demostró la existencia

de diversos factores vinculados con la virulencia, como es el caso de la producción de toxinas, adherencia e invasividad por parte de muchas cepas. (FERNANDEZ, 1992).

Estas especies son capaces de producir una  $\alpha$  y  $\beta$  hemólisis en medios de cultivo que contienen sangre como suplemento, fenómeno que se realiza dependiendo de las condiciones de incubación: como la concentración de CO<sub>2</sub>, el pH del medio de cultivo y el tiempo de incubación. (MISAWA *et al.*, 1995). Estas bacterias son extremadamente exigentes para su cultivo y es importante el empleo de sangre de ovino o equino como un suplemento para el medio.

En nuestra región, la crianza de mamíferos como ovinos y equinos suele ser muy escasa y esto hace que sea muy difícil obtener este tipo de sangre para emplearse como suplemento de los medios de cultivo microbianos, en cambio existe gran abundancia de ganado vacuno y porcino que podrían ser una fuente alternativa accesible de sangre como suplemento para dichos medios de cultivo.

Por lo expuesto, y viendo la posibilidad de reemplazar la sangre de ovino y equino por la de vacuno y porcino, así como estudiar la influencia del pH del medio como un factor ambiental para determinar la posible capacidad hemolítica que poseen estas bacterias, se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general:

- Emplear la sangre de vacuno y porcino como suplemento en los medios de cultivo para *Campylobacter* spp.

Objetivos específicos:

- Aislar e identificar cepas de *Campylobacter* termotolerantes a partir del contenido intestinal de vacuno y porcino.
- Determinar el pH del medio de cultivo sobre la capacidad hemolítica de *Campylobacter* spp.

## II. REVISION DE LITERATURA.

- ROSEF y KAPPERUD (1983). Realizaron un trabajo en Noruega, quienes en sus resultados afirmaron que algunas bacterias termotolerantes del género *Campylobacter* son frecuentemente encontradas como comensales o patógenos en el tracto intestinal de algunas especies de aves y mamíferos. Debido a que en sus resultados las tasas de portación eran de 50.7% en moscas capturadas en granjas de pollos y un 43.2% en una granja de cerdos.
- ROZALSKI y KOTESKO (1987). En Estados Unidos, determinaron la capacidad hemolítica de 20 cepas de *Proteus penneri* aisladas en el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta (CDC), ellos emplearon eritrocitos humanos y ovinos, concluyendo que la capacidad hemolítica está relacionada con la invasividad y la virulencia de las cepas. Esta actividad es comparable con casi el 100% de *Proteus vulgaris* y *Proteus mirabilis*, esto es debido a la producción de un factor hemolítico celular obligatorio, que solo demostrado en caldos de cultivos; y al parecer facilita la penetración de *Proteus penneri* y otras especies de *Proteus* dentro de la célula sin efectos citotóxicos.
- PICKETT et al. (1992). En Estados Unidos encontraron cepas de *Campylobacter jejuni* que fueron examinadas por su habilidad de adquirir hierro de varias fuentes presentes en el ser humano: hemina, hemoglobina, hemina – hemopexina, y hemoglobina – haptoglobina, las cuales estimulan el crecimiento de las cepas en medios que contienen baja concentración de hierro. *Campylobacter jejuni*, fue capaz de producir una actividad hemolítica pero no parece ser regulada por la presencia de hierro.
- ESPINOZA (1995). En Perú, con el propósito de determinar la tasa de aislamiento de *Campylobacter* en mamíferos domésticos de la ciudad de Iquitos, analizó un total de 150 muestras del contenido intestinal de estos animales (75 provenían de ganado vacuno y 75 de ganado porcino). Reportó una tasa de aislamiento de 25.3% (8.0% en ganado vacuno y 42.7% en ganado porcino), logrando aislar 5 (83.3%) cepas de *Campylobacter jejuni* a partir de las muestras provenientes de vacuno y 1



(16.7%) cepa de *Campylobacter coli*. Por otro lado en cuanto a la portación de estos agentes bacterianos en porcinos, encontró que de las 75 muestras estudiadas, encontró 10 (31.2%) cepas de *Campylobacter jejuni* y 22 (68.8%) cepas de *Campylobacter coli*. Durante su estudio no encontró *Campylobacter lari*.

- MISAWA *et al.* (1995). En Japón, determinaron que la actividad  $\alpha$  – hemolítica de *Campylobacter jejuni* era claramente visible cuando el rango de pH del medio de cultivo fluctuaba entre 6.0 a 6.5, pero las zonas hemolíticas desaparecían cuando el pH del medio se incrementaba. Además observaron que la actividad  $\beta$  – hemolítica era apreciable después de una incubación prolongada y ninguno de estos tipos de hemólisis estuvo influenciado por el tipo de sangre empleada como suplemento en el medio de cultivo.
  
- ANAND *et al.* (2000). En Canadá, estudiaron el desarrollo de bacterias anaerobias y aerobias, encontrando que en general el desarrollo y la morfología en de las colonias fueron similares en medios suplementados con sangre de oveja, cabra y cerdo, aunque se presentan algunas diferencias. En muchos países en vías de desarrollo, la sangre de caballo y oveja constituyen el suplemento recomendado para los medios de cultivo de microorganismos del género *Campylobacter*; sin embargo, estas no son fáciles de conseguir, mientras si lo son la sangre proveniente de cerdo y cabra. Por esta razón, estos investigadores estudiaron la posibilidad de emplear la sangre de cerdo y cabra como un potencial sustituto de la sangre de oveja en medios de cultivos bacteriológicos suplementados con sangre.
  
- ENGBER *et al.* (2000). En Estados Unidos, estudiaron un total de 1,376 especímenes del género *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* y *Sutterella* spp. en muestras fecales de humanos, en diferentes medios de aislamiento: SK, filtro, agar CAT y mCCDA, y los porcentajes de aislamiento fueron: 82, 83, 85 y 95% respectivamente, en este ultimo medio (CCDA), en sus métodos de aislamiento emplearon anticoagulantes libre de citratos y de otros agentes que interfieren con el desarrollo microbiano.

- OKAZAKI *et al.* (2003). En Japón, determinaron que seis cepas de origen humano de *Streptococcus* del grupo B fueron cultivados en agar sangre bajo condiciones de anaerobiosis a una temperatura de 37 °C, durante 18 horas y luego fueron mantenidas a 4 °C durante el mismo periodo de tiempo y finalmente fueron reincubadas bajo las mismas condiciones iniciales. Estos investigadores observaron que 3 de las 6 cepas mostraron una marcada zona hemolítica comparada con la obtenida después de usar sólo calor (37 °C por 18 horas) o calor-frío (37 °C por 18 horas y luego 4 °C por 6 horas).

### **III. MATERIALES Y METODOLOGÍA.**

#### **3.1 MATERIALES**

##### **a. Material biológico**

- Sangre de vacuno, porcino y ovino.
- Muestras de contenido intestinal de vacuno y porcino con el propósito de aislar 10 cepas de vacuno y 10 cepas de porcino.

##### **b. Materiales de Laboratorio**

###### **Equipos**

- Autoclave Austester Mod. 437-p.
- Horno Tipo L/P. 0.302 – 303.
- Estufa Heraus.
- Horno de Microondas Emerson.
- Balanza Cobos de 2 platillos.
- Balanza Analítica Estándar Ohaus.
- Cocina Electrica Citecil.
- Baño Maria Thelco.
- Refrigeradoras Córdex y Friolux.

c. Medios de Cultivo

- Agar Skirrow modificado
- Agar Sangre – FBP (Sulfato Ferroso, Metabisulfito de Sodio y Piruvato de Sodio)
- Medio de Transporte y Enriquecimiento para *Campylobacter* (T.E.C.)

d. Materiales de Vidrio

- Placas de Petri 100 x 15 mm.
- Matraz Erlenmeyer 250 ml.
- Probeta 100 ml.
- Pipetas 5 y 10 ml.
- Mechero de Alcohol.
- Tubos de ensayo 16 x 150 mm.
- Campanas de microaerobiosis.

e. Otros

- Asa bacteriológica.
- Kits de micropipetas
- Nefelómetro de Mc Farland.
- Vancomicina.
- Trimetropim.
- Polimixina B.
- Rifampicina.
- Colistín.
- Anfotericina B.

- Gradillas.
- Algodón.
- Espátula.
- Papel kraft
- Alcohol 96°
- Viales.
- Hisopos.
- Agua destilada.
- Hilo pabilo.
- Mandil.
- Lejía y detergente.
- Cámara digital.
- Encendedor.

f. Materiales de Escritorio

- Papel bond
- Marcadores para vidrio.
- Computadora.
- Cartucho de tinta.
- Memoria USB.
- Bolígrafo.

## 3.2 METODOLOGIA

### a. Área de estudio

#### - Ubicación Geográfica:

El presente trabajo de investigación se realizó en la ciudad de Iquitos, provincia de Maynas y capital de la región Loreto, cuyas coordenadas geográficas son: 3° 45' LS y 73° 14' LO, situada en la parte nor-oriental del Perú.

#### - Lugar de Trabajo:

La parte experimental del presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas – UNAP.

### b. Procedencia de las muestras:

Las muestras de sangre se obtuvieron de animales (vacunos y porcinos), que fueron sacrificados en el camal municipal de la ciudad de Iquitos, el cual está ubicado en el distrito de Punchana.

Para el control positivo se empleó sangre de ovinos la cual se obtuvo de ejemplares de una granja del distrito de San Juan.

Con la finalidad de aislar cepas de *Campylobacter* termotolerantes, las muestras se obtuvieron del contenido intestinal, a través de la técnica del hisopado rectal que se realizaron a vacunos y porcinos, del camal municipal.

c. Obtención de sangre

La sangre desfibrinada se colectó asépticamente mediante una puntura en la vena yugular de los ovinos y corte directo en el pecho para vacunos y porcinos (cuatro de cada especie animal). Cabe recalcar que previamente se había constatado que a dichos animales no se les había suministrado antibiótico alguno (fotos N° 1 y 2). Para la toma de muestras de sangre se emplearon frascos estériles con EDTA (Ácido Di-Etil Amino Tetra Acético) como agente anticoagulante. La sangre colectada se mantuvo a 4° C y se empleó en un período no mayor de 7 días después de su colecta.

d. Aislamiento de las cepas de *Campylobacter* spp.

Las muestras (20 cepas) se obtuvieron del contenido intestinal de vacunos y porcinos, mediante la técnica del hisopado rectal, empleando el medio de Transporte y Enriquecimiento para *Campylobacter* (TEC), las cuales fueron transportadas al laboratorio de Microbiología y se sembraron por agotamiento en placas con agar Skirrow modificado. Estas se incubaron en condiciones de microaerofilia a 42 °C durante 48 horas, con la finalidad de aislar colonias típicas de *Campylobacter* (foto N° 3). Al término del período de incubación, se procedió a realizar el análisis de las placas y las colonias típicas se identificaron en forma presuntiva y confirmativa (Flujograma N° 1).

e. Identificación presuntiva de *Campylobacter* spp.

La identificación presuntiva se realizó por medio de una tinción de Gram, empleando fucsina básica como colorante de contraste. Además se realizó la prueba de la oxidasa y catalasa. Las colonias

que se identificaron como *Campylobacter spp.* (Bacilos curvos Gram negativos, oxidasa + y catalasa +) se repicaron en placas con agar sangre – FBP, luego fueron incubados en condiciones de microaerofilia a 42 °C durante 48 horas, con la finalidad de obtener cultivos puros y posibilitar la identificación confirmativa de *Campylobacter* termotolerantes (foto N° 3).

f. Identificación confirmativa de *Campylobacter spp.*

A partir de los cultivos puros que crecieron en agar sangre – FBP, se realizaron las pruebas *confirmativas* de hidrólisis del hipurato y sensibilidad al ácido nalidíxico (Tabla N° 1), cuyos procedimientos se describen a continuación:

Hidrólisis del Hipurato de Sodio (Lior, 1984).

El microorganismo produce la enzima hipuricasa, la cual sintetiza el hipurato de sodio, formando ácido benzoico y glicina, esta última reacciona con el reactivo de ninhidrina, produciendo una coloración púrpura.

Para realizar la prueba, se suspendió una muestra del cultivo usando el asa bacteriológica en 0,4 ml de una solución acuosa de hipurato de sodio al 1%, esterilizada por filtración, la cual se incubó en baño María a 37° C durante dos horas. Luego se agregó 0,2 ml de solución de ninhidrina al 3,5% (Anexo, Tabla N°10) y se procedió a reincubar durante diez minutos. La aparición de la coloración indicó positividad de la prueba, lo cual confirmó que se trataba de *Campylobacter jejuni*.

Sensibilidad al Acido Nalidíxico (Lior, 1984).

A partir de una suspensión bacteriana de densidad similar al tubo 1 del Nefelómetro de Mc Farland, se sembró en una placa con Agar Sangre-FBP y se colocó sobre ella un sensidisco de ácido nalidíxico



de 30 µg de concentración. Luego, se incubó a 42 °C durante 48 h, en microaerofilia. La presencia de un halo de inhibición del crecimiento superior a 20 mm. de diámetro, indicó sensibilidad de la cepa bacteriana a dicho antibiótico. La proporción de las soluciones se muestra en anexo, (Tabla N° 10).

Tabla N° 1: Pruebas utilizadas para diferenciar las especies de *Campylobacter* propuestas por Lior, 1984.

Especies	Crecimiento a 42 °C	Prueba de la hidrólisis del Hipurato	Prueba de Sensibilidad al Ac. Nalidixico
<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+
<i>Campylobacter coli</i>	+	-	+
<i>Campylobacter lari</i>	+	-	-

g. Determinación de la capacidad de crecimiento de las cepas usando sangre de porcino y vacuno como sustituto de la sangre de ovino.

Se procedió a preparar placas con agar sangre – FBP (foto N° 5). La sangre empleada como suplemento del medio de cultivo generalmente es de humano. En el presente estudio, la sangre varió de procedencia, ya que se empleó sangre de vacuno y de porcino, por otro lado, se usó como control positivo sangre de ovino.

Posteriormente, las cepas de *Campylobacter* que fueron previamente identificadas, fueron sembradas en dichos medios. Para determinar la capacidad de crecimiento se empleó el método del microrrecuento de colonias mediante la técnica de Miles y Misra modificada (Tresierra – Ayala *et al*, 1999), cuyo procedimiento se describe a continuación:

### Técnica de Miles y Misra:

Se realizó recuentos viables, para lo cual, fue necesario preparar una suspensión de cada cepa en suero fisiológico, equivalente al tubo N°1 del Nefelómetro de Mac Farland ( $3 \times 10^8$  cél/ml), a partir del cual se hicieron diluciones decimales hasta  $10^{-6}$  (Ver foto N° 4); luego, 20µl de cada dilución (por duplicado) fueron colocados sobre placas de Agar Sangre-FBP. Las placas fueron incubadas a 42°C durante 36 h, bajo condiciones de microaerofilia y se determinaron los recuentos viables con la ayuda de una lupa. (Flujograma N° 2).

#### h. Análisis de la influencia del pH sobre la capacidad hemolítica de las cepas.

Con el propósito de estudiar la influencia del pH sobre la capacidad hemolítica de las cepas de *Campylobacter* aisladas y determinar el pH adecuado para que el microorganismo lleve a cabo su posible actividad hemolítica, se procedió a variar el pH en cada placa, (pH 6.0, 6.5, 7.0 y 7.5). Cada cepa aislada fue sembrada en los diferentes medios de cultivo: Agar Sangre- FBP (empleando como suplemento sangre de vacuno, porcino y ovino respectivamente). Después de haber sembrado, se incubó a 42° C durante 48 horas. Transcurrido dicho periodo de incubación se realizó la lectura de los resultados a fin de determinar si existe alguna influencia del pH sobre la capacidad de hemólisis. Cabe mencionar que en este paso se realizó cuatros repeticiones para asegurar la confiabilidad de los resultados.

#### i. Análisis Estadístico.

Para el análisis de los resultados se empleo la estadística descriptiva mediante el uso de cuadros, gráficos y además fueron comparados por medio del análisis de varianza (ANOVA) facilitados por los programas SPSS versión 15 y Microsoft Excel.

#### IV. RESULTADOS

##### 1. Frecuencia de aislamiento de especies termotolerantes de *Campylobacter*.

Tabla N° 2. Frecuencia de aislamiento porcentual de cepas termotolerantes de *Campylobacter*.

Animal de origen	n	N° de portadores	%
Vacuno	25	10	40.0a
Porcino	16	10	62.5b
Total	41	20	48.8

Fuente: Datos obtenidos por los tesisistas.

- Valores a y b mostraron diferencia estadísticamente significativa al nivel 0.05

En la Tabla N° 2 se muestra la frecuencia de aislamiento de estos agentes bacterianos en los 41 animales analizados (25 vacunos y 16 porcinos), la cual fue de 48.8%. Por otro lado, los valores correspondientes a vacunos y porcinos fueron de 40.0% y 62.5%, respectivamente; diferencia que resultó ser estadísticamente significativa.

Tabla N° 3. Distribución de especies termotolerantes de *Campylobacter*.

Animal de origen	<i>Campylobacter jejuni</i>		<i>Campylobacter coli</i>		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%
Vacuno	8	80	2	20	10	100
Porcino	6	60	4	40	10	100
Total	14	70	6	30	20	100

Fuente: Datos obtenidos por los tesisistas.

En la tabla N° 3 se aprecia que de las 10 cepas obtenidas de ganado vacuno, 8 (80%) correspondieron a la especie *Campylobacter jejuni* y 2 (20%) a la especie *Campylobacter coli*. En cuanto a las 10 cepas obtenidas de porcinos, 6 (60%) correspondieron a la especie *Campylobacter jejuni* y 4 (40%) a *Campylobacter coli*. En total se obtuvieron 14 cepas de *Campylobacter jejuni* y 6 cepas de *Campylobacter coli*.

Tabla N° 4. Determinación de la capacidad de crecimiento de las cepas de *Campylobacter* (UFC/ml), según tipo de sangre empleada en el medio de cultivo.

CEPA	ORIGEN	SANGRE DE OVINO	SANGRE DE VACUNO	SANGRE DE PORCINO
1 <i>C. jejuni</i>	Vacuno	3.0 X 10 <sup>8</sup>	4.3 X 10 <sup>6</sup>	2.5 X 10 <sup>8</sup>
2 <i>C. jejuni</i>	Vacuno	6.5 X 10 <sup>8</sup>	4.5 X 10 <sup>5</sup>	4.5 X 10 <sup>8</sup>
3 <i>C. jejuni</i>	Vacuno	4.0 X 10 <sup>7</sup>	4.5 X 10 <sup>5</sup>	4.0 X 10 <sup>7</sup>
4 <i>C. jejuni</i>	Vacuno	4.3 X 10 <sup>8</sup>	7.5 X 10 <sup>6</sup>	3.3 X 10 <sup>8</sup>
5 <i>C. jejuni</i>	Porcino	1.8 X 10 <sup>8</sup>	8.5 X 10 <sup>6</sup>	4.2 X 10 <sup>8</sup>
6 <i>C. jejuni</i>	Vacuno	3.6 X 10 <sup>6</sup>	4.5 X 10 <sup>5</sup>	6.6 X 10 <sup>6</sup>
7 <i>C. jejuni</i>	Vacuno	4.5 X 10 <sup>8</sup>	4.5 X 10 <sup>5</sup>	3.3 X 10 <sup>8</sup>
8 <i>C. jejuni</i>	Porcino	3.6 X 10 <sup>8</sup>	1.2 X 10 <sup>6</sup>	2.7 X 10 <sup>8</sup>
9 <i>C. jejuni</i>	Vacuno	8.5 X 10 <sup>8</sup>	1.6 X 10 <sup>6</sup>	5.9 X 10 <sup>8</sup>
10 <i>C. jejuni</i>	Porcino	6.7 X 10 <sup>8</sup>	1.2 X 10 <sup>6</sup>	6.4 X 10 <sup>8</sup>
11 <i>C. jejuni</i>	Porcino	2.8 X 10 <sup>8</sup>	4.5 X 10 <sup>5</sup>	1.6 X 10 <sup>8</sup>
12 <i>C. jejuni</i>	Vacuno	4.8 X 10 <sup>8</sup>	4.5 X 10 <sup>5</sup>	3.8 X 10 <sup>8</sup>
13 <i>C. jejuni</i>	Porcino	6.7 X 10 <sup>8</sup>	4.5 X 10 <sup>5</sup>	5.7 X 10 <sup>8</sup>
14 <i>C. jejuni</i>	Porcino	5.1 X 10 <sup>8</sup>	1.7 X 10 <sup>6</sup>	3.8 X 10 <sup>8</sup>
15 <i>C. coli</i>	Porcino	5.7 X 10 <sup>8</sup>	1.6 X 10 <sup>6</sup>	3.6 X 10 <sup>8</sup>
16 <i>C. coli</i>	Vacuno	5.6 X 10 <sup>6</sup>	4.5 X 10 <sup>5</sup>	5.5 X 10 <sup>6</sup>
17 <i>C. coli</i>	Porcino	5.8 X 10 <sup>8</sup>	4.5 X 10 <sup>5</sup>	3.4 X 10 <sup>8</sup>
18 <i>C. coli</i>	Porcino	4.2 X 10 <sup>8</sup>	4.5 X 10 <sup>5</sup>	3.6 X 10 <sup>8</sup>
19 <i>C. coli</i>	Vacuno	1.7 X 10 <sup>8</sup>	2.3 X 10 <sup>7</sup>	4.2 X 10 <sup>8</sup>
20 <i>C. coli</i>	Porcino	7.5 X 10 <sup>7</sup>	4.6 X 10 <sup>6</sup>	4.6 X 10 <sup>7</sup>

Fuente: Datos obtenidos por los testistas.

Los resultados que se muestran en la Tabla N° 4 son los promedios de las 4 repeticiones que se obtuvieron del recuento de UFC/ml, tomando al pH del medio:  $7.1 \pm 0.1$  y a la dilución  $10^{-6}$ ; como punto de partida para las respectivas comparaciones entre el control positivo y los medios de cultivo de prueba; debido a que en dicha dilución se obtuvo el menor crecimiento y esto permitía los realizar los recuentos.

2. Determinación del número de UFC/ml de cepas de *Campylobacter* en medios con sangre de porcino, ovino y vacuno.

Tabla N° 5. Determinación del número de UFC/ml de cepas de *Campylobacter* en medios con sangre de porcino, ovino y vacuno.

AGAR SANGRE:	COMPARACION	DIFERENCIA DE MEDIAS	SIG.
SANGRE DE OVINO	SANGRE DE VACUNO	3,8173a	0,000
	SANGRE DE PORCINO	0,6730b	0,466
SANGRE DE VACUNO	SANGRE DE OVINO	-3,8173a	0,000
	SANGRE DE PORCINO	-3,1442a	0,000
SANGRE DE PORCINO	SANGRE DE OVINO	-0,6730b	0,466
	SANGRE DE VACUNO	3,1442a	0,000

• Valores a y b mostraron diferencia estadísticamente significativa al nivel 0.05

En la Tabla N° 5, se puede apreciar las comparaciones del número de UFC/ml de las cepas de *Campylobacter* termotolerantes que crecieron en los diferentes medios; mostrando que el crecimiento en el medio con sangre de porcino fue mayor que el crecimiento en el medio que contenía sangre de vacuno; dicha diferencia resultó ser estadísticamente significativa ( $P \leq 0.05$ ).

3. Comparaciones múltiples de las medias de UFC/ml. según especie

Tabla N° 6. Comparaciones múltiples de las medias de UFC/ml. de *C. jejuni*, a través del ANOVA, entre los tipos de sangre empleados.

AGAR SANGRE:	COMPARACION	DIFERENCIA DE MEDIAS	SIG.
SANGRE DE PORCINO	SANGRE DE OVINO	-0,755a	0,514
	SANGRE DE VACUNO	3,420 b	0,000
SANGRE DE OVINO	SANGRE DE PORCINO	0,755a	0,514
	SANGRE DE VACUNO	4,175 b	0,000
SANGRE DE VACUNO	SANGRE DE PORCINO	-3,420 b	0,000
	SANGRE DE OVINO	-4,175 b	0,000

• Valores a y b mostraron diferencia estadísticamente significativa al nivel 0.05

En las Tablas N° 6, se muestra los análisis estadísticos del número de UFC/ml de las cepas de *Campylobacter jejuni* que crecieron en los medios que contenían sangre de porcino y de vacuno.

Se puede apreciar que, no hubo diferencia significativa ( $P>0.05$ ) entre las medias de las UFC/ml que crecieron en el medio de cultivo que contenía sangre de cerdo y el control positivo (medio con sangre de ovino), en cambio si se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $P<0.05$ ) entre el control positivo y el medio con sangre de vacuno (Foto N° 6).

Entre las medias de las UFC/ml que crecieron en el medio de cultivo que contenía sangre de cerdo y sangre de vacuno se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P<0.05$ ).

Tabla N° 7. Comparaciones múltiples de las medias de UFC/ml de *C. coli*, a través del ANOVA, entre los tipos de sangre empleados.

SANGRE DEL MEDIO	COMPARACION	DIFERENCIA DE MEDIAS	SIG.
SANGRE DE PORCINO	SANGRE DE OVINO	-0,183a	0,968
	SANGRE DE VACUNO	3,166b	0,002
SANGRE DE OVINO	SANGRE DE PORCINO	0,183a	0,968
	SANGRE DE VACUNO	3,349b	0,001
SANGRE DE VACUNO	SANGRE DE PORCINO	-3,166 b	0,002
	SANGRE DE OVINO	-3,349 b	0,001

- Valores a y b mostraron diferencia estadísticamente significativa al nivel 0.05

En la Tabla N° 7, se muestra los análisis estadísticos de los números de UFC/ml de cepas de *Campylobacter coli* que crecieron en los medios que contenían sangre de porcino y de vacuno.

Se puede apreciar que, no hubo diferencia significativa ( $P>0.05$ ) entre las medias de las UFC/ml que crecieron en el medio de cultivo que contenía sangre de cerdo y el control positivo (medio con sangre de ovino), en cambio si se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $P<0.05$ ) entre el control positivo y el medio con sangre de vacuno (Foto N° 6).

Entre las medias de las UFC/ml que crecieron en el medio de cultivo que contenía sangre de cerdo y sangre de vacuno se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P<0.05$ ).

4. Análisis de la influencia del pH sobre la capacidad hemolítica de las cepas de *Campylobacter*.

Tabla N° 8: Actividad  $\alpha$  – hemolítica producida por las cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*.

ESPECIE	CEPAS	pH	Sangre de Ovino		Sangre de Porcino		Sangre de Vacuno	
			N°	%	N°	%	N°	%
<i>C. jejuni</i>	14	6.0	5	36	7	50	3	21
		6.5	6	43	5	36	3	21
		7.0	0	0	1	7	0	0
		7.5	0	0	0	0	0	0
<i>C. coli</i>	6	6.0	2	33	2	33	0	0
		6.5	1	17	2	33	0	0
		7.0	0	0	0	0	0	0
		7.5	0	0	0	0	0	0

Fuente: Datos obtenidos por los testistas.

La actividad  $\alpha$  – hemolítica se muestra en la tabla N° 8, dicha actividad se pudo apreciar a los seis días después de la siembra. (Foto N° 7).

En dicha Tabla se observa que, de las 14 cepas de *Campylobacter jejuni* estudiadas, el número de cepas que produjeron  $\alpha$  - hemólisis a pH 6.0 fue: 5 (36%), 7 (50%) y 3 (21%) en medios con sangre de ovino, porcino y vacuno, respectivamente. El número de cepas de *Campylobacter jejuni* que produjeron hemólisis a pH 6.5 fue: 6 (43%), 5 (36%) y 3 (21%) en medios con sangre de ovino, porcino y vacuno, respectivamente. El número de cepas de *Campylobacter jejuni* que produjeron hemólisis a pH 7.0 fue: 1 (7%), sólo en medio con sangre de porcino y ninguna en las demás variantes. Cabe mencionar que ninguna de las 14 cepas produjo hemólisis a pH 7.5.

En la misma tabla se observa que, de las 6 cepas de *Campylobacter coli* estudiadas, 2 (33%) produjeron  $\alpha$  - hemólisis a pH 6.0, tanto en medios con sangre de ovino como de porcino. Por otro lado, el número de cepas de *Campylobacter coli* que produjeron hemólisis a pH 6.5 fue: 1 (17%) y 2 (33%) en medios con sangre de ovino y porcino, respectivamente. Cabe mencionar que ninguna de estas 6 cepas produjo hemólisis a pH 7.0 y 7.5.

Tabla N° 9: Actividad  $\beta$  – hemolítica producida por las cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*.

ESPECIE	CEPAS	pH	Sangre de Ovino		Sangre de Porcino		Sangre de Vacuno	
			N°	%	N°	%	N°	%
<i>C. jejuni</i>	14	6.0	3	21	5	36	1	7
		6.5	2	14	2	14	0	0
		7.0	0	0	1	7	0	0
		7.5	0	0	0	0	0	0
<i>C. coli</i>	6	6.0	0	0	0	0	0	0
		6.5	0	0	0	0	0	0
		7.0	0	0	0	0	0	0
		7.5	0	0	0	0	0	0

Fuente: Datos obtenidos por los tesistas.

En la Tabla N° 9 se observa que, de las 14 cepas de *Campylobacter jejuni* estudiadas, el número de cepas que produjeron  $\beta$  - hemólisis a pH 6.0 fue: 3 (21%), 5 (36%) y 1 (7%) en medios con sangre de ovino, porcino y vacuno, respectivamente. El número de cepas de *Campylobacter jejuni* que produjeron hemólisis a pH 6.5 fue: 2 (14%), tanto en medios con sangre de ovino y de porcino. El número de cepas de *Campylobacter jejuni* que produjeron hemólisis a pH 7.0 fue: 1 (7%) solamente en medio con sangre de porcino.

Cabe mencionar que ninguna de las 6 cepas de *Campylobacter coli* produjo  $\beta$  - hemólisis en ninguna de las condiciones.



## V. DISCUSIÓN

Las bacterias termotolerantes del género *Campylobacter* aisladas en este estudio procedieron de los principales mamíferos (vacunos y porcinos), que, con frecuencia, en la región son destinados al consumo humano. El empleo de estos animales se hizo tomando como base lo manifestado por ROSEF y KAPPERUD (1983), quienes afirmaron que las bacterias termotolerantes del género *Campylobacter* son frecuentemente encontradas como comensales o patógenos en el tracto intestinal de dichos mamíferos y aves domésticas, debido a que en sus resultados las tasas de portación eran de 50.7% en moscas capturadas en granjas de pollos y un 43.2% en una granja de cerdos. La tasa de aislamiento encontrada en el presente estudio fue de 48.8 %, valor que es notoriamente superior al determinado por ESPINOZA (1995), quien reportó una tasa de 25.3%, al realizar un estudio de la prevalencia de las especies termotolerantes de *Campylobacter* en vacunos y porcinos domésticos de la ciudad de Iquitos.

Tal como se puede observar en la Tabla 2, tanto en vacunos como en porcinos, se lograron aislar cepas de *Campylobacter* termotolerantes (40.0% y 62.5%, respectivamente), dicha diferencia resultó ser estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ). A pesar que ESPINOZA (1995), también encontró un mayor porcentaje de aislamiento en porcinos (42.7%) que en bovinos (8.0%), llama la atención el elevado porcentaje de portación encontrado en el presente estudio, en porcinos; hecho que podría deberse a las deficientes condiciones sanitarias en las cuales se criaba dicho ganado. Al parecer, en el presente estudio, *Campylobacter jejuni* fue aislado con mayor frecuencia que *C. coli*, (70 y 30%, respectivamente), proporción que es contrastante con lo reportado por el mismo autor, ya que en su estudio determinó una tasa de aislamiento de *Campylobacter jejuni* de 39.5% y de *Campylobacter coli* de 60.5%. Esta diferencia podría deberse a que en el presente estudio, se analizaron mayor número de vacas (25) que de cerdos (16), hecho que no sucedió en el trabajo de ESPINOZA (1995), ya que él analizó 75 individuos de cada grupo de mamíferos y, además, el cerdo ha

sido reconocido como el reservorio más importante de la especie *Campylobacter coli*. (FERNANDEZ, 1983) y (FERNANDEZ, 1992).

Las especies termotolerantes de *Campylobacter* aisladas mostraron capacidad de crecimiento en los medios de cultivo suplementados con sangre de vacuno y porcino, al igual que el suplementado con sangre de ovino; sin embargo, el crecimiento de dichas especies bacterianas en el medio suplementado con sangre de porcino fue estadísticamente similar al observado en el medio suplementado con sangre de ovino (Ver tabla 4). Dicho comportamiento no se observó al comparar el crecimiento de las cepas en el medio suplementado con sangre de vacuno con respecto al de ovino, puesto que la diferencia existente resultó no ser estadísticamente significativa. Por consiguiente, se puede afirmar que *Campylobacter* muestra un mayor crecimiento en presencia de sangre de porcino con respecto al mostrado en el medio con sangre de vacuno.

De modo que, estos resultados indican que para el crecimiento de *Campylobacter spp* se recomienda el empleo de la sangre de cerdo como suplemento del medio de cultivo, cuando no hay disponibilidad de sangre de caballo u oveja. Dicha aseveración coincide con lo indicado por ANAND *et al.* (2000), puesto que estos investigadores manifiestan que en muchos países en vías de desarrollo, la sangre de caballo y oveja constituyen el suplemento recomendado para los medios de cultivo de microorganismos; sin embargo, estas, al no ser fáciles de conseguir, sugieren el empleo de la sangre de cerdo o cabra en la preparación de agar sangre.

Por otro lado, en cuanto a la capacidad hemolítica de *Campylobacter*, se demostró que no todas las cepas mostraron dicha característica (Tablas N° 8 y 9). Situación similar fue reportada por ROZALSKI & KOTESKO (1987), al estudiar la actividad hemolítica e invasividad de la bacteria, Gram (-) *Proteus penneri* debido a la producción de un factor hemolítico celular obligatorio, que solo demostrado en caldos de cultivos; y al parecer facilita la penetración de *Proteus penneri* y otras especies de *Proteus* dentro

de la célula sin efectos citotóxicos. Además, al igual como sucede con otras especies bacterianas, la actividad hemolítica de *Campylobacter* spp. depende de las condiciones estrictas de incubación, ya que estas bacterias son extremadamente exigentes. (OKAZAKI *et al.*, 2003) y (PICKETT *et al.*, 1992).

Cabe mencionar a MISAWA *et al.* (1995), quienes determinaron que la actividad  $\alpha$  – hemolítica de *Campylobacter jejuni* era claramente visible cuando el rango de pH del medio de cultivo fluctuaba entre 6.0 a 6.5, pero las zonas hemolíticas no eran observables cuando el pH del medio se incrementaba por encima de este rango. Además, observaron que la actividad  $\beta$  – hemolítica era apreciable después de una incubación más prolongada y ninguno de estos tipos de hemólisis estuvo influenciado por el tipo de sangre empleada como suplemento en el medio de cultivo. Hecho que fue comprobado en el presente estudio, ya que la hemólisis generada por las cepas en estudio se puso de manifiesto mayormente a partir de los 6 días de incubación ( $\alpha$  – hemólisis) y 10 días de incubación ( $\beta$  – hemólisis), indistintamente del tipo de sangre utilizada.

La sangre procedente de las diferentes especies de animales empleadas en este estudio fue procesada utilizando como anticoagulante el EDTA (ácido estilen-diamina-tetra-acético), el cual, a diferencia de otros anticoagulantes, como el citrato de sodio, está libre de agentes que pueden interferir en el desarrollo microbiano, tal como lo recomienda ENGBERG *et al.* (2000) al analizar la prevalencia de *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* y *Sutterella* spp encontraron un porcentaje de aislamiento de 95% en el medio CCDA el cual en su composición contiene anticoagulantes libres de citratos y otros agentes que interfieren con el desarrollo microbiano.

## VI. CONCLUSIONES

1. La especie de *Campylobacter* más frecuentemente aislada en el presente trabajo fue *Campylobacter jejuni*.
2. El ganado porcino presenta un mayor nivel de portación de *Campylobacter* termotolerantes en relación al ganado vacuno.
3. La capacidad de crecimiento de las cepas de *Campylobacter* termotolerantes ensayadas es similar en medios de agar sangre de ovino y porcino.
4. En medios de agar sangre de vacuno la capacidad de crecimiento de las cepas de *Campylobacter* termotolerantes es menor que en medios con sangre de porcino y ovino.
5. Las cepas de *Campylobacter* termotolerantes, aisladas en el presente estudio mostraron actividad  $\alpha$  hemolítica cuando el pH del medio fluctuaba entre 6,0 a 6,5.
6. *Campylobacter coli* no muestran capacidad de producir  $\beta$  hemólisis en ninguno de los pH analizados.
7. *Campylobacter jejuni* muestra capacidad de producir  $\beta$  hemólisis en un rango de pH de 6 a 6.5.
8. La capacidad hemolítica de las cepas no se ve influenciada por el tipo de sangre empleada como suplemento del medio de cultivo, más sí por el tiempo de incubación del cultivo.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda el empleo de sangre de cerdo como suplemento de los diferentes medios destinados para el aislamiento y crecimiento de *Campylobacter* termotolerantes más frecuentes en nuestra zona.
2. Realizar investigaciones similares en las cuales se incluya un mayor número de cepas a analizar, a fin de obtener resultados más concluyentes.
3. Se recomienda que las autoridades pertinentes mejoren las condiciones de higiene en el matadero municipal para evitar la alta contaminación de las muestras.
4. Se recomienda el uso de anticoagulantes libres de citratos y otros compuestos que puedan interferir con el crecimiento microbiano.

## VIII. RESUMEN

El presente trabajo tuvo por finalidad aislar e identificar cepas de *Campylobacter* termotolerantes, determinar si estas eran capaces de crecer en medios suplementados con sangre de vacuno o porcino, así como analizar la influencia del pH del medio de cultivo sobre la capacidad hemolítica de dichas cepas.

A través del análisis del contenido intestinal, se aislaron 20 cepas provenientes de mamíferos domésticos (10 de vacunos y 10 de porcinos), de las cuales, 14 fueron identificadas como *Campylobacter jejuni* y 6 cepas como *Campylobacter coli*.

Para la determinación de la capacidad de crecimiento de las cepas empleando sangre de porcino y vacuno como sustituto de la sangre de ovino, se empleó la técnica de Miles y Misra modificada por Tresierra – Ayala *et al*, 1999, realizando recuentos viables, para lo cual, fue necesario preparar una suspensión de cada cepa en suero fisiológico estéril (aprox.  $3 \times 10^8$  cél/ml), a partir de la cual se hicieron diluciones decimales hasta  $10^{-6}$ ; luego se sembró 20µl de cada dilución (por duplicado), en placas con Agar Sangre-FBP (con sus tres variantes). Las placas fueron incubadas a 42°C durante 48 h, para luego proceder al recuento.

Finalmente, con el propósito de estudiar la influencia del pH sobre la capacidad hemolítica de las cepas y determinar el pH adecuado para que *Campylobacter* manifieste dicha actividad, se procedió a variar el pH en cada variante del medio de cultivo, (pH 6.0, 6.5, 7.0 y 7.5). Después de la siembra de las cepas, se incubó a 42° C durante 48 h y posteriormente se realizaron las lecturas, mostrando dicha actividad a partir de 5 a 6 días a fin de determinar si existía alguna influencia del pH sobre la capacidad de hemólisis.

Se concluye que las cepas estudiadas son capaces de mostrar un óptimo crecimiento en medios suplementados con sangre de porcino y un menor crecimiento en medios suplementados con sangre de vacuno, diferencia que resultó ser estadísticamente significativa. Por otro lado, se determinó que la actividad  $\alpha$  - hemolítica de las cepas era claramente observable en un rango de pH del medio de cultivo entre: 6,0 y 6,5. Además se apreció que la actividad  $\beta$  hemolítica se pone de manifiesto solo para *Campylobacter jejuni* y después de una prolongada incubación (a partir de los 10 días) y que el tipo de sangre empleada como suplemento del medio no posee influencia sobre la capacidad hemolítica de las cepas más sí el tiempo de incubación de los cultivos bacterianos.

## IX. 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. **Arimi, S.; Park, R. & Fricker, C.** 1990. Study of haemolytic activity of some *Campylobacter* spp. on blood agar plates. *J. Appl. Bacteriol.* 69:384 – 389.
3. **Blaser, M.; Taylor, D.; & Feldman, R.** 1983. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infection. *Epidemiol. Rev* 5:157 – 176.
4. **Butzler, J. & Skirrow M.** 1979. *Campylobacter* enteritis. *Clinical Gastroenterology.* 8:737 – 765.
5. **Camasca, S. N.** 1986. *Campylobacter jejuni* en gastroenteritis infantil. VIII Congreso Nacional de Biología. Libro de Resumen, Arequipa – Perú. 306p
6. **Canals, A. & Rosell, J.** 2001. Campylobacteriosis en aves de corral Departamento de Sanitat y Seguretat Social. Generalitat de Catalunya. Veterinario Oficial Matadero de Aves Moré, S.A. (Argenton).
7. **Engberg, J.; Stephen, L.; Harrington, C. & Gerner-Smidt, P.** 2000. Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, and *Sutterella* spp. in Human Fecal Samples as Estimated by a Reevaluation of Isolation Methods for Campylobacters. Department of Gastrointestinal Infections, Division of Diagnostics, Statens Serum Institut, DK-2300 Copenhagen S, <sup>1</sup> and Danish Veterinary Laboratory, DK-1790 Copenhagen V, <sup>2</sup> Denmark. *J. Clin. Microbiol.* 38/286-291.



8. **Espinoza, F.** 1995. Presencia de *Campylobacter* termotolerantes en bovinos y porcinos de consumo en la ciudad de Iquitos. Iquitos (PE), Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. 44p.
9. **Fernández, M.** 1983. Especies Termófilas de *Campylobacter*: Aspectos bacteriológicos, epidemiológicos y patogénicos. Tesis Doctoral. Escola Paulista de Medicina. Sao Paulo, Brasil. 144pp.
10. **Fernández, H.** 1992. Thermotolerant *Campylobacter* species associated with human diarrhoea in Latin America. J. Braz. Ass. Adv. Sci. 44:39 – 43.
11. **Lior, H.** 1984. New, extend biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari*. J. Clin. Microbiol. 20: 636 – 640.
12. **Luo, G.; Lakshman, P. & Yau, J.** 2001. *Candida* species exhibit differential in vitro haemolytic activities. J. Clin. Microbiol. 39:2971 – 2974.
13. **Lund, M.; Nordentoft, S.; Pedersen, K. & Madsen, M.** 2004. Detection of *Campylobacter* spp. in Chicken Faecal Samples by Real-Time PCR. J. Clin. Microbiol. 2:5125-5132
14. **Misawa, N.; Hirayama, K.; Itoh, K. & Takahashi, E.** 1995. Detection of Alpha – and – Beta – Haemolytic – Like Activity from *Campylobacter jejuni*. J. Clin. Microbiol. 33:729 – 731.
15. **Okazaki, N.; Osawa, R.; Suzuki, R.; Nikkawa, T. & Whiley, R. A.** 2003. Novel observation of hot-cold-hot hemolysis exhibited by group B streptococci. J. Clin. Microbiol. 2:877 – 879.

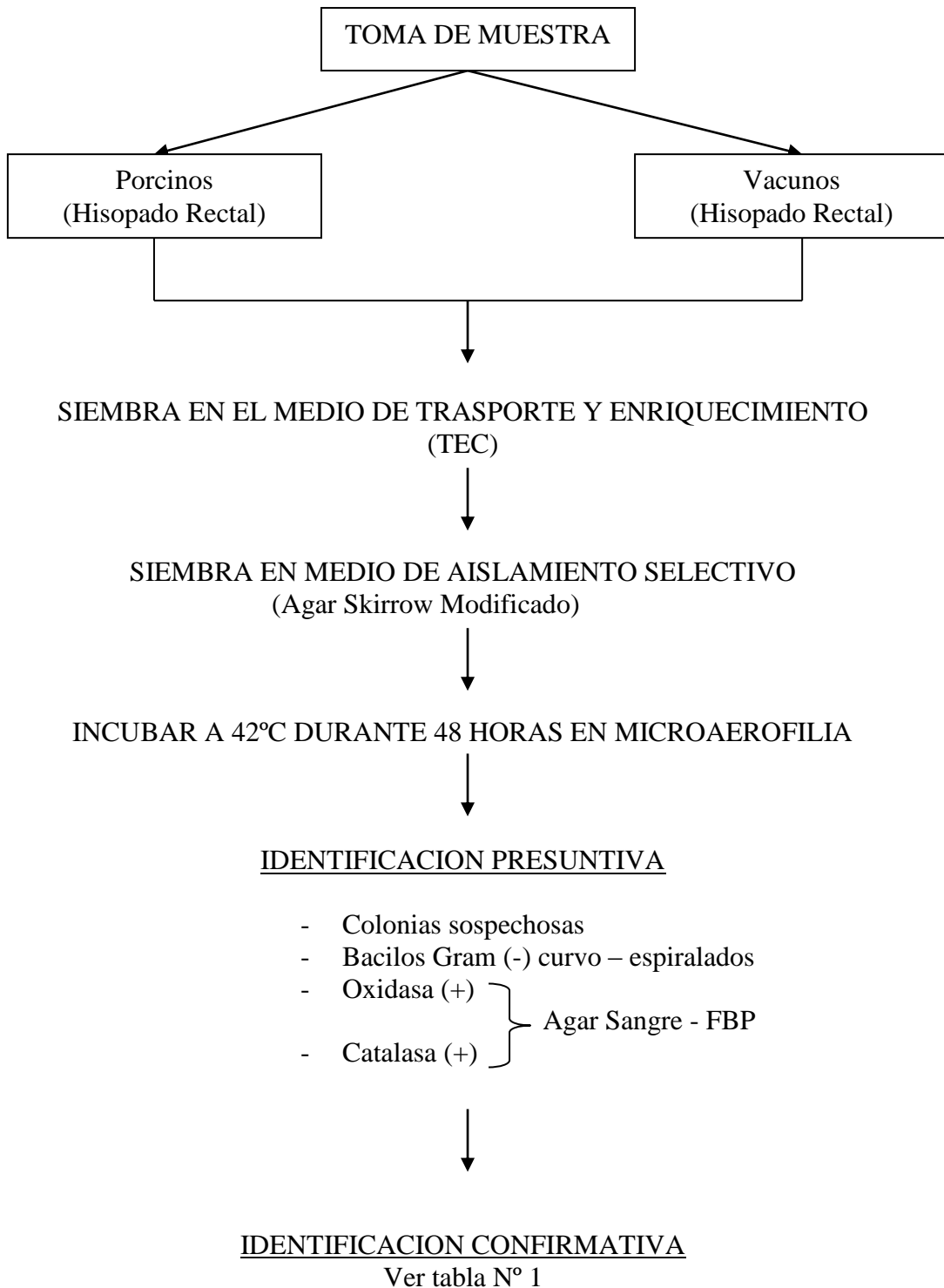
16. **Pickett C. L.; Auffenberg, T.; Pesci, E. C.; Sheen, V. L. & Jusuf, S. S.** 1992. Iron Acquisition and Hemolysin Production by *Campylobacter jejuni*. J. Clin. Microbiol. 9:3872 – 3877.
17. **Rosef, O. & Kapperud, G.** 1983. House flies (*Musca domestica*) as possible vectors of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. Appl. Environ. Microbiol. 45: 381 – 383.
18. **Rozalski, R & Kotesko, K.** 1987. Haemolytic activity and invasiveness in strains of *Proteus penneri*. J. Clin. Microbiol. 6:1094 – 1096.
19. **Smibert, R. M.** 1984. Genus *Campylobacter* (Sebald and Veron 1963), p. 11 – 118. In N.R. Krieg and J.g. Holt (ed), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.1. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
20. **Skirrow, M.** 1977. *Campylobacter* enteritis: A " new " disease. Br. Med. J. 2:9-11.
21. **Tresierra – Ayala, A.; Fernández, H.; Bendayán, M.; Pereyra, G. & Bernuy, A.** 1995. Aislamiento de especies termotolerantes de *Campylobacter* en dos poblaciones de pollos criados con y sin confinamiento. Rev. Saúde Pública. 29:5.
22. **Tresierra – Ayala A; Espinoza F. & Bendayán M.** 1996. Wild Primates, Natural Reservoirs of Thermotolerant Campylobacters in Eastern Peru. Neotropical Primates. 4:57 – 58.
23. **Tresierra – Ayala A. & Fernández H.** 1997. Occurrence of Thermotolerant *Campylobacter* Species in Domestic and Wild Monkeys from Peru. J. Vet. Med. B. 44:61 – 64.

# ANEXO

## ABREVIATURAS

- EDTA : Ácido di – etil amino tetra acético.
- TEC : Transporte y Enriquecimiento para Campylobacter.
- FBP : Sales empleadas para el Agar Skirrow; F = Sulfato Ferroso,  
B = Metabisulfito de sodio y P = Piruvato de Sodio.
- UNAP : Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.

Flujograma 1: Aislamiento e Identificación de *Campylobacter* Termotolerantes a partir de Hisopado Rectal.



Flujograma N° 2: Método de Miles y Misra modificado (Tresierra – Ayala, 1999)

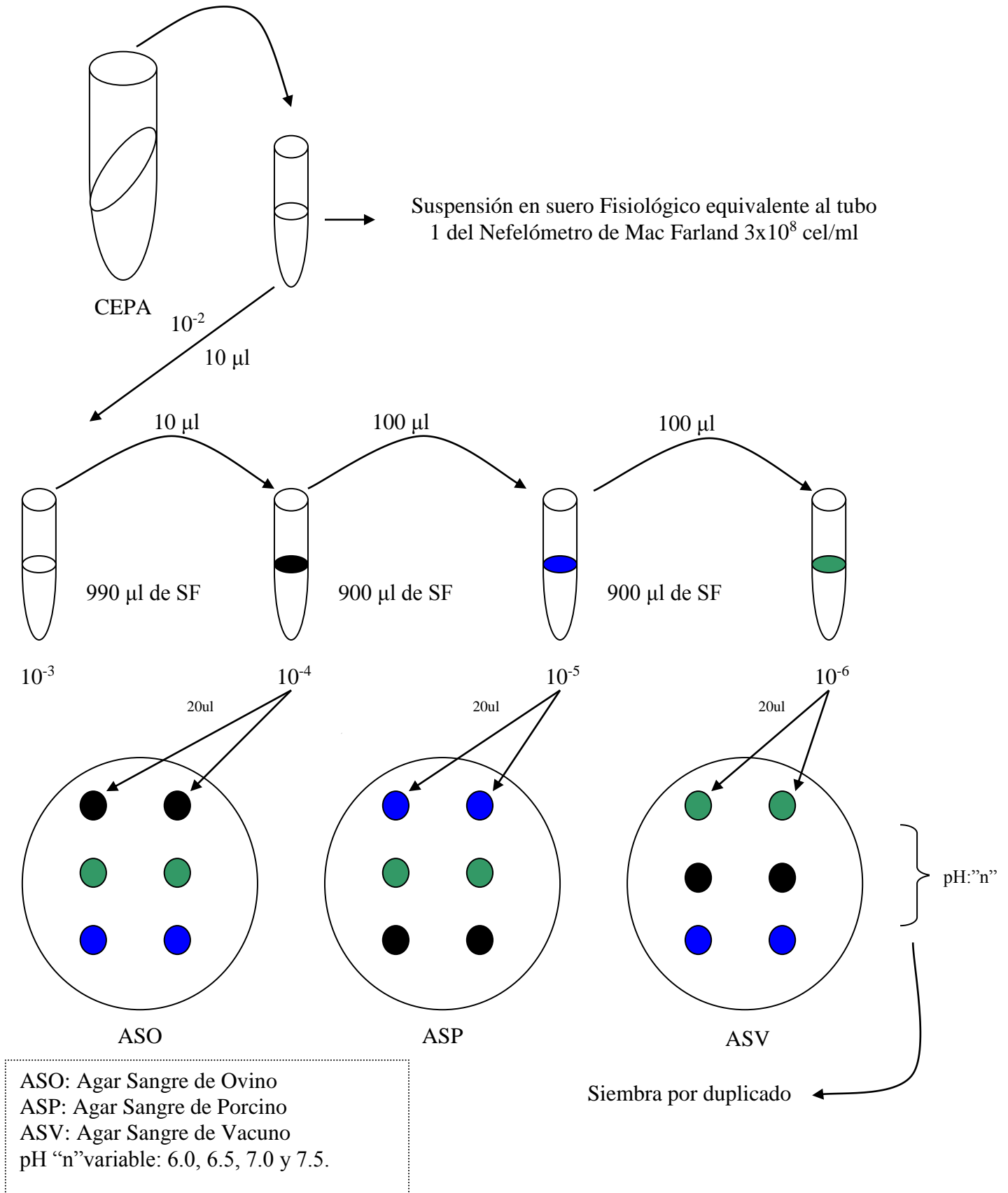


Tabla N° 10: Proporción de las soluciones usadas para la identificación confirmativa de *Campylobacter spp.*

<b>SOLUCION DE HIPURATO DE SODIO AL 1%.</b>		<b>SOLUCION DE NINHIDRINA AL 3,5%.</b>	
Hipurato de sodio	1,0 g.	Ninhidrina	3,5 g.
Agua destilada c.s.p.	100,0 ml.	Acetona	50,0 ml.
		Butanol	50,0 ml.

Se esteriliza por filtración y se distribuye asépticamente en tubos estériles, a razón de 0.4 ml/tubo. La solución se mantiene en frasco ámbar y bajo congelación hasta su uso.

**FOTO N° 1: OBTENCION DE SANGRE DE VACUNO**

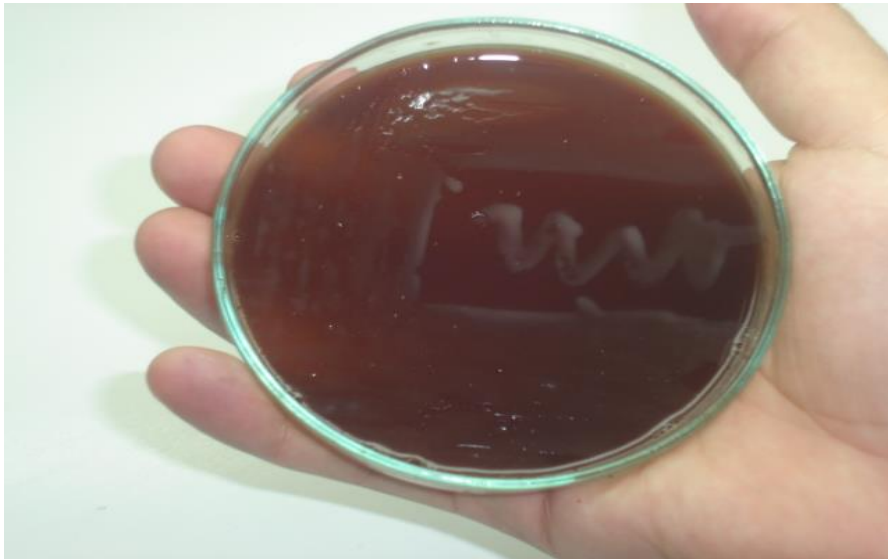


**FOTO N° 2: OBTENCION DE SANGRE DE PORCINO**





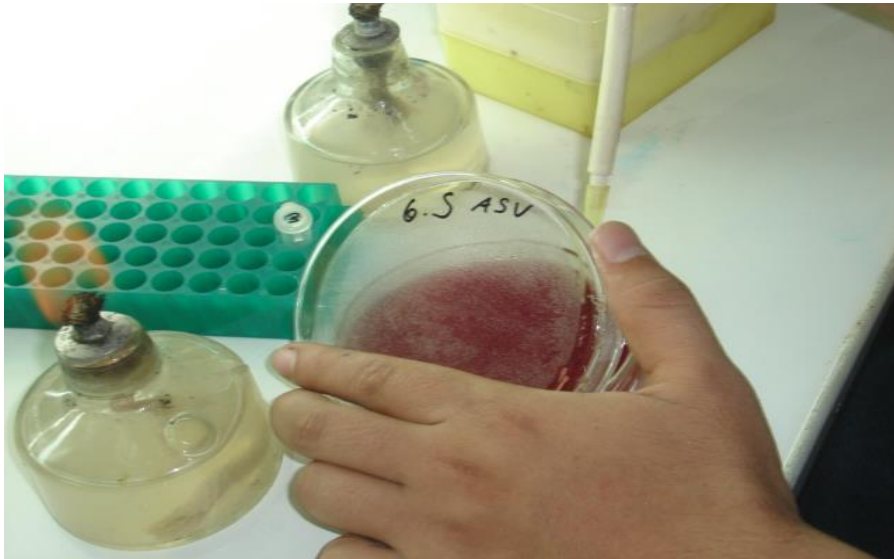
**FOTO N° 3: AISLAMIENTO DE *CAMPYLOBACTER* TERMOTOLERANTES**



**FOTO N° 4: TÉCNICA DE MILES Y MISRA**



**FOTO N° 5: PROCESO DE SIEMBRA DE LAS RESPECTIVAS  
DILUCIONES**



**FOTO N° 6: CRECIMIENTO EN PLACA SUPLEMENTADA  
CON SANGRE DE CERDO**



**FOTO N° 7: PRODUCCION DE ACTIVIDAD  
 $\alpha$  - HEMOLÍTICA**



**FOTO N° 8: PRODUCCION DE ACTIVIDAD  
 $\beta$  - HEMOLÍTICA**

