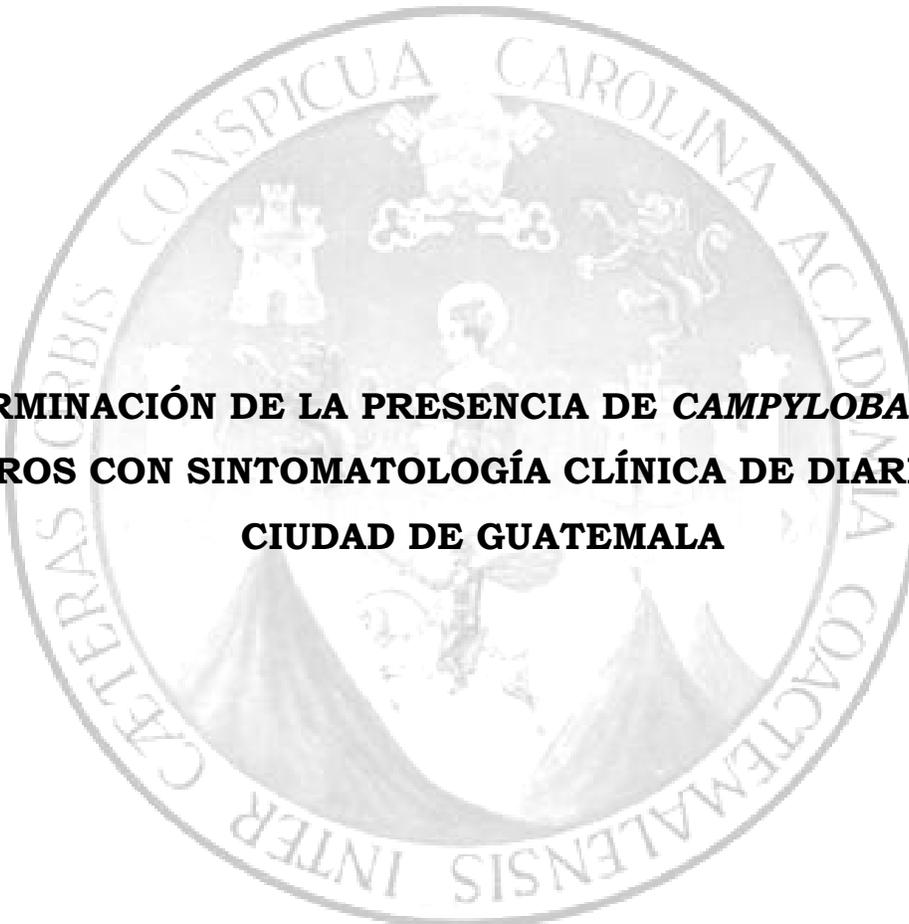


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Escuela de Medicina Veterinaria

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a figure, surrounded by a Latin inscription: "CETTERAS CORBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER".

**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *CAMPYLOBACTER SP.*
EN PERROS CON SINTOMATOLOGÍA CLÍNICA DE DIARREA EN LA
CIUDAD DE GUATEMALA**

Sandra Viviana Sáenz Galdámez de Fuentes

Guatemala, marzo del 2007

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Escuela de Medicina Veterinaria

**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *CAMPYLOBACTER SP.*
EN PERROS CON SINTOMATOLOGÍA CLÍNICA DE DIARREA EN LA
CIUDAD DE GUATEMALA**

Tesis

Presentada a la Honorable Junta Directiva de la Facultad de
Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Por

Sandra Viviana Sáenz Galdámez de Fuentes

Al conferírsele el grado académico de

Médica Veterinaria

Guatemala, marzo del 2007

Junta Directiva
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad de San Carlos de Guatemala

Decano: Lic. Zoot. Marco Vinicio De La Rosa M.
Secretario: Med. Vet. Marco Vinicio García Urbina
Vocal I: Med. Vet. Yeri Véliz Porras
Vocal II: Mag. Sc. Fredy González
Vocal III: Med. Vet. Edgar Bailey
Vocal IV: Br. Yadyra Rocío Pérez Flores
Vocal V: Br. José Abraham Ramírez Chang

Asesores:

Med. Vet. Virginia Bolaños de Corzo
Med. Vet. Jaime Rolando Méndez Sosa
Med. Vet. Rolando Gudiel Jovel

Honorable Tribunal Examinador

En cumplimiento con lo establecido por los estatutos de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a consideración de ustedes el trabajo de tesis titulado:

**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *CAMPYLOBACTER SP.*
EN PERROS CON SINTOMATOLOGÍA CLÍNICA DE DIARREA EN LA
CIUDAD DE GUATEMALA**

Que fuera aprobado por la Junta Directiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia como requisito previo a optar el título profesional de

Médica Veterinaria

TESIS QUE DEDICO

A mi Padre Dios

A mi amada familia

A mi bello país Guatemala

A mi querida Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

A la honorable Universidad de San Carlos de Guatemala

A mis asesores Dra. Virginia Bolaños de Corzo

 Dr. Jaime Rolando Méndez Sosa

 Dr. Rolando Gudiel Jovel

A todo el personal del Departamento de Microbiología

A cada una de las Clínicas Veterinarias y Hospital Veterinario de la FMVZ por su colaboración para la realización del presente estudio.

ACTO QUE DEDICO

- A mi amado Dios: Por darme la vida, estar siempre a mi lado y brindarme la oportunidad de ser completamente feliz.
- A mi madre: Doris Elizabeth Galdámez Monterroso por enseñarme la importancia de la honradez y el trabajo duro para salir adelante.
- A mi padre: Eliseo Sáenz Rodas por enseñarme a amar la naturaleza y ayudar a toda aquella persona que lo necesite.
- A mi esposo: Ing. Erick Fuentes Barrientos por amarme tanto, apoyar mi pasión por los animales y permitirme seguir estudiando hasta lograr mi sueño de ser Médico Veterinario y gozar juntos esta aventura que me condujo a ser una profesional.
- A mi pequeña hija: Luz Daniela por darle luz y felicidad completa a mi vida. Lucharé para que te sientas orgullosa de mi.
- A mis hermanos: Manuel Alejandro y Fabio Javier, y su mama Carmencita de Sáenz por darme siempre apoyo y cariño sincero.
- A mis tíos y primos: Por demostrarme su cariño y estar siempre conmigo.
- A mis suegros y su familia: Por hacerme sentir parte de su familia y demostrarme el cariño tan grande que me tienen.
- A mis catedráticos: Por compartir sus experiencias y enseñarnos a ser buenos profesionales.
- A mis asesores: Dra. Virginia Bolaños de Corzo
Dr. Jaime Rolando Méndez Sosa
Dr. Rolando Gudiel Jovel
Por confiar en mi y ayudarme a realizar un buen trabajo.
- A mis amigos: Heidi, Anacani, Melissa, Eddy, Ruby, Argelia, Ismael, Asdrúbal y muchos amigos más, por su maravillosa amistad. Siempre estarán en mi corazón.
- A mis amigos y gemelos: Mérida y Andrea gracias por cuidarme, quererme, hacerme feliz y por compartir la idea de siempre hacer las cosas bien.

A todo los catedráticos de clínicas de menores: Dra. Andrea Portillo, Dr. Jorge Orellana, Dr. Otto Lima, Dr. Rolando Gudiel, Dra. Griselda Arizandieta, Dr. Jorge Miranda; catedráticos de clínicas de mayores: Dr. Sergio Véliz, Dr. Fredy González, Dr. Juan Prem, Dr. Yeri Véliz, Dr. Leonidas Ávila; catedráticos de clínicas de vida silvestre Dr. Dennis Guerra y Dr. Hector Fuentes; y todo el personal del Hospital Veterinario de la FMVZ: Vilma, Harry, Chico, Panta, Jerry y Don Rolando, a todos gracias por sus enseñanzas, colaboración, cariño, y compartir conmigo una de las etapas mas felices y satisfactorias de mi vida.

Al Dr. Alfredo Viau, Dra. Beatriz de Viau, Dr. Juan Pablo Calderón, Dr. Haroldo Bosque y todo el personal de la Clínica Veterinaria “Super Pet” por su amistad y haberme brindado su tiempo para enseñarme y siempre ayudarme de la manera mas atenta.

Al Dr. M.V. José Victor Roma Batres: por su especial amistad y valiosas enseñanzas (lo llevaré siempre en mis recuerdos y mi corazón).

A cada una de las personas del personal docente, estudiantil y administrativo de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por su colaboración y amistad, gracias !!

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	OBJETIVOS	
2.1	General	2
2.2	Específicos	2
III.	REVISIÓN DE LITERATURA	
3.1	Campylobacter	3
3.1.1	Morfología y tinción	4
3.1.2	Características de crecimiento	5
3.2	Campilobacteriosis (en tracto digestivo)	5
3.2.1	Reservorios	6
3.2.2	Forma de infección	7
3.2.3	Patogenia	7
3.2.4	Signos clínicos en perros y gatos (con enfermedad clínica)	8
3.2.5	Signos clínicos en humanos	9
3.2.6	Epidemiología	9
3.2.7	Tratamiento	13
3.2.8	Prevención y control	13
3.2.9	Diagnóstico de Laboratorio	14
3.2.9.1	Recolección de la muestra	14
3.2.9.2	Técnicas de aislamiento	14
3.2.9.2.1	Agar selectivo para Campylobacter sp.	15
3.2.9.2.2	Método de Filtración para la detección de Campylobacter en heces	17
3.2.9.3	Atmósfera de Incubación	19

3.2.9.4	Evaluación de las placas	20
3.2.9.5	Identificación presuntiva	21
3.2.9.6	Identificación final	22
IV. MATERIALES Y MÉTODOS		
4.1	Materiales	25
4.1.1	Recursos humanos	25
4.1.2	De laboratorio	25
4.1.3	De campo	26
4.1.4	De tipo biológico	27
4.1.5	Centros de Referencia	27
4.2	Métodos	27
4.2.1	Diseño del estudio	27
4.2.2	Tamaño de la muestra	28
4.2.3	Toma de la muestra	28
4.2.4	Procedimiento de laboratorio	29
4.3	Análisis Estadístico	30
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
VI.	CONCLUSIONES	33
VII.	RECOMENDACIONES	34
VIII.	RESUMEN	35
IX.	BIBLIOGRAFÍA	37
X.	ANEXOS	39
	Anexo No.1 Instructivo para la toma de muestras	40
	Anexo No. 2 Ficha de recolección de datos	41
	Anexo No. 3 – Cuadros	42
	Anexo No. 4 – Gráficas	50

I. INTRODUCCIÓN

La campilobacteriosis es una enfermedad infecciosa de distribución mundial frecuente en países desarrollados y subdesarrollados, causada por bacterias del género *Campylobacter*, provocando gastroenteritis en aves, animales de compañía, animales de granja, el hombre y de forma más frecuente en niños.

La forma de infección es por ingestión de carnes, subproductos de origen animal y agua contaminados con heces infectadas. Los niños resultan ser más fácilmente afectados ya que además tienen mayor contacto con animales de compañía que son reservorios de la bacteria.

En Guatemala la identificación de *Campylobacter* como agente causal de diarrea en humanos no está incluida en la rutina bacteriológica de los laboratorios, pero gracias a algunos estudios se han encontrado infecciones en pacientes humanos por esta bacteria.

En el área veterinaria las diarreas en animales de compañía son tratadas sin haberse diagnosticado antes el agente causal, por lo que no se ha aislado aún la bacteria en perros y gatos en nuestro país. Esto indica que en Guatemala aún no se sabe si algunas de las diarreas en humanos causadas por *Campylobacter* pudieron haber sido por contaminación al tener contacto con animales de compañía.

El presente estudio consistirá en determinar la presencia de *Campylobacter sp.* en perros con sintomatología clínica de diarrea que asistan a clínicas veterinarias en la ciudad de Guatemala. Se aislará utilizando el método de Filtración en agar sangre utilizando membranas de Nitrocelulosa, la prueba de oxidasa para identificar presencia de citocromo oxidasa y Tinción de Gram para identificar los bacilos por su forma característica.

II. OBJETIVOS

2.1 General:

Contribuir al estudio de la Campylobacteriosis en perros atendidos en clínicas veterinarias de la ciudad de Guatemala.

2.2 Específicos:

Determinar la presencia de *Campylobacter sp.* en perros con sintomatología clínica de diarrea que asistan a clínicas veterinarias de la ciudad de Guatemala.

Establecer los determinantes epidemiológicos del huésped en la ocurrencia de la enfermedad (raza, edad, sexo).

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 CAMPYLOBACTER

Es una de las causas de infección intestinal más común en humanos. Es una zoonosis de distribución mundial, siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad principalmente en niños. (4,7,15)

Los primeros aislamientos de especies del género *Campylobacter* fueron realizados en el área de microbiología veterinaria en 1909 y 1913. Mac Fadyean, Stockmann y Smith en 1918, establecieron la presencia de una bacteria microaerófila en el aborto de bovinos y ovinos, de morfología similar a las especies del género *Vibrio*, denominándola *Vibrio fetus*. En 1931, Jones y Little aislaron a partir de bovinos con trastornos intestinales un vibrion microaerófilo al que denominaron *Vibrio jejuni*. En 1944, Doyle describió un vibrión aislado del intestino de cerdos con diarrea, al que denominó *Vibrio coli*. (5)

La primera asociación entre esta bacteria y la diarrea en el hombre fue sugerida por Levy en 1946, quien realizó un estudio en un brote de gastroenteritis en 357 pacientes, observando en exámenes directos de heces la presencia de formas bacterianas semejantes a *Vibrio* en el 20% de las muestras. (5)

En 1963, Sebald y Veron incluyen a éstas bacterias en el género *Campylobacter* (campylo=curvo) (bacter=bacteria). Esto se debió a que presentan diferencias importantes con relación a la constitución del DNA y por su incapacidad de fermentar los hidratos de carbono. (5,14)

En la década del 70, Butzler y Skirrow, Bolton y Robertson, Blazer y Col, desarrollaron medios selectivos que permitieron aislar éste germen con mayor facilidad y establecer su participación en diferentes cuadros infecciosos en el hombre. (5)

En 1972 Dekeyser y Butzler aislaron los microorganismos de las heces de pacientes con enteritis aguda usando una técnica de filtración que permitía el pasaje de pequeños bastones curvos a través de una membrana logrando retener gérmenes fecales más grandes. (5)

En 1992, los estudios taxonómicos de Bañadme, llevaron a la creación de la familia *Campylobacteraceae*, que incluye los géneros *Campylobacter* que no puede crecer a menos de 15°C ni en presencia de oxígeno, y *Arcobacter* que puede crecer a temperaturas entre 15 y 37°C y en presencia de oxígeno. (5)

3.1.1 Morfología y tinción:

Bacilos gram-negativos, delgados, curvados o espiralados (del griego *Campylo*=curvado), con un tamaño aproximado de 0.2 a 0.5 micras de ancho por 0.5 a 5 micras de largo, y tienen movilidad gracias a un flagelo polar en uno o ambos extremos. Cuando dos o más bacilos se colocan juntos toman forma de S, W o alas de gaviota. (2,5,6,12,14).

Morfología de las colonias:

Si se utiliza un medio de cultivo fresco e incubación por 48 horas, las colonias adquieren un aspecto de gota; esto se debe al movimiento activo del *Campylobacter* haciendo que se alejen del centro de la colonia. Algunos autores lo describen como gotas de agua. (3)

Las colonias no son hemolíticas y tienen un aspecto plano, acuso, color gris o ligeramente pardo y bordes irregulares. (3)

Las colonias de *Campylobacter jejuni* además son satinadas y extendidas. Posteriormente se hacen mates y a veces muestran brillo metálico.

Las colonias de *Campylobacter coli* son menos extendidas que permanecen siempre brillantes. (14)

3.1.2 Características de crecimiento:

Las especies de *Campylobacter* son microaerófilas, por lo que necesitan para crecer una atmósfera que contenga de 3 a 15% de oxígeno (O₂) y 3 a 5% de dióxido de carbono (CO₂). Su sensibilidad al oxígeno es una de sus características más importantes. Su metabolismo es únicamente respiratorio por lo que no metabolizan los azúcares, utilizando como fuentes de carbono y energía algunos aminoácidos y ácidos tricarboxílicos. Todas las especies son oxidasa-positivas y catalasa-positivo, a excepción del grupo de *Campylobacter* denominadas CNW (catalasa-negativas o débilmente catalasa-negativas). En general, todas las especies de *Campylobacter* tienen una actividad bioquímica extremadamente lenta. (2,14)

Son sensibles a la desecación, pasteurización, luz solar directa, condiciones ácidas y a la mayoría de desinfectantes. A temperaturas de refrigeración y congelación se van debilitando y disminuyendo en número. (2,14)

Todas las especies son capaces de desarrollarse a una temperatura de 37°C, pero la temperatura óptima de crecimiento es a 42-43°C. (2,3,5)

Su velocidad de crecimiento es más lenta que las bacterias de la flora normal entérica, por lo que es necesario para su aislamiento a partir de materia fecal, la utilización de medios de cultivo selectivos que inhiban dicha flora. (7)

3.2 CAMPILOBACTERIOSIS (en tracto digestivo)

Es una enfermedad infecciosa bacteriana causada por bacterias del género *Campylobacter*, que puede causar gastroenteritis en perros, gatos, otros animales y humanos. Es causada principalmente por *Campylobacter jejuni*.(4,11)

Los perros y gatos jóvenes (menores de 6 meses de edad) parecen ser más susceptibles a la infección y a presentar enfermedad clínica. (6)

Así mismo los animales sometidos a estrés pueden ser también susceptibles a la patología clínica. (6)

Las especies de *Campylobacter* que afectan el tracto digestivo de los animales son: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. hyointestinalis*, *C. mucosalis*, *C. lari*, *C. pylori* y las CNW (catalasa-negativas o débilmente catalasa-negativas). *C. fetus* subespecies *fetus* y *venerealis* afectan el tracto reproductor de bovinos y ovinos provocando abortos. (2,12)

Entre las especies de *Campylobacter* que afectan el tracto gastrointestinal, *C. coli* y más comúnmente *C. jejuni*, son los principales causales de gastroenteritis en personas, encontrándose también en muestras de heces de perros y gatos con diarrea. *C. mucosalis* y *C. hyointestinalis* se les atribuye ser agentes coadyuvantes en el complejo de la enteritis proliferativa del cerdo; *C. pylori* se ha relacionado con gastritis y la formación de úlceras gástricas principalmente en humanos; *C. lari* ha sido aislado de intestino de gaviota y el hombre pero aún no se ha definido si es patógeno, y los *Campylobacter* del grupo CNW se ha aislado en heces de perros y gatos con diarrea. (2, 5)

3.2.1 Reservorios:

Los principales reservorios animales son los bovinos, ovinos, porcinos, roedores, aves de corral, perros y gatos. (7,14)

Los animales y los subproductos de origen animal son las fuentes de contaminación para humanos y animales sensibles. Por ejemplo *C. jejuni* se ha encontrado en la leche no pasteurizada, canales de aves y heces de perros y gatos; y *C. hyointestinales* y *C. mucosalis* en heces de cerdos infectados. (2,6)

Los reservorios ambientales son el agua y la tierra contaminada con materia fecal infectada. (7)

3.2.2 Forma de infección:

Tanto en animales como en humanos el germen debe ser ingerido para causar la enfermedad (vía fecal-oral directa o indirecta), es decir que la infección tiene lugar como consecuencia de la ingestión directa de las heces o bien de la ingestión de un producto animal o agua contaminado con heces infectadas. (2,6,14)

La vía de infección humana más frecuente es el consumo de carne de animales infectados, la leche no pasteurizada y agua contaminada. La otra vía también importante pero menos frecuente es la ingestión accidental de heces de animales infectados (contacto directo); y aún menos frecuente la transmisión fecal-oral de persona a persona por ingerir alimentos manipulados por personas infectadas y sintomáticas. (7,14)

La transmisión del germen a los niños resulta fácil por ser los animales de compañía (perros y gatos) reservorios del *Campylobacter*. (14)

3.2.3 Patogenia:

C. jejuni se adhiere a las células del intestino delgado (yeyuno, ileo) y colon. Se multiplica e invade las células blanco del epitelio. Elabora una toxina parecida a la toxina termolábil (LT) que produce la *Escherichia coli*, que destruye el epitelio mucoso, desempeñando un papel importante en el daño inflamatorio. El bacilo vive en el interior de los fagocitos mononucleares por lo que la respuesta inflamatoria no logra controlar la infección. El resultado de la invasión generalmente es una enterocolitis glandular, pérdida de la producción de mucus, abscesos de las criptas y ulceración de la mucosa epitelial. Estas características patológicas son similares a las que se observan en la infección por *Salmonella* y *Shigella*. (2,7)

La gravedad de la infección depende de la exposición previa, cantidad y virulencia de los microorganismos ingeridos, el desarrollo de anticuerpos protectores y la presencia de otros enteropatógenos. El estrés ambiental, fisiológico o las

infecciones entéricas concurrentes pueden exacerbar la intensidad de la enfermedad. (6)

C. mucosalis y *C. hyointestinalis* se les atribuye ser los microorganismos causantes de la enteritis proliferativa del cerdo en donde se produce adenomatosis intestinal, enteritis necrótica, ileítis regional y enteropatía hemorrágica proliferativa. (2)

C. pylori produce grandes cantidades de amoníaco a partir de la urea en alimentos como la leche, provocando gastritis y úlceras pépticas en humanos. Se cree que el amoníaco producido se almacena por debajo de la capa mucosa del estómago del individuo y se ha observado la formación de pilares adheridos al epitelio intestinal que lo destruyen. (2)

Se ha demostrado que el flagelo del género *Campylobacter* actúa como adhesina que le permite la adherencia a las células epiteliales y al mucus intestinal. (5)

3.2.4 Signos clínicos en perros y gatos (con enfermedad clínica):

El principal signo es la diarrea que puede ser desde leve hasta acuosa o mucoide sanguinolenta. Además puede presentarse fiebre, anorexia y vómitos. La condición generalmente dura 1-3 semanas. (6)

C. jejuni: puede causar diarrea aguda o crónica comúnmente con moco y sangre del intestino grueso en animales menores de 6 meses. Puede ocasionar enfermedad sistémica y colecistitis (inflamación de la vesícula biliar). (6)

Pueden haber animales infectados que eliminan el germen en las heces y no presentar sintomatología clínica. (11)

3.2.5 Signos clínicos en humanos:

Generalmente se presenta de forma aguda, con diarrea que puede ser sanguinolenta, vómitos, dolor de cabeza, malestar muscular y abdominal, calambres, fiebre y anorexia, dentro de los 5 días después de la exposición al microorganismo. (4,5,6,14)

El curso es benigno observándose la recuperación durante los 7-10 días después de haberse iniciado la infección. La enfermedad puede dar lugar a complicaciones como apendicitis, peritonitis y colecistitis. (4,14)

En personas con un sistema inmunológico deprimido, el *Campylobacter* puede ocasionar colecistitis aguda, pancreatitis, cistitis, artritis reactiva, síndrome urémico hemolítico, nefritis intersticial, hepatitis o una grave infección septicémica y poner en peligro la vida. (4,5)

En algunas ocasiones, la persona infectada con varias semanas de diarrea puede adquirir una enfermedad que afecta al sistema nervioso llamada Síndrome de Guillain-Barré. Esta ocurre cuando el sistema inmunológico de la persona empieza a atacar al sistema nervioso pudiendo provocar hasta una parálisis que dura varias semanas. Se estima que en Estados Unidos, 1 de cada 1,000 casos de Campilobacteriosis conduce a padecer este síndrome. (4)

3.2.6 Epidemiología:

En 1973 se efectuó el primer aislamiento de *Campylobacter* en muestras de heces diarreicas y fue entonces cuando se reconoció como un microorganismo patógeno para el ser humano. Actualmente constituye uno de los agentes más importantes involucrados en las diarreas infantiles, asociándose al contacto con animales e ingestión de agua o alimentos de origen animal contaminados, principalmente aves. (3,5)

El *Campylobacter* es una de las causas bacterianas más comunes de infección intestinal en humanos en Estados Unidos, países desarrollados y en vías de desarrollo. Se presentan como casos aislados y no como un brote. Es una zoonosis de distribución mundial, siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en la niñez. (4,7,15)

Según Robert V. (1982-1986), en Estados Unidos el 76% de aislamientos realizados en muestras de heces, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* fueron las especies predominantes. (3)

Según Molina (1995), en una investigación realizada en Paris, Francia, la infección por *Campylobacter* fue documentada en el 76% de los pacientes que presentaban el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Las especies identificadas fueron *Campylobacter jejuni* (84%) y *Campylobacter coli* (16%). (3)

Font C. (1997), en un estudio realizado en Barcelona, España, detectó que en todos los casos fatales, *Campylobacter jejuni* era resistente a la antibioterapia empírica usada; además detectó una resistencia a ciprofloxacina y susceptibilidad a eritromicina y aminoglucósidos. (3)

En Estados Unidos la incidencia es alrededor de 20 casos por cada 100,000 personas diagnosticadas. Aproximadamente 2.4 millones de personas son afectadas cada año, estimándose que 500 de éstas pueden ser casos fatales. (3)

Estudios elaborados en diferentes países en desarrollo reportan que el 32% de los casos de diarrea en niños menores de 5 años son debidos a *Campylobacter*. (15)

En Dinamarca constituye la causa más común de enfermedad zoonótica transmitida por alimentos con 82 casos por cada 100,000 habitantes. (3)

En Perú, en el 2001 se realizó un estudio en niños menores de 2 años con cuadro clínico de diarrea que se atendieron en 4 centros de salud, con el objetivo de determinar la frecuencia de *Campylobacter* y *Shigella* como agentes etiológicos en diarrea aguda acuosa. De un 19% de niños positivos a diarrea bacteriana, el 33.39% fue a causa de *Campylobacter jejuni*. (15)

En América Latina, estudios de años recientes en niños con diarrea muestran que *Campylobacter* se encuentra en un porcentaje menor a otras bacterias como *Escherichia coli* y *Shigella*. (3)

En Guatemala se han efectuado muy pocos estudios sobre *Campylobacter sp.* como agente etiológico de la diarrea en humanos por lo que no se conoce con exactitud su frecuencia y prevalencia. Además la identificación de este microorganismo no es incluida en la rutina bacteriológica de la mayoría de laboratorios clínicos privados y públicos del país. Probablemente esto se deba a que se trata de una bacteria difícil de aislar por requerir condiciones y materiales específicos para su cultivo. (3) ** *** ****

Los dos hospitales públicos de la ciudad de Guatemala: Hospital Roosevelt y Hospital General San Juan de Dios actualmente no realizan ninguna prueba para el aislamiento de *Campylobacter sp.* ** ***

** Hospital Roosevelt. 2006. Aislamiento de *Campylobacter sp.* Guatemala. Laboratorio de Microbiología. (Comunicación personal)

*** Hospital General San Juan de Dios. 2006. Aislamiento de *Campylobacter sp.* Guatemala. Laboratorio de Microbiología. (Comunicación personal)

**** Chang, J. 2006. Diagnóstico de *Campylobacter sp.* Guatemala. Clínica privada de gastroenterología. (Comunicación personal)

En Guatemala no hay una vigilancia puntual haciendo de la *Campylobacteriosis* humana una enfermedad no importante desde el punto de vista epidemiológico. Así mismo no existe una iniciativa que logre hacer del diagnóstico de *Campylobacter sp.* una prueba de rutina. *

En Guatemala en el año 2003 se desarrolló una investigación en el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) en donde indican que en Guatemala el *Campylobacter* es responsable del 12% de los casos de diarrea en el área rural y del 5% de los casos hospitalarios. En el área rural es el segundo patógeno más importante causante de diarrea. Entre el 2001 y 2003 de 101 cepas de la bacteria obtenidas en la aldea Santa María de Jesús, el 45% de la cepas fueron susceptibles a la ampicilina, el 57% a la fluoroquinolona y el 76% a la eritromicina. (8)

En el 2006 se realizó un informe de tesis donde se evaluaron 502 muestras de heces humanas provenientes de centros de salud del Departamento de Guatemala referidas al Laboratorio Nacional de Salud. Únicamente hubo 17 aislamientos de los cuales 1 correspondió a *Campylobacter jejuni*, 10 a *Salmonella sp.*, 3 a *Shigella sp.* y 3 a *E. coli*. Esto demostró que *Campylobacter sp.* no es un agente muy común causante de diarrea en los centros de salud del Departamento de Guatemala. (3)

Por ser la vigilancia de ésta bacteria generalmente incompleta, su incidencia no se conoce en la mayoría de los países del mundo; únicamente se logra tener una estimación en base a registros de laboratorio como en Estados Unidos donde se ha estimado aproximadamente 2 millones de infecciones en humanos anuales por ésta bacteria. En Inglaterra se reportan más casos por *Campylobacter* que por *Salmonella* y *Shigella*. (7)

* Mateu, J. 2006. Diagnóstico de *Campylobacter sp.* en laboratorio. Guatemala. Laboratorio Nacional de Salud. (Comunicación personal)

3.2.7 Tratamiento:

En humanos la enfermedad generalmente es autolimitante. Si los síntomas continúan por más de 10 días deberá tratarse con antibióticos.

La eritromicina es el fármaco de elección para la diarrea en humanos. La tetraciclina, aminoglucósidos, clindamicina, azitromicina, ciprofloxacina y quinolonas por lo general son efectivos. (2,3,6)

Las medidas para evitar la deshidratación consisten en ingerir soluciones de electrolitos para reponer los líquidos perdidos por la diarrea. Las personas que no pueden tomar líquidos vía oral necesitan líquidos vía intravenosa, especialmente en niños. (3)

La mayoría de las infecciones en animales también son autolimitantes. La eficacia de la antibioticoterapia en perros y gatos con diarrea asociada a campylobacter es desconocida, pero puede intentarse con eritromicina. (2,6)

Las fluoroquinolonas son altamente eficaces en humanos pero su uso en perros y gatos se debe reservar para casos resistentes a causa del riesgo de inducir resistencia antimicrobiana de éstas bacterias en animales. Además como la campilobacteriosis a menudo se ha observado en animales jóvenes, el uso de éste químico esta contraindicado por su toxicidad para el cartílago en desarrollo. (6)

3.2.8 Prevención y control:

- Cocción completa de alimentos de origen animal, especialmente la carne de aves. (7)
- Lavarse las manos con jabón después de manipular alimentos crudos de origen animal. (2)
- Lavar tablas de cocina, mostradores y superficies donde se haya manipulado alimentos crudos de origen animal. (7)
- Consumir leche y subproductos lácteos pasteurizados. (2)

- Consumir agua potable. (2)
- Evitar que personas con enfermedad intestinal manipulen alimentos para consumo de otras personas. (14)
- Si se tiene mascotas tomar medidas higiénicas como lavado de manos después de tocar a los animales, así como limpieza y desinfección de instalaciones. (2)

3.2.9 Diagnóstico de laboratorio:

3.2.9.1 Recolección de la muestra:

Para el diagnóstico de las infecciones por *C. jejuni* y *C. coli* se deben obtener muestras de heces directas del recto, ya sea con hisopo rectal o por evacuación espontánea. Para *C. hyointestinalis* o *C. mucosalis* en enteritis proliferativa se debe hacer raspados del intestino afectado; y para diagnosticar *C. pylori* hacer una biopsia de estómago. (2, 5)

Campylobacter jejuni se encuentra en heces a 25°C por pocas horas, pero sobrevive por lo menos 2 semanas a 4°C en heces, leche, agua y orina. Las muestras que no pueden ser examinadas inmediatamente pueden ser colocadas en refrigeración 1 o 2 días. Los microorganismos que se encuentran en hisopados pueden ser inoculados en el medio de transporte Cary-Blair y almacenarlo en refrigeración (4°C). (3)

3.2.9.2 Técnicas de aislamiento:

Para el cultivo y aislamiento de *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. hyointestinalis* y *C. mucosalis* a partir de materia fecal se requiere de una atmósfera microaerófila (tensiones bajas de oxígeno y elevadas concentraciones de dióxido de carbono); la utilización de medios de enriquecimiento y medios de cultivo selectivos conteniendo sustancias inhibitoras (vancomicina, polimixina B y trimetroprin), ya que las muestras pueden llevar flora acompañante; pH cercano al neutro

(6.5-6.9) y temperatura óptima de desarrollo 42-43°C, aunque pueden desarrollarse a 37°C. (2,5,14)

Se requiere medios de transporte adecuados como Cary-Blair mantenido a 4°C, más un medio de enriquecimiento. Dado que en una diarrea el número de *Campylobacter* es alto, no es necesario realizar enriquecimiento, sólo en caso de esperar un bajo número de microorganismos como en manipuladores y convalecientes. (5,6)

Para aislar de agua es necesario filtrar un volumen considerable, centrifugar y sembrar. (5)

Las muestras de biopsia de estómago para aislar *C. pylori* se deben sembrar en placas de agar chocolate. (2)

3.2.9.2.1 Agar selectivo para *Campylobacter* sp.:

Se usa para el aislamiento de *Campylobacter* sp. a partir de alimentos y agua contaminada y material clínico en medicina humana y veterinaria. Es un medio rico en nutrientes que presenta un pH de 7.3, y es necesario incubarlo en una atmósfera pobre en oxígeno y rica en dióxido de carbono. Los antibióticos que se añaden como suplemento selectivo para *Campylobacter* inhiben considerablemente la flora acompañante.

Composición:

Peptona-proteína	21.0 g/litro
Electrolitos	5.0 g/litro
Almidón soluble	1.0 g/litro
Agar-agar	13.0 g/litro (3)

Preparación:

Se disuelven 40 g/litro de agua, esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C, dejar enfriar a 40-50°C, incorporar 50-70 ml de sangre de oveja recién obtenida y desfibrinar. Luego añadir 1 frasco de suplemento selectivo para *Campylobacter* por cada 200 ml de medio de cultivo y verter en placas. (9)

Incubación:

24-48 horas en una atmósfera pobre en oxígeno y rica en dióxido de carbono producida en una jarra para anaerobios. (9)

Suplemento selectivo para Campylobacter:

Es una mezcla de 3 antibióticos en forma liofilizada. Reprime el crecimiento de microorganismos acompañantes de origen fecal durante el desarrollo de especies de *Campylobacter*. (9)

Composición (cada frasco):

Vancomicina	2.0 mg
Polimixina	50.0 mg
Trimetoprim	1.0 mg (3)

Preparación:

Cada frasco de liofilizado se disuelve en el mismo frasco original con 2 ml de agua destilada. (9)

Para incorporar éste suplemento al Agar selectivo para *Campylobacter*, se mezcla 1 frasco disuelto del suplemento por cada 200 ml del Agar selectivo para *Campylobacter* estéril y enfriado pero aún en estado fluido, mezclando homogéneamente. (9)

3.2.9.2.2 Método de Filtración para la detección de *Campylobacter* en heces

Desde Dekeyser et al (Estados Unidos, 1972) se ha utilizado la técnica de filtración para demostrar la presencia de *Campylobacter* en heces de pacientes con diarrea, ayudando a aclarar que la enteritis por *Campylobacter* es común. (3)

El método se basa en la separación del *Campylobacter* del resto de la flora microbiana presente en las heces como son los coliformes, quedando éstos retenidos en la superficie de la membrana de celulosa de 0.45 o 0.66micras. Las células de *Campylobacter* por tener un bajo diámetro, logran traspasar la membrana y van a depositarse sobre un medio enriquecido con sangre que actuará como sustrato para su crecimiento. De esta manera se obtiene un cultivo puro, lo que reemplaza a la adición de antibióticos para eliminar la flora acompañante. (5)

- Agar sangre (base):

Se usa para el aislamiento y cultivo de diversos microorganismos, principalmente patógenos exigentes, y para su determinación. Su abundante base nutritiva ofrece condiciones óptimas de crecimiento. Su pH de 6.8 es especial para la conservación de los eritrocitos y para la formación de halos hemolíticos claros. Por calentamiento, después de la adición de sangre se obtiene el Agar sangre cocida o Agar chocolate. (9)

Composición:

Sustrato nutritivo (extracto de corazón y peptonas)	20.0 g/litro
Cloruro sódico	5.0 g/litro
Agar-agar	15.0 g/litro
Aditivo: sangre	50-80 ml/litro (3)

Preparación:

Se disuelven 40g en un litro de agua destilada, se lleva a ebullición hasta disolver completamente. Agitar y esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C, dejar enfriar a 45-50°C. Incorporar 5-8% de sangre de oveja recién obtenida y desfibrinada y verter en placas de petri. Almacenar en refrigeración. Tiempo máximo para su uso 3 meses. (9)

- Membranas o filtros de Nitrocelulosa:

Su composición es una mezcla biológica de Acetato de celulosa y Nitrato de celulosa. (10)

La utilización de filtros permite el pasaje del *Campylobacter* por ser una bacteria tan pequeña en comparación al resto de bacterias de la flora normal entérica que no logran pasar dichos filtros.

Seguido del cultivo en un medio no selectivo como el agar sangre, representa un avance muy importante en el aislamiento del *Campylobacter*, *siendo actualmente el método más recomendado*. (7)

Procedimiento:

Depositar de forma aséptica con una pinza los filtros estériles de nitrocelulosa de 0.45micras sobre la superficie del medio de cultivo. Realizar una suspensión de materia fecal en solución fisiológica o caldo nutritivo y con una micropipeta o pipeta Pasteur, depositar de 100 a 200 microlitros sobre la membrana, evitando que se derrame o salpique sobre el medio de cultivo. Dejar que se filtre y recargar los filtros nuevamente. Una vez que se ha secado la suspensión sobre el filtro, levantarlo con la pinza y desecharlo. Colocar las placas en una jarra para incubar en microaerofilia a 42-43°C durante 24-48 horas. La incubación debe prolongarse hasta 7 días antes de dar por negativa una muestra. Al obtener colonias sospechosas de *Campylobacter*, continuar con los métodos de identificación y tipificación. (5)

3.2.9.3 Atmósfera de Incubación

Algunos de los métodos para obtener una atmósfera de incubación adecuada para el desarrollo del *Campylobacter* son:

- a) Reemplazo de una atmósfera normal por una mezcla de gases apropiada: se retira el aire contenido en la jarra anaeróbica con una bomba de vacío y se reemplaza por una mezcla que contenga 85% de nitrógeno, 10% de dióxido de carbono y 5% de oxígeno. Algunas especies como *Campylobacter hyointestinalis* requiere hidrógeno para crecer. (5)
- b) Sobres generadores de gases especiales para *Campylobacter*: son sobres que aportan una atmósfera aproximada de 5-10% de oxígeno y 5-12% de dióxido de carbono. Estos se colocan dentro de la jarra anaeróbica produciendo las condiciones microaeróbicas apropiadas. (5)
- c) Sobres generadores de hidrógeno y oxígeno para anaerobiosis: se pueden usar sólo si tienen como reaccionante el hidruro de boro y sodio, y si se retira de la jarra el catalizador de paladio. Su uso no es recomendable por el peligro de explosión que representa el hidrógeno remanente en la jarra. (5)
- d) Jarra con vela: la combustión de la vela logra una atmósfera aproximada de 17-19% de oxígeno y 2-4% de dióxido de carbono. Para el crecimiento de *Campylobacter* usando éste sistema mejora si se incluye en el medio de cultivo el suplemento FBP que aumenta aproximadamente 10 veces la aerotolerancia del microorganismo. Se debe tomar en cuenta que al usar jarra con vela se pierde del 5-10% de cultivos positivos. (5)

- Sistema *Campylobacter* (generador de condiciones microaerófilas)

Generan condiciones microaerófilas en jarras de metal o plástico. Componente activo: ácido ascórbico. Hay sobres para jarras de 2.5 y 3.5 litros. (1)

Al colocar una bolsa del Sistema *Campylobacter* en una jarra cerrada el oxígeno atmosférico dentro de la jarra es rápidamente absorbido con la generación simultánea de dióxido de carbono, produciéndose las condiciones microaeróbicas apropiadas. No necesita un catalizador ni agua para activar la reacción. (1)

La reacción de oxígeno con el ácido ascórbico es exotérmica por lo que la temperatura de la bolsa puede llegar a 65°C.

Indicaciones:

- Colocar las placas de petri con el medio inoculado dentro de la jarra.
- Abrir el sobre del Sistema *Campylobacter* y retirar la bolsa de papel.
- Inmediatamente colocar la bolsa de papel de CampyGen dentro de la jarra y cerrar la jarra en menos de 1 minuto. Tan pronto como la bolsa de papel es expuesta al aire se inicia la reacción, y por eso la importancia que la jarra sea cerrada en menos de 1 minuto. La exposición de la bolsita por más de 1 minuto resultará en pérdida de reactividad y no se alcanzarán las condiciones microaeróbicas dentro de la jarra.
- Después del tiempo de incubación apropiado, retirar las placas de petri y examinar el crecimiento de colonias. (1)

Si se necesita volver a incubar deberá utilizarse una bolsa nueva. (1)

3.2.9.4 Evaluación de las placas

Idealmente las placas deben examinarse a las 48 horas de incubación, pero si el caso lo requiere puede hacerse a las 18-24 horas.

Las colonias sospechosas pueden observarse planas, no hemolíticas, de aspecto acuoso, color grisáceas y bordes irregulares. (5)

3.2.9.5 Identificación presuntiva

Examen directo y coloración de Gram:

Los frotis de heces teñidos con Gram utilizando fucsina fenicada (carbolfucsina) como colorante de contraste, puede manifestar la presencia de bacilos Gram-negativos, finos y curvos con su forma de S, W o alas de gaviota característica. (2,5,6)

Las improntas de intestino de cerdo con enteritis proliferativa, teñidas con tinciones argénticas como la tinción de Warthin-Starry y una tinción ácido resistente, muestran los bacilos finos y curvos en el interior de las células que revisten la porción afectada del intestino. (2)

Microscopía:

Observación de muestras fecales recientes (2 primeras horas de evacuación) bajo campo oscuro u otra iluminación contrastante, buscando el movimiento rápido y la forma característica. Esto permite un diagnóstico presuntivo rápido. (5,6)

Prueba de Oxidasa:

Tira de prueba con una zona reactiva para la identificación de citocromo oxidasa en microorganismos. (13)

La prueba se realiza usando la masa bacteriana de una colonia pura o bien una suspensión bacteriana densa. Usando un asa bacteriológica se toma la muestra y se coloca sobre la zona reactiva. Después de 20-60 segundos se compara la tira de prueba con la escala de color que proporciona el fabricante. Si las bacterias son oxidasa-positiva el área donde se colocó la muestra mostrará un color azul o púrpura; si es oxidasa-negativo mostrará un color crema, beige o café muy claro. (13)

Prueba de Catalasa:

Se coloca una asada del cultivo sobre un portaobjetos limpio y luego se agrega una gota de peróxido de hidrógeno al 3%. Una reacción positiva se evidencia por la formación de burbujas por la liberación de oxígeno a partir de la reducción del peróxido de hidrógeno. (3,5)

3.2.9.6 Identificación finalCrecimiento a 42-43°C y a 25°C:

Suspender al microorganismo en solución fisiológica estéril y sembrar 0.5ml de la suspensión en dos tubos con caldo Brucella, placas de agar sangre o medios para *Campylobacter*, incubar un tubo o placa a 42-43°C y el otro a 25°C. Observar a las 48 horas si hubo o no crecimiento. (5)

Sensibilidad al ácido nalidíxico y cefalotina

La suspensión anterior se siembra con hisopo sobre la superficie de una placa de agar sangre o medio para *Campylobacter*, luego se coloca un disco de ácido nalidíxico de 30 microgramos y un disco de cefalotina de 30 microgramos. Incubar por 48 horas y observar si hay halo de inhibición o no, y así determinar si la cepa es sensible a los antimicrobianos estudiados. (5)

Hidrólisis del hipurato

Esta prueba se basa en la acción de la enzima hipuricasa sobre el hipurato de sodio lo que produce glicina y ácido benzoico. La reacción del reactivo (ninhidrina) produce una coloración azul-violeta en contacto con la glicina.

Suspender una asada de la cepa en 400 microlitros de una solución de hipurato de sodio al 1%. Luego incubar a 37°C durante 2 horas, agregar 200 microlitros de solución de ninhidrina al 3.5% en acetona-butanol 1:1 por la pared del tubo y dejar reposar por 10 minutos a 37°C. La aparición de una coloración azul-violeta indica una reacción positiva, revelando la presencia de glicina, producto final de la hidrólisis del hipurato. (5)

Producción de ácido sulfhídrico

La reacción se basa en la liberación de ácido sulfhídrico por la acción de la enzima cisteína desulfhidrasa sobre los aminoácidos que contienen azufre.

Se determina depositando una asada en el centro de la columna del tubo del medio para H₂S (medio de Lior). Los tubos se coloca en Baño María a 37°C por 2 horas. La aparición de una coloración negra alrededor del inóculo indica una reacción positiva. (5)

Crecimiento en glicina al 1%

Sembra 0.1ml de suspensión en un tubo de agar Brucella semisólido con 1% de glicina y rojo neutro como indicador. Incubar durante 3-5 días a 37°C en microaerofilia. Observar si se forma una delgada línea de desarrollo por debajo de la superficie. (5)

Crecimiento en NaCl al 3.5%

Sembrar 0.1ml de suspensión en un tubo con agar Brucella semisólido con 3.5% de cloruro de sodio y rojo neutro como indicador. Incubar 3-5 días a 37°C en microerofilia. Observar si se forma una delga línea de desarrollo por debajo de la superficie. (5)

Hidrólisis de indoxil acetato

Se basa en la hidrólisis del indoxil acetato por medio de esterases bacterianas, las que actúan sobre el substrato produciendo la liberación de indol.

Se preparan discos de indoxil acetato por adición de 50 microlitros de una solución al 10% de acetona a discos Standard y dejando secar al aire. Guardar a 4°C en un envase con desecante (silicagel) y al abrigo de la luz. Se adiciona una o varias colonias del microorganismo sobre un disco y se agrega una gota de agua; o bien suspender una o varias colonias en 0.3ml de agua destilada estéril y agregar el disco. La lectura en ambos casos se hace observando si aparece un color azul entre 10 y 15 minutos después, indicando ésto la hidrólisis. (5)

Hidrólisis de 2,3,5 cloruro trifeniltetrazolium

Esta prueba se utiliza como complementaria cuando hay dudas con la prueba de hidrólisis del hipurato para diferenciar entre *C. jejuni* y *C. coli*.

Cortar tiras de papel filtro de 7 x 1 cm. impregnadas con una solución de sal de tetrazolium en agua destilada al 4%. Secar las tiras a 60°C y guardar a 5°C en un frasco oscuro. Se prepara la cepa y el medio como se hace para la sensibilidad al ácido nalidíxico sustituyendo el disco por la tira impregnada con la sal de tetrazolium. Después de haberse incubado por 24-48 horas a 37°C en microaerofilia se observa si ha habido o no inhibición del crecimiento. Si se produce crecimiento bacteriano éste se observa metalizado amarillento por reducción de la sal de formazán. (5)

Propiedades para identificación de especies de *Campylobacter*:

	<i>C.jejuni</i>	<i>C.coli</i>	<i>C.hyointestinalis</i>	<i>C.mucosalis</i>	<i>C.lari</i>	<i>C. fetus</i>
Catalasa	+	+	+	-	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+
H ₂ S	+/-	-	+		+	-
Requerimiento H ₂	-	-	V	+	-	-
Crecimiento en:						
-Glicina al 1%	+	+	+	-	?	
-NaCl al 3.5%	-	-	-	-	-	
Hidrólisis de:						
-hipurato	+	-	-	-	-	-
-indoxilacetato	+	+	-	-	-	-
Sensibilidad a:						
-Ac. Nalidixico	S	S	R		R	R
-Cefalotina	R	R	S		R	S
Crecimiento a:						
25°C	-	-	+	-	-	+
37°C	+	+	+	+	+	+
42-43°C	+	+	V	+	+	-

V=variable, R=resistente, S=sensible (2,3,5,14)

IV MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Recursos humanos

- Estudiante investigador.
- Médicos Veterinarios propietarios de clínicas privadas de la ciudad de Guatemala y su personal.
- Médico Veterinario responsable de la consulta externa del Hospital Veterinario de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala (FMVZ, USAC)
- Médico Veterinario encargado del Departamento de Microbiología de la FMVZ, USAC)
- 3 asesores de tesis.

4.1.2 De laboratorio

- Campana bacteriológica de flujo laminar
- Mechero
- 46 Placas de petri con agar sangre
- 46 Filtros MILLIPORE (MF Membrane filters) de 0.45micras HA
- 10 CampyGen sobres (sistema Campylobacter)
- 9 Tiras de Bactident Oxidase
- Pinzas estériles
- 46 Pipetas de 1ml estériles
- Recipiente con alcohol etílico
- Jarra de Brewer sin el catalizador
- Agitador Vortex
- Asa bacteriológica
- Gradilla
- Portaobjetos
- Bandeja para hacer tinción de Gram

- Cristal Violeta
- Lugol
- Alcohol acetona
- Fucsina
- Agua
- Agua destilada
- Aceite mineral
- Papel absorbente
- Microscopio
- Incubadora a 42°C
- Refrigeradora
- Reloj
- Masking tape
- Marcador permanente
- Bata blanca
- Cámara fotográfica

4.1.3 De campo

- Hisopos estériles
- Tubos de ensayo con medio de transporte
- Hielera con hielo
- Refrigeradora
- Vehículo
- Masking tape
- Marcador
- Hojas de registro de datos
- Hoja informativa para las clínicas
- Lapicero
- Teléfono

4.1.4 De tipo biológico

- Perros de cualquier edad, raza y sexo, con sintomatología clínica de diarrea.
- 46 muestras fecales de perro

4.1.5 Centros de referencia

- Laboratorio de Microbiología de la FMVZ, USAC
- Hospital de la FMVZ, USAC
- Biblioteca de la FMVZ, USAC
- Biblioteca Central de la Universidad del Valle de Guatemala
- Internet

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Diseño del estudio:

Se realizó un estudio de tipo descriptivo de corte transversal, que consistió en tomar muestras directas de heces de perros de cualquier edad, raza y sexo que presentaron sintomatología clínica de diarrea. El muestreo se realizó en clínicas veterinarias ubicadas en diferentes puntos de la ciudad de Guatemala.

Al Médico Veterinario encargado de cada clínica se le entregaron varios tubos de ensayo con medio de transporte (estando éstos en refrigeración en todo momento), hisopos estériles y una hoja en donde se indicaron los pasos a seguir para tomar la muestra, datos que se necesitaban del paciente y números telefónicos a donde podían llamar e informar que tenían un paciente o muestras almacenadas (ver anexo 1).

Dichas muestras fueron sembradas utilizando el método de Filtración en agar sangre usando la membrana de Nitrocelulosa de 0.45micras HA, luego incubadas en un medio microaerófilo y finalmente analizadas con tiras de Bactident Oxidase

para identificar presencia de citocromo oxidasa y microscópicamente utilizando tinción de Gram para identificar los bacilos por su forma característica.

4.2.2 Tamaño de la muestra:

Por ser uno de los objetivos encontrar la bacteria no importando su prevalencia, el muestreo se realizó en un período de 3 meses no tomando en cuenta un número específico de muestras.

4.2.3 Toma de la muestra:

Las muestras fueron tomadas por el Médico Veterinario encargado de la clínica, personal técnico de la clínica o el estudiante investigador.

Utilizando un hisopo estéril se tomó la muestra de heces directamente del recto del paciente; luego el hisopo se introdujo de forma adecuada dentro del tubo de ensayo con medio de transporte, el cual estuvo en refrigeración antes y después de haberse tomado la muestra. La cantidad de la muestra tomada fue siempre significativa (de regular a abundante). En algunos casos se utilizó más de un hisopo por paciente y se introdujo en un solo tubo.

Las muestras fueron tomadas antes de haberse iniciado algún tratamiento antibiótico en el paciente.

Cada muestra fue identificada y se registraron datos del paciente como nombre, edad, raza, sexo, signos, zona donde reside y clínica donde se atendió (ver anexo 2).

Las muestras fueron transportadas en una hielera con hielo y llevadas al Laboratorio de Microbiología de la FMVZ, USAC, para su siembra y análisis. El proceso de siembra se inició en un lapso de tiempo no mayor de 24 horas después de tomada la muestra (tiempo máximo que indicó el laboratorio para que la muestra no sufriera ninguna alteración).

4.2.4 Procedimiento de laboratorio:

Las muestras se trabajaron en el Laboratorio de Microbiología de la FMVZ, USAC, Campus central.

Las muestras fueron trabajadas bajo una campana bacteriológica de flujo laminar para mantener el medio libre de contaminantes.

El método que se utilizó fue el de Filtración en agar sangre utilizando la membrana de Nitrocelulosa de 0.45micras HA. El procedimiento que se realizó con cada una de las muestras fue el siguiente:

- Con una pinza estéril se colocó una membrana de Nitrocelulosa sobre el agar sangre dentro de una placa de petri.
- Se homogenizó la muestra utilizando el agitador Vortex y con una pipeta estéril de 1ml se extrajo 0.2ml de la mezcla y se colocó sobre la membrana. Se esperó aprox. 10 minutos hasta que la mezcla se filtrara totalmente.
- Con una pinza estéril se retiró y desechó la membrana.
- Se tapó e identificó la placa de petri y se colocó junto con un sobre de CampyGen dentro de una jarra de Brewer sin catalizador. Dentro de cada jarra se colocaron aproximadamente de 3 a 5 muestras al mismo tiempo.
- Se incubaron a 42°C por 48 horas.
- Al final se observó si hubo crecimiento de colonias características de *Campylobacter sp.*

En los medios de cultivo donde sí hubo crecimiento de colonias características se realizaron dos procedimientos:

1. Se realizó Tinción de Gram utilizando fucsina fenicada como colorante de contraste, para identificar los bacilos finos en forma de gaviota.
2. Con el asa bacteriológica se aplicó una pequeña muestra de la colonia sobre una tira de Bactident Oxidase para identificar la presencia de citocromo oxidasa, ya que las bacterias de *Campylobacter sp.* son oxidasa positivo.

4.3 ANALISIS ESTADÍSTICO

Para determinar la presencia de *Campylobacter sp.* en perros con sintomatología clínica de diarrea que asistan a clínicas veterinarias de la ciudad de Guatemala, se utilizaron únicamente los resultados obtenidos del análisis de las muestras.

Para establecer los determinantes epidemiológicos del huésped en la ocurrencia de la enfermedad (raza, edad y sexo) se utilizó estadística descriptiva, cuadros y gráficas; y para evaluar la relación que existe entre la presencia de la bacteria y dichos determinantes epidemiológicos, se realizó la Prueba de Independencia de Chi² con un nivel de significancia del 5%.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras fueron analizadas utilizando el método de Filtración en agar sangre con membrana de Nitrocelulosa de 0.45micras HA, e incubadas por 48 horas en un medio microaerófilo a 42°C. Se obtuvo un 19.6% de muestras positivas a *Campylobacter sp.* Se pudo observar el crecimiento de colonias características: en forma de pequeñas gotas, planas, no hemolíticas, color gris y de aspecto cremoso. (Ver cuadro No.1 y gráfica No.1)

Con el método de filtración utilizado se logró obtener un cultivo puro de *Campylobacter sp.* sin necesidad de la adición de antibióticos inhibitorios de flora acompañante, ya que el diámetro de los poros de la membrana filtrante permite únicamente el paso de bacterias muy pequeñas como es el caso de *Campylobacter sp.*, separándolo del resto de bacterias de la flora microbiana normal presente en las heces, que por su diámetro no logran pasar dicho filtro. Actualmente es el método más recomendado para el aislamiento de *Campylobacter sp.* (7).

Como otro método de identificación, se les realizó a los 9 cultivos positivos Coloración de Gram con fucsina fenicada como colorante de contraste. En todos se pudo observar abundantes bacilos finos curvos, algunos en forma de S y otros en forma de alas de gaviota característico del *Campylobacter sp.* (ver cuadro No.2)

Por último se realizó la prueba de Oxidasa ya que el *Campylobacter sp.* es oxidasa positivo. Las 9 muestras positivas a las pruebas anteriores colorearon de violeta el área reactiva de las tiras de prueba indicando ser todas oxidasa positivas. (Ver cuadro No. 3)

Las tres pruebas realizadas confirman el diagnóstico de la presencia de *Campylobacter sp.* en perros con sintomatología clínica de diarrea en la ciudad de Guatemala.

La ausencia de diarrea no indica que el paciente esté libre de *Campylobacter sp.* Según Morgan, RV. (1999), pueden haber animales infectados que eliminan el germen en las heces y no presentar sintomatología clínica. Por ello será necesario realizar investigación de la presencia de la bacteria en perros sanos.

A pesar que 7 de los 9 pacientes que resultaron positivos a *Campylobacter sp.* en este estudio, tenían una edad menor a los 6 meses y eran principalmente machos, el análisis estadístico de la Prueba de Independencia de Chi² que se utilizó, determinó que no existe asociación alguna entre la presencia del *Campylobacter sp.* con la edad y sexo del paciente. (Ver cuadro No. 4 y 5, gráfica No. 2 y 3).

Según Ettinger, SJ. y Feldman, EC. (2002), los perros y gatos jóvenes (menores de 6 meses de edad) parecen ser más susceptibles a la infección y a presentar enfermedad clínica, teniendo esto congruencia con la edad observada en los pacientes positivo a *Campylobacter sp.* del presente estudio. (6)

Respecto a la raza de los pacientes positivos y por la naturaleza de los datos, utilizando la misma prueba estadística no se encontró asociación entre la presencia del *Campylobacter sp.* y la raza del paciente. (Ver cuadro No. 6)

El haber aislado *Campylobacter sp.* en perros de la ciudad de Guatemala por medio del presente estudio, utilizando un método de diagnóstico accesible y efectivo, es un hallazgo de gran importancia en la Medicina Veterinaria de nuestro país ya que podrá incluirse dentro del diagnóstico como causante de diarrea en mascotas. En Medicina Humana, utilizando dicho método de diagnóstico, será más fácil aislar la bacteria a nivel de laboratorio e incluirse en las pruebas bacteriológicas de rutina, y por ser el perro reservorio de la bacteria, ahora se podrán tomar en cuenta a las mascotas como una posible fuente de infección en humanos de nuestro medio.

VI. CONCLUSIONES

1. El 19.6% de las muestras de heces de perros analizadas resultaron positivas a *Campylobacter sp.*
2. La edad, raza y sexo del paciente no están asociados con la presencia de *Campylobacter sp.*
3. El método de Filtración en agar sangre utilizando la membrana de Nitrocelulosa de 0.45micras HA. logra un cultivo puro de *Campylobacter sp.*, sin necesidad de la adición de antibióticos inhibitorios de flora acompañante.

VII. RECOMENDACIONES

1. Incluir el aislamiento de *Campylobacter sp.* en las pruebas bacteriológicas de rutina de laboratorios clínicos privados y públicos de Guatemala que analizan muestras humanas.
2. Realizar una vigilancia epidemiológica puntual que indique la incidencia y prevalencia de *Campylobacter sp.* en humanos y animales del país.
3. A los Médicos Veterinarios que atienden clínica de especies menores, se recomienda consideren al *Campylobacter sp.* como causante de diarrea en mascotas.
4. Implementar el método de Filtración en agar sangre utilizando membrana de Nitrocelulosa para el aislamiento de *Campylobacter sp.*, ya que evita la utilización de medios de cultivo y suplementos especiales.
5. Realizar una investigación para determinar la presencia de *Campylobacter sp.* en perros sanos en la ciudad de Guatemala.
6. Considerar las medidas de bioseguridad adecuadas con el manejo de mascotas por parte de sus dueños, Médico Veterinario y personal técnico.

VIII. RESUMEN

Con la finalidad de determinar la presencia de *Campylobacter sp.* en perros con sintomatología clínica de diarrea en la ciudad de Guatemala, para el presente estudio se muestrearon 46 perros de diferente edad, raza y sexo, con sintomatología clínica de diarrea, que asistieron a diferentes clínicas veterinarias de la ciudad de Guatemala.

Para el aislamiento del *Campylobacter sp.* se utilizó el método de Filtración en agar sangre usando la membrana de Nitrocelulosa de 0.45micras HA como filtro, que logra separar el *Campylobacter sp.* del resto de bacterias de la flora microbiana presente en las heces, sin necesidad de la adición de antibióticos inhibitorios de flora acompañante. Las muestras fueron incubadas en un medio microaerófilo y analizadas con tiras reactivas para identificar presencia de citocromo oxidasa ya que *Campylobacter sp.* es oxidasa positivo, y microscópicamente se utilizó tinción de Gram para identificar los bacilos gram (-), finos, curvos, en forma de alas de gaviota característico de la bacteria.

Las tres pruebas realizadas confirman el diagnóstico de la presencia de *Campylobacter sp.* en perros con sintomatología clínica de diarrea en la ciudad de Guatemala, al haberse obtenido un 19.6% de muestras positivas.

Por medio de un análisis estadístico se determinó que la edad, raza y sexo del paciente no están asociados con la presencia de *Campylobacter sp.*, a pesar que la mayoría de pacientes que resultaron positivos a *Campylobacter sp.* eran machos y tenían menos de 6 meses de edad.

El haber aislado *Campylobacter sp.* en perros de la ciudad de Guatemala por medio del presente estudio, utilizando un método de aislamiento accesible y eficaz que evita la utilización de medios de cultivo y suplementos especiales, es de gran importancia en la Medicina Veterinaria de nuestro país ya que se podrá incluir dentro del diagnóstico como causante de diarrea en mascotas. En Medicina Humana es importante ya que será más fácil aislarse la bacteria e incluirse en las pruebas bacteriológicas de rutina, y por ser el perro reservorio de la bacteria, se podrán tomar en cuenta a las mascotas como una posible fuente de infección en humanos de nuestro medio.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Atmosphere Generation System. 2006 (en línea). Consultado 17 feb. 2006. Disponible en http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CN0025&c=UK&lang=EN
2. Biberstein, EL.; Chung, Y. 1990. Tratado de microbiología veterinaria. Trad. Manuel Ramis Vergés. Zaragoza, ES, Acribia, S.A. p. 137-140
3. Camas Castillo, MA. 2006. Aislamiento e identificación de *Campylobacter* spp. en muestras de heces referidas al Laboratorio Nacional de Salud, provenientes del área de salud del Departamento de Guatemala. Tesis Lic. Química Bióloga. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. p. 1-4, 7-9, 18-28, 51.
4. Campylobacteriosis. 2005 (en línea). Consultado 07 feb. 2006. Disponible en http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/campylobacter_g_sp.htm
5. Curso Internacional: Epidemiología de las enfermedades transmitidas por alimentos Nivel III (2004, México). 2004. *Campylobacter*. Universidad Austral de Chile. p. 2-20
6. Ettinger, SJ.; Feldman, EC. 2002. Tratado de medicina interna veterinaria. Enfermedades del perro y el gato. Trad. Rubén Angel Taibo. 5 ed. Buenos Aires, AR, Inter-Médica S.A.I.C.I. p. 432-433,1351,1382.
7. Hoja informativa de Salud Pública – *Campylobacter*. 2003 (en línea). Consultado 07 feb. 2006. Disponible en http://64.233.179.104/search?q=cache:PMEFvhjrGsJ:www.ops.org.uy/pdf/campylobacter.pdf+campylobacteriosis+en+perros&hl=es&gl=sv&ct=clnk&cd=16&lr=lang_es

8. INCAP (Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá). Suplemento sobre la gestión del conocimiento del Incap: Comparación de la resistencia antimicrobiana de *Campylobacter jejuni* aislado en 1986-1989 con *Campylobacter jejuni* aislado entre 2000-2003. (en línea). Consultado 11 ago. 2006. Disponible en <http://64.233.161.104/search?q=cache:0rq8iAvDf9IJ:www.incap.org.gt/coope/diag.pdf+hospital+general+campylobacter+guatemala&hl=es&gl=gt&ct=clnk&cd=1>
9. MERCK. 1994., Manual de medios de cultivo. Darmstadt, DE, s.e. p. 148-152
10. MF-Millipore™ Filtres. 2006 (en línea). Consultado 17 feb. 2006. Disponible en <http://www.millipore.com/publications.nsf/docs/pf1595en00>
11. Morgan, RV.; 1999. Clínica de Pequeños animales. Trad. Diorki servicios integrales de edición. 3 ed. Madrid, ES, Harcourt Brace.
12. Murray, PR. 1990. Medical Microbiology. St. Louis, Missouri, US, The C.V. Mosby Company. p. 132
13. Oxidase de Bactident. 2002 (en línea). Consultado 20 feb. 2006. Disponible en http://service.merck.de/microbiology/tedisdata/prods/4965-1_13300_0001.html
14. Pascual, M.R. 1989. Microbiología Alimentaria: Determinación de bacterias con significado higiénico-sanitario. Madrid, ES, Ministerio de Sanidad y Consumo, Insitituto de Salud Carlos III. p. 379
15. Perales, M. 2002. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública: Infección por *Campylobacter* y *Shigella* como causa de Diarrea Aguda Infecciosa en niños menores de dos años en el Distrito de la Victoria, Lima-Perú (en línea). v.19 n.4. Lima, PE. Oct./dic. 2002. Consultado 09 feb. 2006. Disponible en http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342002000400004&script=sci_arttext&tlng=es

X. ANEXOS

ANEXO 3 - CUADROS

Cuadro No. 1 Resultados obtenidos del análisis de muestras de heces de perros con sintomatología clínica de diarrea que asistieron a clínicas veterinarias de la ciudad de Guatemala, utilizando para su análisis el método de Filtración en agar sangre con membrana de Nitrocelulosa de 0.45micras HA. Guatemala. 2007

No. Muestra	Edad	Raza	Sexo	Campylobacter sp.
1	2 meses	Cocker Spaniel	Macho	Negativo
2	4 meses	Pastor Alemán	Macho	POSITIVO
3	2 meses	Golden Retriever	Macho	Negativo
4	2.5 meses	Lhasa Apso	Hembra	Negativo
5	3.5 meses	Shih-Tzu	Macho	Negativo
6	7 meses	Labrador Retriever	Macho	Negativo
7	3 meses	Cocker Spaniel	Macho	Negativo
8	5 meses	SRD	Hembra	Negativo
9	3.5 meses	Cocher Spaniel	Macho	Negativo
10	2 meses	French Poodle	Macho	Negativo
11	1 año 9 meses	Golden Retriever	Macho	Negativo
12	2 meses	French Poodle	Macho	POSITIVO
13	1.5 meses	Dachshunds	Hembra	Negativo
14	7 años	Basset Hound	Macho	Negativo
15	1 año 1 mes	SRD	Macho	Negativo
16	4 meses	Basset Hound	Hembra	Negativo
17	3 meses	Cocker Spaniel	Hembra	Negativo
18	3 meses	Cocker Spaniel	Hembra	Negativo
19	1 año 2 meses	SRD	Macho	Negativo
20	4 meses	SRD	Macho	Negativo

21	7 años	Pastor Alemán	Macho	Negativo
22	10 años	Chow Chow	Hembra	Negativo
23	5 años	Pastor Alemán	Macho	Negativo
24	3 meses	SRD	Hembra	POSITIVO
25	1 año 6 meses	SRD	Macho	Negativo
26	6 meses	Cocker Spaniel	Macho	Negativo
27	3 meses	French Poodle	Macho	POSITIVO
28	6 años	Silki Terrier	Macho	Negativo
29	1.5 meses	Chihuahua	Macho	Negativo
30	2 años	SRD	Macho	Negativo
31	10 meses	Akita	Macho	POSITIVO
32	1 año 7 meses	Cocker Spaniel	Hembra	Negativo
33	2 meses	Schnauzer	Macho	Negativo
34	2 meses	Schnauzer	Macho	Negativo
35	2 meses	Schnauzer	Hembra	POSITIVO
36	2 meses	Basset Hound	Hembra	Negativo
37	2 meses	Basset Hound	Macho	POSITIVO
38	2 meses	Basset Hound	Macho	POSITIVO
39	2.5 meses	French Poodle	Macho	Negativo
40	3 años	Cocker Spaniel	Macho	Negativo
41	8 meses	Pastor Alemán	Hembra	Negativo
42	4 meses	SRD	Hembra	Negativo
43	2.5 meses	Shar-Pei	Hembra	Negativo
44	6 meses	Labrador Retriever	Hembra	Negativo
45	7 meses	SRD	Hembra	POSITIVO
46	2 meses	Shih-Tzu	Macho	Negativo

Cuadro No. 2 Resultados obtenidos del análisis de las muestras de heces de perros con sintomatología clínica de diarrea que asistieron a clínicas veterinarias de la ciudad de Guatemala, y que resultaron positivas a *Campylobacter sp.* con el método de Filtración en agar sangre con membrana de Nitrocelulosa de 0.45micras HA, utilizando para su análisis Coloración de Gram. Guatemala. 2007

No. Muestra	Diagnóstico de <i>Campylobacter sp.</i>
2	Positiva
12	Positiva
24	Positiva
27	Positiva
31	Positiva
35	Positiva
37	Positiva
38	Positiva
45	Positiva

Cuadro No. 3 Resultados obtenidos del análisis de las muestras de heces de perros con sintomatología clínica de diarrea que asistieron a clínicas veterinarias de la ciudad de Guatemala, y que resultaron positivas a *Campylobacter sp.* con el método de Filtración en agar sangre con membrana de Nitrocelulosa de 0.45micras HA, utilizando para su análisis tiras reactivas para la identificación de citocromo oxidasa. Guatemala. 2007

No. Muestra	Resultado
2	Oxidasa positiva
12	Oxidasa positiva
24	Oxidasa positiva
27	Oxidasa positiva
31	Oxidasa positiva
35	Oxidasa positiva
37	Oxidasa positiva
38	Oxidasa positiva
45	Oxidasa positiva

Cuadro No. 4 Resultados obtenidos del análisis de muestras de heces de perros con sintomatología clínica de diarrea que asistieron a clínicas veterinarias de la ciudad de Guatemala, utilizando para su análisis tres pruebas diagnósticas, según la edad de los pacientes. Guatemala. 2007

EDAD \ PRESENCIA	+	-	TOTAL
Menores de 6 meses	7	21	28
Entre 6 y 12 meses	2	4	6
Mayores de 12 meses	0	12	12
TOTAL	9	37	46

Hipótesis nula (H₀): No existe asociación entre la presencia de *Campylobacter sp.* y la edad del paciente.

Hipótesis alternativa (H₁): Si existe asociación entre la presencia de *Campylobacter sp.* y la edad del paciente.

Nivel de significancia: 5%

Grados de libertad: 2 (5.99)

Chi² total: 4.17

Decisión: Se acepta la Hipótesis nula.

Cuadro No. 5 Resultados obtenidos del análisis de muestras de heces de perros con sintomatología clínica de diarrea que asistieron a clínicas veterinarias de la ciudad de Guatemala, utilizando para su análisis tres pruebas diagnósticas, según el sexo de los pacientes. Guatemala. 2007

PRESENCIA	+	-	TOTAL
SEXO			
Hembras	3	13	16
Machos	6	24	30
TOTAL	9	37	46

Hipótesis nula (Ho): No existe asociación entre la presencia de *Campylobacter sp.* y el sexo del paciente.

Hipótesis alternativa (Hi): Si existe asociación entre la presencia de *Campylobacter sp.* y el sexo del paciente.

Nivel de significancia: 5%

Grados de libertad: 1 (3.84)

Chi² total: 0.0103

Decisión: Se acepta la Hipótesis nula.

Cuadro No. 6 Resultados obtenidos del análisis de muestras de heces de perros con sintomatología clínica de diarrea que asistieron a clínicas veterinarias de la ciudad de Guatemala, utilizando para su análisis tres pruebas diagnósticas, según la raza de los pacientes. Guatemala. 2007

PRESENCIA RAZA	+	-	TOTAL
Cocker Spaniel	0	8	8
Pastor Alemán	1	3	4
Golden Retriever	0	2	2
Lhasa Apso	0	1	1
Shih-Tzu	0	2	2
Labrador Retriever	0	2	2
SRD (sin raza definida)	2	7	9
French Poodle	2	2	4
Dachshunds	0	1	1
Basset Hound	2	3	5
Chow Chow	0	1	1
Silki Terrier	0	1	1
Chihuahua	0	1	1
Akita	1	0	1
Schnauzer	1	2	3
Shar-Pei	0	1	1
TOTAL	9	37	46

Hipótesis nula (Ho): No existe relación entre la presencia de *Campylobacter sp.* y la raza del paciente.

Hipótesis alternativa (Hi): Si existe asociación entre la presencia de *Campylobacter sp.* y la raza del paciente.

Nivel de significancia: 5%

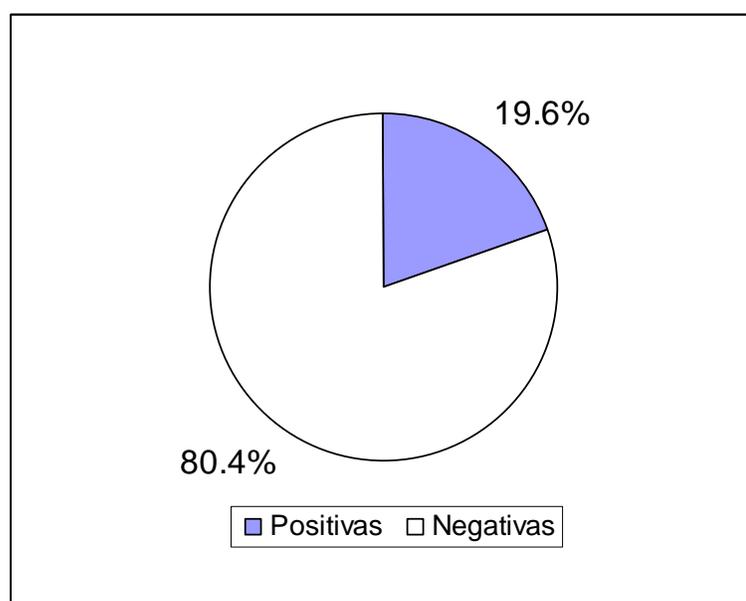
Grados de libertad: 15 (25)

Chi² total: 8.43

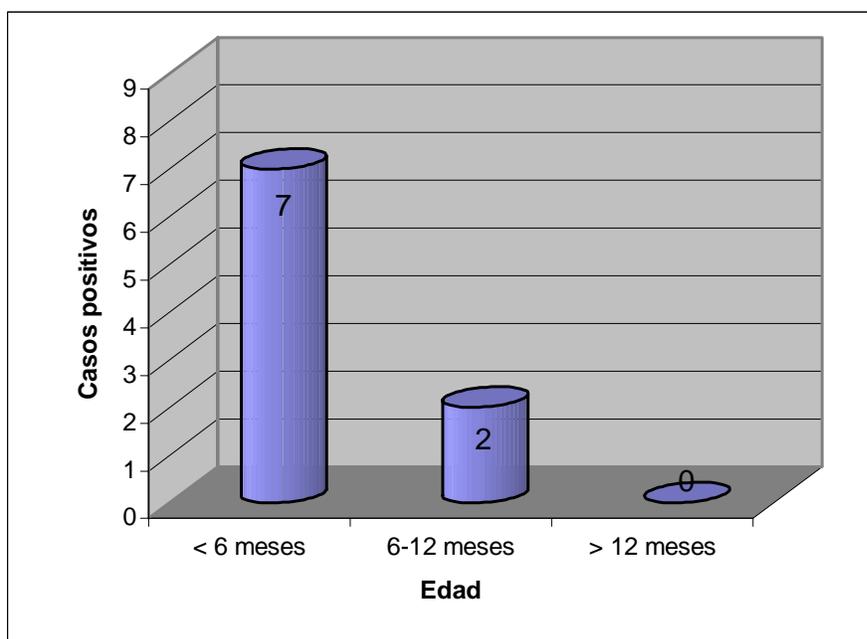
Decisión: Se acepta la Hipótesis nula.

ANEXO 4 - GRÁFICAS

Gráfica No. 1 Resultados de la presencia de *Campylobacter sp.* en muestras de heces de perros con sintomatología clínica de diarrea que asistieron a clínicas veterinarias de la ciudad de Guatemala. 2007.



Gráfica No. 2 Edad de los perros positivos a *Campylobacter sp.*, con sintomatología clínica de diarrea que asistieron a clínicas veterinarias de la ciudad de Guatemala. Guatemala. 2007



Gráfica No. 3 Sexo de los perros positivos a *Campylobacter sp.*, con sintomatología clínica de diarrea que asistieron a clínicas veterinarias de la ciudad de Guatemala. Guatemala. 2007

