UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

AREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

"DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE CAMPYLOBACTER SP. EN PERROS CON SINTOMATOLOGÍA CLÍNICA DE DIARREA EN LAS CLINICAS VETERINARIAS DE LA CIUDAD DE LOJA Y EL HOSPITAL DOCENTE VETERINARIO DE LA UNL"

TESIS DE GRADO PREVIA A LA OBTENCION DEL TITULO DE MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA.

AUTOR:

Alcides Leonardo Manzanillas Vélez.

DIRECTORA:

Dra. Laura Peña Merino.

LOJA – ECUADOR

2012

“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE CAMPYLOBACTER SP. EN PERROS CON SINTOMATOLOGÍA CLÍNICA DE DIARREA EN LAS CLÍNICAS VETERINARIAS DE LA CIUDAD DE LOJA Y EL HOSPITAL DOCENTE VETERINARIO DE LA UNL”

TESIS PRESENTADA AL TRIBUNAL DE GRADO COMO REQUISITO

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA:

Dr. Dubal Jumbo Jimbo …….

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Dr. Luis Aguirre Mendoza: Mg. Sc. …….

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Alfonso Saraguro Martínez: Mg. Sc. ……

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

CERTIFICACIÓN

Dra. Laura Peña Merino

DOCENTE DE LA CARRRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTÉCNIA DE LA UNL Y DIRECTORA DE TESIS.

CERTIFICA:

Que una vez revisado el trabajo de investigación denominado **‘‘DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE CAMPYLOBACTER SP. EN PERROS CON SINTOMATOLOGÍA CLÍNICA DE DIARREA EN LAS CLÍNICAS VETERINARIAS DE LA CIUDAD DE LOJA Y EL HOSPITAL DOCENTE VETERINARIO DE LA UNL.’’** realizado por el Sr. Egresado Alcides Leonardo Manzanillas Vélez, previo a la obtención del título de MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA, ha sido dirigida y prolijamente revisada desde el inicio de su ejecución; por lo tanto se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente

Loja, marzo del 2012

Dra. Laura Peña Merino

DIRECTORA DE TESIS

AUTORÍA

La investigación, resultados, análisis, conclusiones y recomendaciones del presente trabajo de tesis le corresponden exclusivamente a su autor y el patrimonio intelectual a la Universidad Nacional de Loja, autorizo al Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, y por ende a la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia; hacer uso del presente documento en lo conveniente.

Alcides Leonardo Manzanillas Vélez.

DEDICATORIA

Esta Tesis de Grado va dedicada con inmenso amor, en primer lugar: a mi Dios, Creador de todas las cosas; a mis queridos padres, autores de mis días: Alcides Manzanillas y Georgina Vélez quienes con su apoyo, abnegación y sacrificio hicieron posible la culminación de mis estudios universitarios para obtener el título de MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA; dedico también este TRABAJO DE TESIS a mi querida abuelita y a todos mis familiares que me apoyaron siempre.

A mis maestros, amigos y compañeros, con quienes compartí cinco años de mi vida.

Leonardo

AGRADECIMIENTO

Al concluir el presente trabajo de investigación agradezco a Dios por permitirme culminar esta etapa importante en mi vida. A la Universidad Nacional de Loja, al Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables y a la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia; a la Dra. Laura Peña Merino, por su sabia y abnegada dirección, a los distintos docentes por brindarme sus sabios conocimientos.

A mis padres; Alcides Manzanillas Camacho y Georgina Vélez y a todos mis hermanos por la confianza y apoyo brindado en cada momento, además de sus valiosos consejos e innumerables sacrificios realizados para poder llevar a cabo este trabajo de tesis.

El Autor.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDO **Pág.**

PORTADA i

APROBACÍON ii

CERTIFICACIÓN iii

AUTORIA iv

AGRADECIMIENTO v

DEDICATORIA vi

ÍNDICE GENERAL vii

ÍNDICE DE CUADROS xii

ÍNDICE DE FIGURAS xiii

ÍNDICE DE FOTOS xiv

RESUMEN 1

SUMMARY 3

1. INTRODUCCIÓN 5

2. REVISIÓN DE LITERATURA 7

2.1. CAMPYLOBACTERIOSIS 7

2.1.1. Definición 7

2.1.2. Etiología 9

2.1.3. Características 10

2.1.3.1. Características de crecimiento 10

2.1.4. Epidemiología 11

2.1.5. Reservorios 12

2.1.6. Forma de infección..... 13

2.1.7. Patogenia 14

2.1.7.1. Signos clínicos en perros y gatos (con enfermedad clínica)..... 15

2.1.7.2. Signos clínicos en humanos 15

2.1.8. Prevención y control 16

2.1.9. Diagnóstico de laboratorio 17

a) Recolección de la muestra 17

b) Examen Microscopio Directo..... 17

c) Cultivo en Agar TCBS (agar selectivo para Vibrio)..... 18

d) Método de filtración para la detección de campylobacter en heces..... 19

e) Atmósfera de Incubación..... 21

f) Temperatura de incubación..... 22

g) Sistema Campylobacter (generador de condiciones microaerófilas)..... 23

h) Evaluación de las placas..... 25

i) Identificación presuntiva 25

- .Examen directo y coloración de Gram 25
- Microscopía..... 26
- Prueba BD Triple SugarIron Agar o T.S.I..... 26

j) Identificación final..... 27

- Medio de Cultivo SIM 27
- Prueba de Catalasa 28

3. MATERIALES Y MÉTODOS 29

3.1. Materiales 29

3.1.1. De Campo 29

3.1.2. De Laboratorio 29

3.1.3. De Oficina 31

3.2. Métodos 31

3.2.1. Delimitación del Área de Estudio 31

3.2.2. Tamaño de la muestra 32

3.2.3. Toma de Muestras 33

a) Manejo y Conservación de las Muestras 33

b) Método de Laboratorio 34

c) Interpretación de los resultados 35

3.2.4. Variables 38

3.2.5. Toma y Registro de Datos 38

3.2.5.1. Aislamiento de la Bacteria 38

3.2.5.2. Susceptibilidad de acuerdo al Sexo, Raza y edad 39

3.2.5.3. Signos clínicos de la enfermedad 39

3.2.5.4. Coloración en el Agar TCBS (agar tiosulfato citrato bilis sacarosa) 39

3.2.6. Análisis Estadístico 40

4. RESULTADOS 41

4.1. AISLAMIENTO DE LA BACTERIA 41

4.2. SUSCEPTIBILIDAD DE ACUERDO AL SEXO, RAZA Y EDAD 42

4.2.1. Susceptibilidad de acuerdo al Sexo 42

4.2.2. Susceptibilidad de acuerdo a la raza 44

4.2.3. Susceptibilidad de acuerdo a la edad 45

4.3. SIGNOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD 46

4.4. COLORACIÓN EN EL AGAR TCBS..... 48

5. DISCUSIÓN..... 50

5.1. AISLAMIENTO DE LA BACTERIA 50

5.2. SUSCEPTIBILIDAD DE ACUERDO A LA EDAD, RAZA Y SEXO 51

5.2.1. Susceptibilidad de acuerdo a la Edad 51

5.2.2. Susceptibilidad de acuerdo a la Raza 52

5.2.3. Susceptibilidad de acuerdo al Sexo 52

5.3. SIGNOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD 53

5.4. COLORACIÓN EN EL AGAR TCBS..... 54

6. CONCLUCIONES..... 56

7. RECOMENDACIONES 57

8. BIBLIOGRAFÍA..... 58

9. ANEXOS 61

ÍNDICE DE CUADRO

CUADROS **Pág.**

Cuadro 1: Clasificación del Campylobacter.....7

Cuadro 2: Especies 8

Cuadro 3: Fórmula del Agar TCBS.....18

Cuadro 4: Temperaturas de desarrollo de las diferentes especies de campylobacter.....23

Cuadro 5: Fórmula del Agar TSI.....26

Cuadro 6: Fórmula del Medio SIM.....27

Cuadro 7: Presencia de Campylobacter Sp. En muestras de heces de perros con sintomatología clínica de diarrea.....41

Cuadro 8: Susceptibilidad de la bacteria campylobactersp, de acuerdo al sexo de los pacientes..... 43

Cuadro 9: Susceptibilidad de la bacteria campylobacter sp, de acuerdo a la raza de los pacientes..... 44

Cuadro 10: Susceptibilidad de la bacteria Campylobacter sp, de acuerdo a la edad de los pacientes 45

Cuadro 11: Diagnóstico de Campylobacter sp, en pacientes con síntomas característicos de le enfermedad..... 47

Cuadro 12: Forma de coloración en el Agar TCBS (agar tiosulfato citrato bilis sacarosa)..... 48

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA **Pág.**

Figura 1: Imagen de Campylobacter en microscopio de campo oscuro.....8

Figura 2: Técnica de Filtración con Membrana de Celulosa para la Detección de Campylobacter sp, en Heces..... 21

Figura 3: Porcentaje total de muestras positivas y negativas al Campylobacter sp..... 42

Figura 4: Susceptibilidad de la bacteria campylobacter sp, con respecto al sexo de los pacientes..... 43

Figura 5: Susceptibilidad de la bacteria campylobacter con respecto a la raza de los pacientes..... 45

Figura 6: Susceptibilidad de la bacteria Campylobacter sp, con respecto a la edad de los pacientes..... 46

Figura 7: Diagnóstico de Campylobacter en pacientes con diferentes signos de la enfermedad..... 47

Figura 8: Forma de coloración en el Agar TCBS (agar tiosulfato citrato bilis sacarosa**)**..... 49

ÍNDICE DE FOTOS

FOTOS **Pág.**

Fotos 1-2 : Material utilizado en laboratorio para el diagnóstico de Campylobacter. 63

Fotos 3-4: Agar TCBC listo para incubar, pruebas TSI y SIM 64

Foto 5: Cultivo de Campylobacter sp, Positivo y Negativo 64

Fotos 6-7: Placas teñidas con Coloración de Gram y Observación de las Placas en el Microscopio.....65

Foto 8: Imágenes de la bacteria de Campylobacter observadas en el microscopio.....65

Foto 9: Campylobacter sp, en forma de espiral y ala de gaviota.....66

Fotos 10-11: Prueba de Catalasa positiva y negativa 66

Fotos 12-13: Pruebas TSI y SIM Positivas y Negativas 67

RESUMEN

Con la finalidad de determinar la presencia de Campylobacter sp, en perros con sintomatología clínica de diarrea en la ciudad de Loja, para el presente estudio se muestrearon 43 perros de diferente edad, raza y sexo, con sintomatología clínica de diarrea, que asistieron a diferentes clínicas veterinarias de la ciudad de Loja.

Para el aislamiento del Campylobacter sp, se utilizó el método de Filtración en Agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa) usando la membrana de Nitrocelulosa de 0.45 micras 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 micro aerófilo y analizadas con una prueba reactiva para identificar presencia de la enzima catalasa ya que Campylobacter sp, es catalasa positivo, también se utilizó dos pruebas como son Agar TSI (Agar Triple-Azúcar-Hierro) y Medio SIM (Sulfuro-Indol-Movilidad), como complemento para identificar 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 Loja, al haberse obtenido un 65.12%, de muestras positivas.

Por medio del análisis estadístico se determinó que la edad, raza y sexo del paciente están asociados con la presencia de Campylobacter sp.

El haber aislado Campylobacter sp, en perros de la ciudad de Loja 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 nuestra Ciudad ya que se podrá incluir dentro del diagnóstico como causante de diarrea en mascotas.

En Medicina Humana es muy 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.

SUMMARY

In order to determine the presence of Campylobacter sp in dogs with symptoms of diarrhea in the city of Loja, for this study were sampled 43 dogs of different age, race and sex, with symptoms of diarrhea, attending different veterinary clinics in the city of Loja.

For the isolation of Campylobacter, we used the method of filtration TCBS Agar (Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose) using nitrocellulose membrane as 0.45 micron filter, which manages to separate the Campylobacter sp, the other flora bacteria microbial present in feces, without the addition of antibiotics inhibitory accompanying flora. The samples were incubated in a medium micro aerófilo and analyzed with a test strip to identify the presence of catalase as Campylobacter sp, is catalase positive, was also used two tests such as TSI Agar (Agar Triple-Sugar-Iron) and Middle SIM (sulfide-indole-Mobility), in addition to identify the bacteria.

The three tests confirm the diagnosis of Campylobacter sp in dogs with symptoms of diarrhea in the city of Loja, having obtained a 65.12% positive samples.

Through statistical analysis it was determined that age, race and sex of the patient are associated with the presence of Campylobacter sp, having isolated Campylobacter in dogs in the city of Loja by the present study, using a method accessible and effective insulation that prevents the use of culture media and

special supplements, is of great importance in our City Veterinary Medicine as it may, within the diagnosis as a cause of diarrhea in pets.

In human medicine is very important as it will be easier to isolate the bacteria and included in the routine bacteriological tests, and as the dog reservoir of bacteria may be taken into account to pets as a possible source of infection in humans our environment.

1. INTRODUCCIÓN

Cada vez es mayor el índice de pacientes que presentan enfermedades relacionadas con Campylobacter, algunos de los síntomas clínicos se confunden con enfermedades relacionadas con el aparato digestivo. Por lo general, esta enfermedad causa gastroenteritis en aves, animales de compañía, animales de granja, y podemos recalcar que es una enfermedad zoonósica que afecta a la salud humana; con mayor frecuencia a niños menores a cinco años.

En países en vías de desarrollo como el nuestro, las infecciones por Campylobacter tienen un carácter híper endémico con una incidencia máxima entre los niños más pequeños (< 2 años); pero se ha visto que la tasa de infección disminuye con la edad, asociándose a una adquisición de inmunidad.

“La Determinación de la Presencia de Campylobacter sp. en Perros con Sintomatología Clínica de Diarrea en las Clínicas Veterinarias de la Ciudad de Loja y el Hospital Docente Veterinario de UNL”; tiene como finalidad generar información sobre el agente patógeno causante del síndrome diarreico agudo (Campylobacter); con el ánimo de mejorar el diagnóstico al sospecharse una infección con este microorganismo en pacientes con diarrea.

El presente trabajo de investigación contribuirá al conocimiento de esta bacteria y a tomar medidas preventivas de posibles procesos infecciosos en las mascotas como en el humano.

Los objetivos que se plantearon en la presente investigación fueron:

- Determinación de Campylobacteriosis en perros atendidos en clínicas veterinarias de la ciudad de Loja y el Hospital Docente Veterinario de la UNL.

- Determinar la presencia de Campylobacter sp. en perros con sintomatología clínica de diarrea que asistan a clínicas veterinarias de la ciudad de Loja y el Hospital Docente Veterinario de la UNL.

- Identificar la susceptibilidad del campylobacter de acuerdo a la edad, raza y sexo.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. CAMPYLOBACTERIOSIS

2.1.1. Definición

La campylobacteriosis se refiere al grupo de infecciones piogénicas producidas por las bacterias del género Campylobacter. Aunque en general se trata de enfermedades diarreicas agudas, estos microorganismos pueden causar infección en cualquier región, especialmente en los huéspedes inmuno deprimidos, con secuelas no supurativas tardías.

La denominación Campylobacter procede de la palabra griega de «bacilo curvo» y se refiere a la morfología del microorganismo, parecido a un vibrión (Harrison, 2000).

Cuadro 1. Clasificación del campylobacter

Reino:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	EpsilonProteobacteria
Orden:	Campylobacterales
Familia:	Campylobacteraceae
Género:	*Campylobacter*

Cuadro 2. Especies

• ***C.coli***	• *C.insulaenigrae*
• *C.concisus*	• *C.jejuni*
• *C.curvus*	• *C.lanienae*
• *C.faecalis*	• *C.lari*
• ***C.fetus***	• *C.mucosalis*
• *C.gracilis*	• *C.rectus*
• *C.helveticus*	• *C.showae*
• *C.hominis*	• *C.sputorum*
• *C.hyointestinalis*	• *C.upsaliensis*

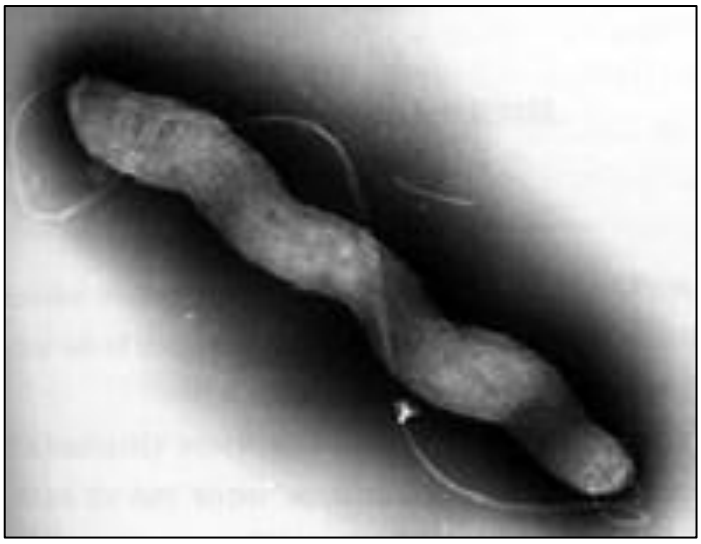


Figura 1. Imagen de Campylobacter en microscopio de campo oscuro.

2.1.2. Etiología.

La campylobacteriosis es una enfermedad infecciosa ocasionada principalmente por el Campylobacter especie jejuni. Es un bacilo Gram negativo curvo, espiralado o en forma de “S” que presenta un flagelo único en uno o ambos extremos. En cultivos de varios días adquiere formas esféricas u ovoides que han perdido su capacidad para multiplicarse en medios de cultivos inertes y que son consideradas como formas viables no cultivables.

Al comienzo estos microorganismos fueron clasificados dentro del género Vibrio. Sin embargo, más tarde, debido a que presentan diferencias fundamentales con relación a la constitución del DNA y por su incapacidad de fermentar los hidratos de carbono, fueron agrupados en un nuevo género bacteriano denominado Campylobacter.

Esta especie se encuentra como comensal en el tracto gastrointestinal de una amplia variedad de animales como bovinos, ovinos, cerdos, cabras, perros, gatos, roedores silvestres y domésticos y en todas las variedades de aves de corral y de vida libre. La dosis infectante en general es baja y varía entre 500 y 1,000,000 de microorganismos para causar la enfermedad, lo cual evidencia su capacidad de producir brotes (Morales, 2004).

2.1.3. Características.

Bacterias Gram negativas, pequeñas (0.3 - 0.6 micras de diámetro, 0.5 - 5 micras de ancho), no esporuladas, con una forma distintiva curva o en espiral, con aspecto de vibrio, presentan un flagelo no envainado único en uno o dos de sus extremos y se mueven característicamente en forma rápida y a modo de saca corchos. Casi todas las especies son sensibles al oxígeno y sólo pueden desarrollar en condiciones de reducción de oxígeno, habitualmente en atmósfera micro aerófila (Méndez MV y cols, 1994).

2.1.3.1 Características de crecimiento.

Las especies de Campylobacter son micro aerófilas, 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 oxidasas 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.

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.

Todas las especies son capaces de desarrollarse a una temperatura de 37ºC, pero la temperatura óptima de crecimiento es a 42-43ºC.

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 (Sáenz, 2007).

2.1.4. Epidemiología.

La campylobacteriosis es una zoonosis de distribución mundial que afecta mayoritariamente los países en vías de desarrollo. Esta bacteria constituye la principal causa de gastroenteritis en el hombre, por delante incluso de los géneros *Salmonella* y *Shigella*. En países desarrollados se asocia a brotes epidémicos relacionados con consumo de alimentos contaminados especialmente con el pollo. En países en desarrollo su epidemiologia se asocia mas con contaminación fecal del ambiente, al igual que ocurre con el resto de los agentes productores de diarrea.

En países industrializados, *Campylobacter* es el primer agente de diarrea, siendo recuperado en 4-7% de los pacientes con diarrea y en 0-1% de individuos asintomáticos

Las especies que producen diarrea de *Campylobacter* se encuentran habitualmente como comensales del tracto gastrointestinal de una gran variedad de mamíferos y de aves, tanto domésticos como de vida libre, es por ello que el contacto del hombre con los mismos ha siso asociado a campylobacteriosis.

De la misma forma que con otros patógenos entéricos, es importante tener presente, para efectos de prevención, la transmisión fecal-oral de persona a persona sobre todo en lactantes, que no controlan esfínteres (Alvarado, 2007).

2.1.5. Reservorios.

Hay presencia de *Campylobacter* sp. En diversos ambientes. Los animales silvestres y domésticos, en especial las aves de corral, las aves silvestres y el ganado, son reservorios importantes, aunque también pueden ser los animales de compañía y otros animales. Los alimentos, incluidas la carne y la leche no pasteurizada, son fuentes importantes de infecciones por *Campylobacter*.

El agua también es una fuente significativa. Se ha comprobado que la presencia de los microorganismos en aguas superficiales está fuertemente ligada a la pluviosidad, la temperatura del agua y la presencia de aves acuáticas (Frost JA, 2001).

2.1.6. 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.

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.

La transmisión del germen a los niños resulta fácil por ser los animales de compañía (perros y gatos) reservorios del *Campylobacter* (Sáenz, 2007).

2.1.7. Patogenia.

El principal mecanismo de patogenicidad es la invasión de la mucosa intestinal, en forma similar como la S*higella.* La invasión de la lámina propia se observa tanto a nivel del intestino delgado como del colon, y el resultado es generalmente una enterocolitis inespecífica, que puede incluir los siguientes hallazgos: degeneración y atrofia glandular, pérdida de la producción de mucus, abscesos de las criptas, y ulceración de la mucosa epitelial. En otros casos, las características patológicas son similares a las observadas en

infecciones por *Salmonella* o *Shigella.* Parece evidente que el lipopolisacárido de la pared bacteriana, con actividad endotóxica típica, desempeña un rol central en el daño inflamatorio (Blaser MJ, 2000).

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 entero patógenos. El estrés ambiental, fisiológico o las infecciones entéricas concurrentes pueden exacerbar la intensidad de la enfermedad (Ettinger, SJ.; Feldman, EC. 2002).

2.1.7.1. 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.

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).

Pueden haber animales infectados que eliminan el germen en las heces y no presentar sintomatología clínica (Sáenz, 2007).

2.1.7.2. Signos clínicos en humanos.

Las manifestaciones clínicas son: inicio agudo de dolor abdominal tipo cólico, diarrea profusa q puede ser macroscópicamente sanguinolenta, cefalea, malestar y fiebre.

En general la enfermedad es autolimitada a un periodo de 5 a 8 días, pero en ocasiones se prolonga (Jawetz, et al. 2007).

En pacientes inmuno comprometidos puede presentarse colecistitis aguda, pancreatitis, cistitis, artritis reactiva y otras complicaciones como síndrome urémico hemolítico, nefritis intersticial, hepatitis y síndrome de Guillén-Barré (Malbrán, 2001).

2.1.8. Prevención y control.

- Cocción completa de alimentos de origen animal, especialmente la carne de aves.

- Lavarse las manos con jabón después de manipular alimentos crudos de origen animal.

- Lavar tablas de cocina, mostradores y superficies donde se haya manipulado alimentos crudos de origen animal

- Consumir leche y subproductos lácteos pasteurizados.

- Consumir agua potable.

- Evitar que personas con enfermedad intestinal manipulen alimentos para consumo de otras personas.

- Si se tiene mascotas tomar medidas higiénicas como lavado de manos después de tocar a los animales, así como limpieza y desinfección de instalaciones.

2.1.9. Diagnóstico de laboratorio.

a) Recolección de la Muestra.

Las muestras de deposiciones pueden ser tomadas con hisopo rectal o bien por evacuación espontánea, pudiendo mantenerse a temperatura ambiente, por algunas horas, evitando su desecación.

La refrigeración de las muestras prolonga por varios días la sobrevivencia del micoorganismo. Si es necesario usar un medio de transporte, debe utilizarse el medio Cary Blair modificado por la reducción de la concentración de agar en un 0,12%.

b) Examen Microscópico Directo.

Las muestras de materia fecal pueden ser examinadas a través de una tinción simple como Gram utilizando carbol fucsina como colorante de contraste, o azul de metileno para identificar leucocitos y formas bacilares curvas. La observación en microscopio óptico con objetivo de inmersión (100X) o de campo oscuro de bacilos curvos y/o espiralados con gran motilidad en forma circular o de sacacorchos nos permite un diagnóstico presuntivo rápido.

c) Cultivo en Agar TCBS (agar selectivo para Vibrio).

El Agar TCBS es utilizado como medio selectivo para el aislamiento y cultivo de Vibrio.

Cuadro 3. Fórmula del Agar TCBS

Extracto de Levadura 3.0	Cloruro de Sodio 5.0
Mezcla de Peptonas 10.0	Rojo de Fenol 0.08
Lactosa 10.0	Verde Brillante 0.0125
Sacarosa 10.0	Agar Bacteriológico 20.0
pH 6.9 ± 0.2	

El Agar TCBS, por las iniciales de Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa, es preparado de acuerdo con la fórmula de Kobayashi y col. siendo una modificación del medio de Nakanishi. En el Agar TCBS crecen todas las

especies de Vibrio patógenas para el humano excepto V. hollisae. Las muestras pueden ser de materiales clínicos.

El Agar TCBS es altamente selectivo para las especies de Vibrio debido a sus componentes nutricionales y a la alta concentración de sales y es ampliamente utilizado en placa para el primo aislamiento. Este medio junto en el Agua Peptonada Alcalina es utilizado para el aislamiento de V.cholerae y otras especies a partir de muestras fecales.

En este medio el extracto de levadura y las peptonas proporcionan la fuente de nitrógeno, vitaminas y aminoácidos. El citrato de sodio, el tiosulfato de sodio y la bilis actúan como agentes inhibidores de microorganismos Gram positivos y coliformes dando alcalinidad al medio. La sacarosa es el carbohidrato fermentable. El cloruro de sodio promueve el crecimiento. El tiosulfato de sodio es la fuente de sulfuro y el citrato de hierro es un indicador para detectar la producción de H2S. El azul de timol y de bromotimol, actúan como indicadores de pH. El agar bacteriológico es agregado como agente solidificante.

d) Método de filtración para la detección de campylobacter en heces.

El método se basa en la separación de *Campylobacter* del resto de la flora microbiana presente en las heces, como por ejemplo los coliformes, que quedan retenidos en la superficie de una membrana de celulosa de 0,45 o 0,66 µm; los bacilos que logran penetrar transponer la membrana van a depositarse sobre un medio de cultivo en este caso agar TCBS (agar tiosulfato citrato bilis sacarosa) que actuará como sustrato para el crecimiento del micoorganismo.

De esta manera se obtiene un cultivo selectivo, situación que remplaza a la adición de antibióticos, para eliminar la flora acompañante. Este método se recomienda para el aislamiento de las especies emergentes **(ej. *Campylobacter upsaliensis*).**

Procedimiento: **(revisar fig. 2)** atemperar el medio de cultivo en placa de Petri, acomodar con una pinza los filtros estériles de celulosa de 0,45 µm, esperar a que se adhieran al medio.

Realizar una suspensión de materia fecal en solución fisiológica y con una micropipeta o pipeta Pasteur, depositar aproximadamente 100 µl sobre la membrana, tratando que no se derrame sobre el medio de cultivo. Dejar que se filtre por un tiempo mínimo de 30 minutos, luego levantar el filtro con la pinza y desecharlo.

Estriar el filtrado con asa de platino. Acondicionar las placas en jarras para incubar en micro aerófila a 37°C durante 24-48 horas. Si la diarrea es acuosa, no es necesario realizar una suspensión en solución fisiológica (Malbrán, 2001).

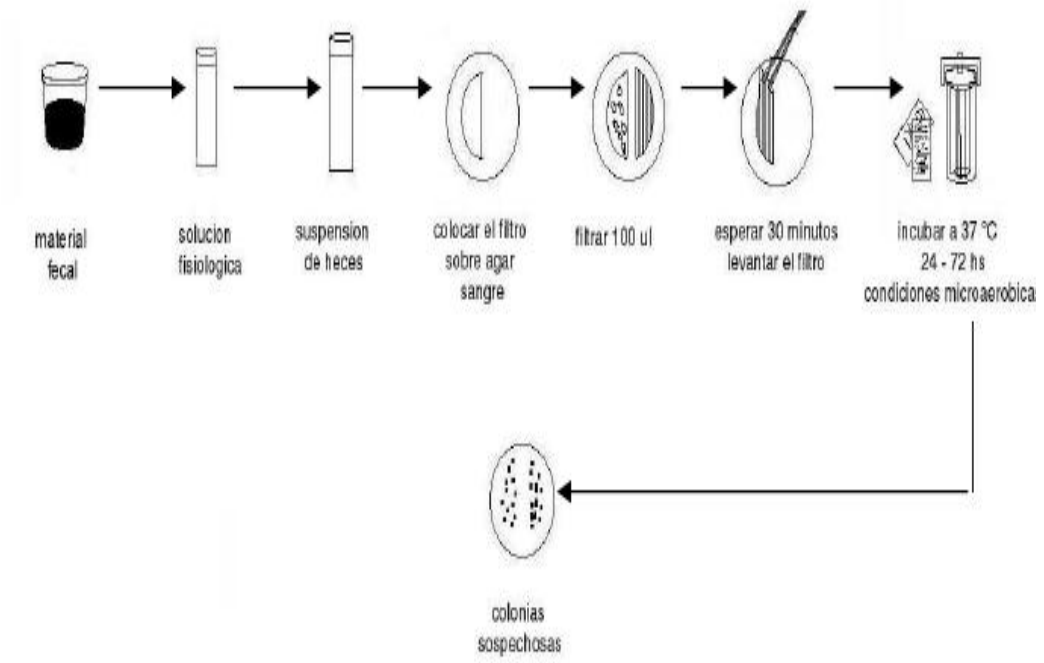


Figura 2. Técnica de Filtración con Membrana de Celulosa para la Detección de Campylobacter sp, en Heces

e) Atmósfera de Incubación.

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

- Remplazo 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 remplaza 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.

- 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 micro aeróbicas apropiadas.

- Sobres generadores de hidrógeno y oxígeno para anaerobiosis: se pueden usar sólo si tienen como reacción ante 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.

f) Temperatura de incubación.

Las especies termófilas de Campylobacter crecen mejor a 42-43°C que a 37°C. La mayor temperatura actúa como inhibición de la flora fecal. Si no se cuenta con una estufa a esa temperatura, se puede utilizar una de 37°C con las consideraciones del caso. **(Malbrán. 2001).**

Cuadro 3. Temperaturas de Desarrollo de las Diferentes Especies de Campylobacter.

	25°C	37°C	42°C
C. jejuni subsp. Jejuni	-	+	+
C. jejuni subsp. Doylei	-	+	-
C. coli	-	+	+
C. fetus subsp. Fetus	+	+	D
C. fetus subsp. Veneralis	+	+	-
C. lari	-	+	+
C. upsaliensis	-	+	+
C. hyointestinalis	d	+	D
C. sputorum subsp. sputorum	-	+	+
C. sputorum subsp. bubulus	d	+	-
C. curvus	-	+	+
C. rectus	-	+	D
C. showae	-	-	+

Fuente: Malbrán C, 2001

g) Sistema *Campylobacter* (generador de condiciones micro aerófilas).

Generan condiciones micro aerófilas en jarras de metal o plástico. Componente activo: ácido ascórbico. Hay sobres para jarras de 2.5 y 3.5 litros.

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 micro aeróbicas apropiadas. No necesita un catalizador ni agua para activar la reacción.

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

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 Campy Gen 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 micro aeróbicas dentro de la jarra.

- Después del tiempo de incubación apropiado, retirar las placas de petri y examinar el crecimiento de colonias.

Si se necesita volver a incubar deberá utilizarse una bolsa nueva (Sáenz, 2007).

h) 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, colores grisáceos y bordes irregulares.

i) Identificación presuntiva

- Examen directo y coloración de Gram:

Los frotis de heces teñidos con Gram utilizando fucsina fenicada (carbol fucsina) 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.

Las impresiones de intestino de cerdo con enteritis proliferativa, teñidas con tinciones argénticas (coloración con nitrato de plata) 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.

- 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 (Malbrán, 2001).

- Prueba T.S.I Agar (Agar triple azúcar hierro):

Es un medio de diferenciación que no debe utilizarse para el aislamiento primario de patógenos a partir de muestras clínicas.

Cuadro 4. Fórmula del Agar TSI

Peptona	15g
Extracto de levadura	3g
Extracto de carne	3g
Proteosa de peptona	5g
Glucosa	1g
Lactosa	10g
Sacarosa	10g
Sulfato de hierro	0,20
Cloruro sódico	5g
Tiosulfato de sodio	0,30g
Rojo fenol	0,024g
Agar	12g

Se utiliza en la diferenciación de cultivos puros obtenidos en medios de aislamiento y también pueden emplearse como medio para el subcultivo de caldo de enriquecimiento de Salmonella.

Inocular Agar Triple Azúcar Hierro con una colonia presuntiva de una placa de aislamiento primario o con un asa llena de medio del caldo de enriquecimiento de Salmonella (por ejemplo, caldo selenita). Incubar en atmósfera aerobia a 35 – 37 °C durante 18 – 24 h. No incubar en una atmósfera aerobia enriquecida con dióxido de carbono ni por períodos más prolongados que 24 h, dado que de esa manera se podrían producir resultados erróneos (Faddin, 1985).

j) Identificación final

- Medio de Cultivo SIM (Sulfuro, Indol, Movilidad):

Medio de cultivo de ensayo, para comprobar la formación de sulfuro, la producción de indol y la motilidad, en el marco del diagnóstico de enterobacteriáceas.

Cuadro 5. Formula del medio SIM

Tripteína	20.0
Peptona	6.1
Sulfato de hierro y amonio	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Agar	3.5

El cultivo puro sometido a examen se siembra por picadura en la columna de medio de cultivo, la incubación es de 18-24 horas a una temperatura de 37ºc.

La motilidad se pone de manifiesto por la turbidez difusa del medio de cultivo alrededor del canal de la picadura. La motilidad se caracteriza por el crecimiento producido exclusivamente a lo largo de dicho canal. La producción

de H_2S se reconoce por el ennegrecimiento de lo zona de crecimiento (Merck, 1994).

- 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 (Sáenz. 2007).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales.

3.1.1. De campo.

- Clínicas Veterinarias
- Hospital Docente Veterinario de la UNL
- Laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario de la Universidad Nacional de Loja
- 43 Perros de diferente edad, raza y sexo, con sintomatología clínica de diarrea.

3.1.2. De laboratorio.

- Mechero
- Placas de petri con agar TCBS. (Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa)
- Filtros MILLIPORE (MF Membrane filtres) de 0.45 micras
- Campy Gen sobres (sistema Campylobacter)
- Tubos de ensayo con Agar TSI (Agar Triple Azúcar Hierro)
- Tubos de ensayo con Medio de Cultivo SIM (Sulfuro, Indol, Movilidad)
- Asa de platino
- Erlenmeyer
- Pinzas estériles
- Pipetas de 1ml estériles

- Jarra Anaerojar
- Agitador Vortex
- Guantes
- Gradilla
- Hisopos estériles
- Porta objetos
- Cristal Violeta
- Agua
- Agua destilada
- Agua Oxigenada al 3%
- Papel absorbente
- Microscopio
- Aceite de inmersión
- Autoclave
- Incubadora a 42ºC
- Refrigeradora
- Bata blanca
- Tubos de ensayo con medio de transporte Cary Blair
- Hielera

3.1.3. De Oficina.

- Computadora
- Hojas de papel bon
- calculadora

- Cinta Maski
- Marcador
- Hojas de registro de datos
- Hoja informativa para las clínicas
- Lapicero
- Teléfono celular
- Material de escritorio

3.2 MÉTODOS.

3.2.1. Delimitación del Área de Estudio.

El presente estudio se realizó en 7 clínicas veterinarias de la ciudad de Loja incluyendo el Hospital Docente Veterinario ‘‘Cesar Augusto Guerrero’’ de la Carrera de Medicina Veterinaria Y Zootecnia del Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la UNL que están ubicadas en diferentes puntos de la ciudad, presentando las siguientes características climatológicas:

- Altitud: 2130 m.s.n.m.

- Precipitación: 1000 a 1200 mm, anual.

- Temperatura: 16.1ºC., promedio.

Las clínicas en las que se tomaron las muestras son las siguientes:

- Clínica Veterinaria “Rodríguez”
- Clínica Veterinaria “Scooby”
- Clínica Veterinaria “ Canes Supremos”

- Clínica Veterinaria “ Dogos”
- Clínica Veterinaria “ Beethoven”
- Clínica Veterinaria “ Animal Center”
- Hospital Docente Veterinario UNL

3.2.2. 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 (Mayo 2011 a Julio 2011). En este periodo de tiempo se presentaron 43 casos con diferentes signos como gastroenteritis, anoréxicos y neumónicos, los cuales fueron atendidos en las diferentes clínicas veterinarias y en el Hospital Docente Veterinario de la UNL.

3.2.3. Toma de Muestras.

La toma de muestras se realizo en pacientes que llegaron a las diferentes clínicas veterinarias en estudio incluyendo el hospital docente veterinario de la Universidad Nacional de Loja ubicadas en diferentes puntos de la ciudad. Las muestras fueron tomadas asépticamente antes de haber iniciado tratamiento farmacológico.

a) Manejo y Conservación de las Muestras

- Se procedió a tomar con un hisopo estéril parte de la muestra de las deposiciones de cada paciente.

- Se introdujo el hisopo en el medio de transporte Cary Blair, cuidando de que el hisopo quede 2 cm por debajo de la superficie y sin perforar el fondo del medio de transporte.
- Rompemos la parte del mango del hisopo que tocó nuestros dedos para evitar fuentes de contaminación externa.
- Cerramos bien el tubo y luego se procedió a identificar y registrarlo con los datos del paciente como nombre, edad, raza, sexo, signos clínicos, zona donde reside y clínica donde se atendió.
- Las muestras fueron transportadas en una hielera y llevadas al Laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario de la CMVZ, UNL, para su siembra y análisis.
- El proceso de siembra se hizo en un lapso de tiempo no mayor de 24 horas después de tomada la muestra (tiempo máximo para q la muestra no sufra ninguna alteración).

b) Método de Laboratorio

Las muestras se las trabajo en el Laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario de la CMVZ, UNL, bajo un control estricto de higiene y libre de contaminación.

El método que se utilizó es el de Filtración en Agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa) utilizando la membrana de Nitrocelulosa de 0.45 micras. El procedimiento que se realizó con cada una de las muestras fue siguiente:

- Se preparo el Agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa), colocando 8,6 gr del medio en 100 ml de agua destilada (por cada 10 placas petri), se procedió a calentar la mescla hasta su completa disolución.

- Luego se hizo hervir el preparado durante un minuto para posteriormente dejarlo enfriar a una temperatura de 45ºC; se vacío el preparado en cada placa petri estériles. No se autoclavo el medio según las recomendaciones del fabricante.

- Con una pinza estéril se colocó una membrana de Nitrocelulosa sobre el Agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa).

- Se homogenizo la muestra utilizando el **agitador Vortex** y con una pipeta estéril de 1 ml se extrajo 0.2 ml de la mezcla y se colocó sobre la membrana. Se esperó aproximadamente 30 minutos hasta que la mezcla se filtre totalmente.

- Con una pinza estéril se retiró y desechó la membrana.

- Se tapo e identifico a la placa de petri y se coloco junto con un sobre de Campy Gen dentro de la Jarra Anaerojar. En la misma se coloco aproximadamente de 3 a 5 muestras al mismo tiempo.

- Se procedió a incubar a una temperatura de 42ºC por 72 horas.

- Al final se observó si hubo crecimiento de colonias características de Campylobacter sp.

c) Interpretación de los resultados.

En las placas que dieron positivos al crecimiento de Campylobacter sp, se observaron colonias amarillas, cremosas, brillantes, de bordes regulares, mientras que las placas negativas no se observo ningún cambio, permaneciendo el Agar de color verde.

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

1. **Se realizó Tinción de Gram** utilizando fucsina fenicada como colorante de contraste, para luego proceder a observar en el microscopio óptico con el objetivo de inmersión (100 X) logrando identificar los bacilos finos en forma de gaviota.

2. **TSI (Agar Triple Azúcar Hierro):** Se procedió a preparar el medio colocando 6,25 gr de polvo en 100 ml de agua destilada (para 10 tubos de ensayo), luego se calentó la mezcla agitando frecuentemente, para posteriormente proceder a hervir de 1 o 2 minutos hasta su disolución total.

Se procedió a llenar los tubos de ensayo hasta una tercera parte, para luego proceder a esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb de presión) por 15 minutos. Se dejo enfriar en pico de flauta profundo.

Luego se procedió a inocular TSI (Agar Triple Azúcar Hierro) por picadura con un asa de platino una colonia presuntiva de una placa de aislamiento puro, en atmósfera aerobia a 35-37°C durante 18 – 24 horas. No enriquecida con dióxido de carbono ni por períodos más prolongados que 24 horas, dado que de esa manera se podrían producir resultados erróneos

.

3. **SIM (Sulfuro, Indol, Movilidad)**: la preparación de este medio es similar al descrito anteriormente con el TSI con las únicas diferencias que la cantidad de disolución es de 3gr en 100ml de agua destilada (para cada 10 tubos de ensayo), y el modo de enfriamiento es colocar los tubos de manera vertical.

Con estas pruebas de **TSI** y **SIM** las muestras positivas que fueron sembradas en una atmosfera anaerobia a 37ºC durante 24h, mostraron una coloración negra en el fondo del tubo debido a que la reacción de Campylobacter sp, se basa en la liberación de SH2 (ácido sulfídrico), por acción enzimática de los aminoácidos que contienen Azufre y se pone en evidencia por indicadores como el sulfato ferroso (Fe^{2+}), que contiene su formula.

4. **PRUEBA DE CATALASA:** Para esta prueba se cogió con cuidado una colonia de cultivo de Campylobacter con el asa de platino (evitando coger agar), se la coloco sobre un porta objetos sin añadir agua, se procedió a colocar una gota de agua oxigenada pura al 3%. Las pruebas que resultaron positivas, desprendieron burbujas como consecuencia de la actividad enzimática de la catalasa, debido a que esta enzima tiene la capacidad de degradar el peróxido de hidrogeno $2H_2O_2$.

3.2.4. Variables.

Se evaluaron las siguientes variables:

- Aislamiento de la bacteria.
- Susceptibilidad de acuerdo al sexo, raza y edad.
- Signos clínicos de la enfermedad.
- Coloración en el Agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa).

3.2.5. Toma y Registro de Datos.

3.2.5.1. Aislamiento de la Bacteria.

Para el análisis de esta variable se tomo en cuenta los resultados positivos que dieron al hacer el cultivo en el Agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa) aplicando la técnica de filtración con la membrana de Nitro Celulosa de 0.45

micras y se determino únicamente el crecimiento de la bacteria aislándola de la demás flora microbiana.

3.2.5.2. Susceptibilidad de acuerdo al Sexo, Raza y edad.

Para el análisis de esta variable se tomo en cuenta los resultados que dieron positivos al cultivo en el Agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa) en los diferentes pacientes que llegaron a las diferentes clínicas veterinarias y al hospital docente veterinario durante el periodo de ensayo y se determino la prevalencia del Campylobacter sp, de acuerdo al sexo, raza y edad.

3.2.5.3. Signos clínicos de la enfermedad.

En esta variable se tomo en cuenta todos los pacientes que llegaron con diferentes signos, como son: gastroentéricos, anémicos y neumónicos, y se determino el principal signo que caracteriza la enfermedad.

3.2.5.4. Coloración en el Agar TCBS (agar tiosulfato citrato bilis sacarosa).

Para esta variable se tomo en cuenta el crecimiento de la bacteria en el Agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa), y se determino la coloración característica del cultivo.

3.2.6. Análisis Estadístico.

Se utilizo la estadística descriptiva para el ordenamiento de la información en cuadros y figuras, las mismas que facilitaron su posterior análisis e interpretación.

4. RESULTADOS

4.1. AISLAMIENTO DE LA BACTERIA (NUMERO).

Una vez llenado los respectivos registros y anamnesis de los 43 pacientes sospechosos al Campylobacter sp, se procedió a realizar el aislamiento de la bacteria aplicando el método de **filtración en membrana de Nitro Celulosa de 0.45 micras,** los resultados se muestran en el cuadro siete y representado en la figura tres.

Cuadro 7.- Presencia de Campylobacter Sp. En muestras de heces de perros con sintomatología clínica de diarrea.

AISLAMIENTO DE LA BACTERIA	***TOTAL***	***POSITIVAS***		***NEGATIVAS***	
		NUMERO	**%**	**NUMERO**	**%**
Filtración en membrana de Nitro Celulosa	43	28	65,12	15	34,88

Fuente: Investigación directa

Elaborado por: El autor

Como se puede observar en el cuadro siete al aplicar el método de **Filtración en Membrana de Nitro Celulosa** a las 43 muestra para lograr así el aislamiento total de la bacteria, un 65.12 % de las muestras analizadas dieron positivas al cultivo de campylobacter, mientras que un 34.88 % de las muestras analizadas dieron negativo a la presencia de campylobacter.

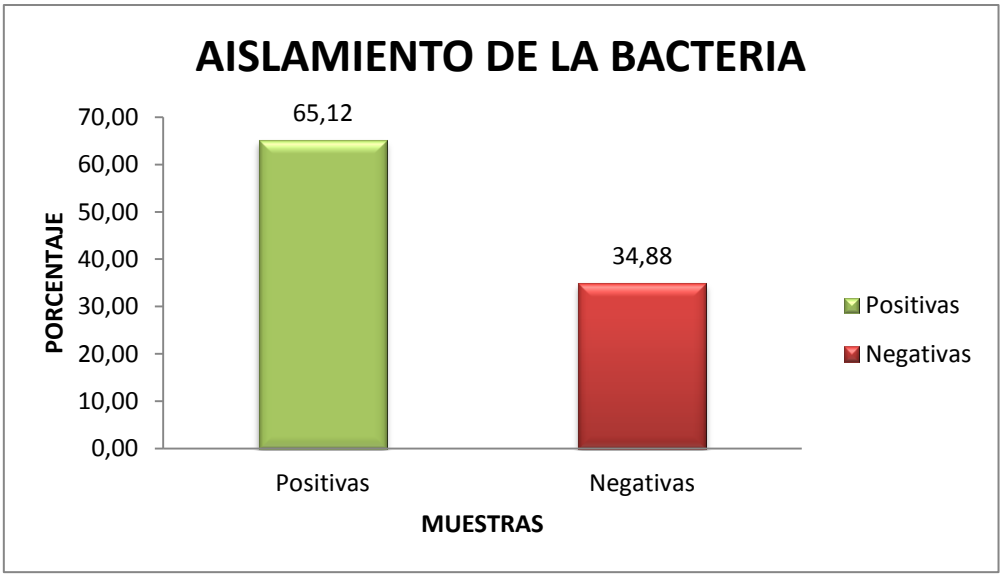


Figura 3. Porcentaje total de muestras positivas y negativas al Campylobacter sp.

4.2. SUSCEPTIBILIDAD DE ACUERDO AL SEXO, RAZA Y EDAD (PORCENTAJE).

4.2.1. Susceptibilidad de acuerdo al Sexo.

Se determinó tomando en consideración los resultados del aislamiento y cultivo de la bacteria con respecto al sexo de los pacientes sospechosos a Campylobacter. Los resultados se muestran en el cuadro ocho y se grafica en la figura cuatro.

Cuadro 8- Susceptibilidad de la bacteria campylobacter sp, de acuerdo al sexo de los pacientes.

SEXO	MUESTRAS ANALIZADAS	POSITIVAS		NEGATIVAS	
		NUMERO	%	NUMERO	%
Macho	26	17	65,38	9	34,62
Hembra	17	11	64,71	6	35,29
TOTAL	43	28	65,12	15	34,88

Fuente: Investigación directa

Elaborado por: El autor

El cuadro ocho muestra que del número total de machos analizados (26), diecisiete resultaron positivos a campylobacter, dando un porcentaje de 65.38 %. De las hembras analizadas (17), once resultaron positivas, lo que corresponde al 37.5 %.

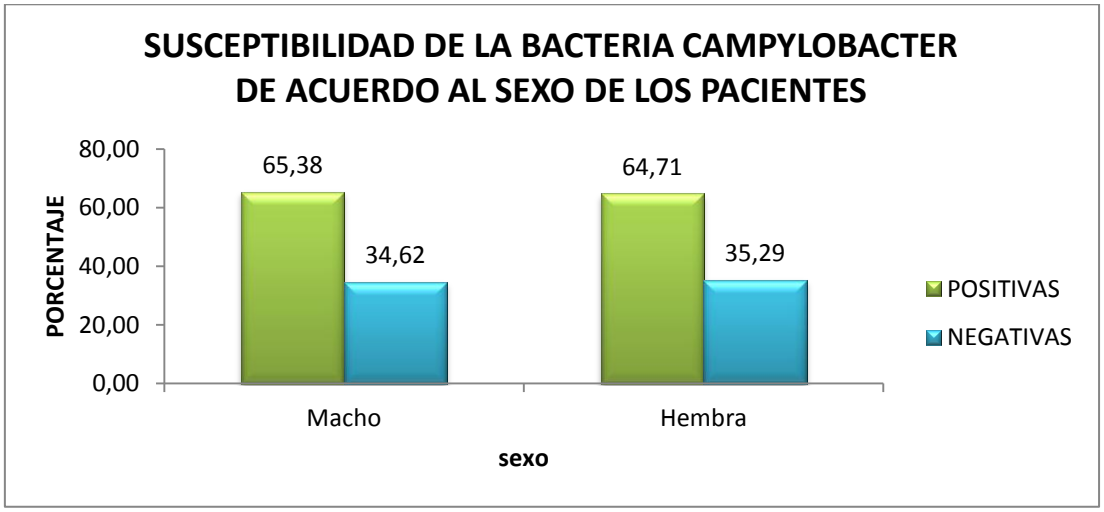


Figura 4.- Susceptibilidad de la bacteria campylobacter sp, con respecto al sexo de los pacientes.

4.2.2. Susceptibilidad de acuerdo a la raza.

Se determinó tomando en consideración los resultados del aislamiento y cultivo de la bacteria con respecto a la raza de los pacientes sospechosos a Campylobacter sp. Los resultados se muestran en el cuadro nueve y se grafica en la figura cinco.

Cuadro 9.- Susceptibilidad de la bacteria campylobacter sp, de acuerdo a la raza de los pacientes.

RAZAS	MUESTRAS ANALIZADAS	POSITIVAS		NEGATIVAS	
		NUMERO	%	NUMERO	%
Grandes	10	5	50	5	50,0
Medianas	4	2	50	2	50,0
Pequeñas	12	10	83,33	2	16,67
Mestizas	17	11	64,71	6	35,29
TOTAL	43	28	65,12	15	34,88

Fuente: Investigación directa
Elaborado por: El autor

En el cuadro nueve se puede apreciar que de los 43 pacientes analizadas en diferentes razas, los más susceptibles a adquirir la bacteria de campylobacter sp, son los de raza pequeña que de 12 pacientes analizados 10 fueron positivos lo que representa el 83.33 % y dos resultaron negativos que representa el 16.67 %.

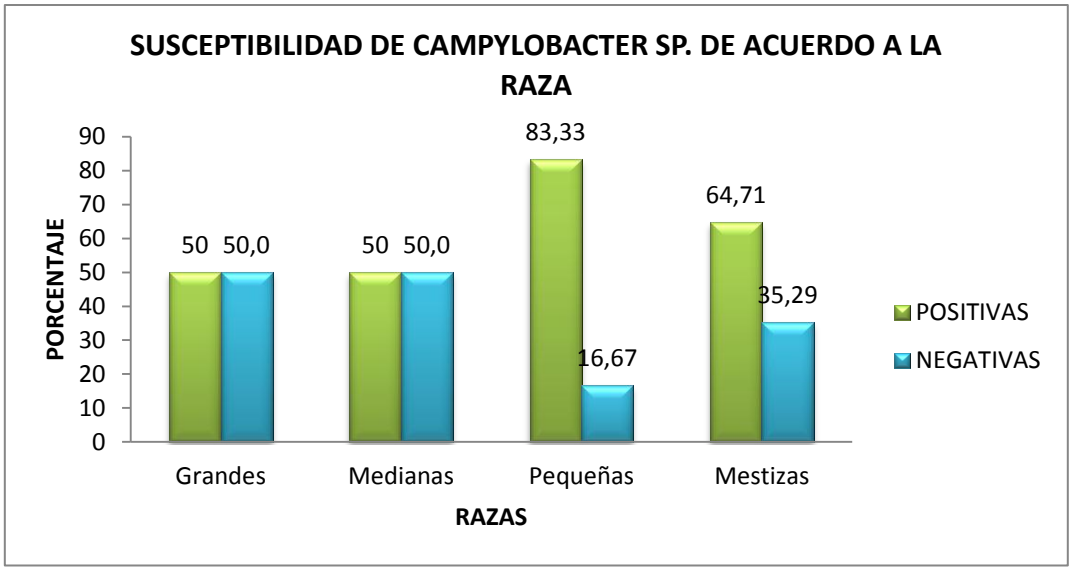


Figura 5.- Susceptibilidad de la bacteria campylobacter con respecto a la raza de los pacientes.

4.2.3. Susceptibilidad de acuerdo a la edad.

Se determinó tomando en consideración los resultados del aislamiento y cultivo de la bacteria con respecto a la edad de los pacientes sospechosos a Campylobacter Sp. Los resultados se exponen en el cuadro 10 y se grafica en la figura seis.

Cuadro 10. Susceptibilidad de la bacteria Campylobacter sp, de acuerdo a la edad de los pacientes.

EDAD	MUESTRAS ANALIZADAS	POSITIVAS		NEGATIVAS	
		NUMERO	%	NUMERO	%
De 1a 6 meses	23	18	78,26	8	21,74
De 6 meses a 1 año	10	6	60,00	4	40,00
Mayores de 1 año	10	4	40,00	3	60,00
TOTAL	43	28	65,12	15	34,88

Fuente: Investigación directa
Elaborado por: El autor

En el cuadro 10 se puede apreciar que de todas las muestras analizadas en cuanto a la edad de los pacientes, los más susceptibles a adquirir la bacteria de Campylobacter Sp, son los de 1 a 6 meses de edad, en este parámetro se analizó 23 pacientes de los cuelas 18 fueron positivos a campylobacter con un porcentaje del 78.26 %.

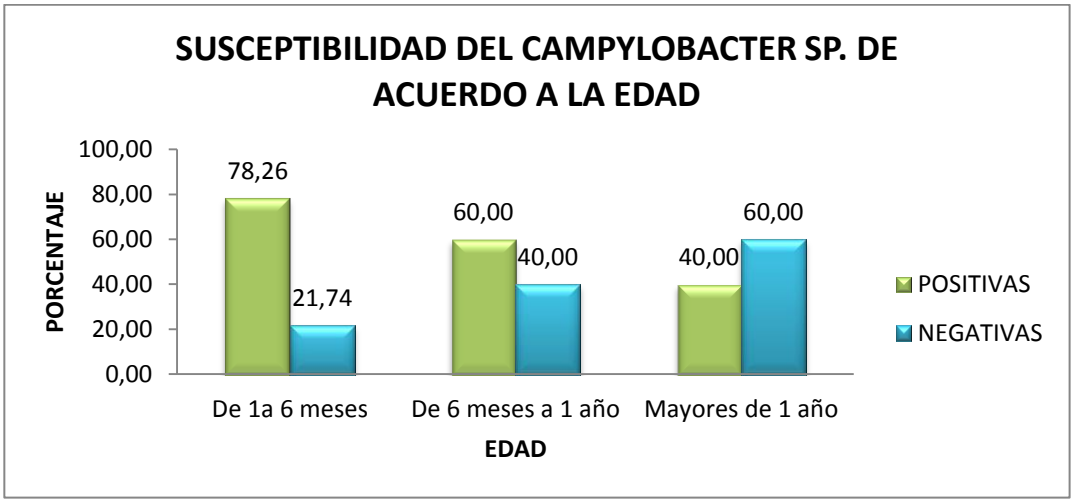


Figura 6. Susceptibilidad de la bacteria Campylobacter sp, con respecto a la edad de los pacientes.

4.3. SIGNOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD (PORCENTAJE).

Se realizó el diagnostico de la bacteria en todos los pacientes sospechosos a Campylobacter sp, que presentaron diferentes signos de la enfermedad. Además se tomo en cuenta el anamnesis de los pacientes para tener conocimientos sobre los signos y síntomas que presentaron cada uno de los pacientes. Los resultados se indican en el cuadro 11 y se representa en la figura 7.

Cuadro 11. Diagnóstico de Campylobacter sp, en pacientes con síntomas característicos de le enfermedad

SIGNOS	MUESTRAS ANALIZADAS	POSITIVAS		NEGATIVAS	
		NUMERO	%	NUMERO	%
Anoréxicos	8	3	37,50	5	62,50
gastroentéricos	26	25	96,15	1	3,85
Neumónicos	9	0	0,00	9	100,00
TOTAL	43	28	65,12	15	34,88

Fuente: Investigación directa
Elaborado por: El autor

En el cuadro 11 se demuestran los diferentes signos mediante los cuales los pacientes fueron valorados a ingresar a la atención médica. Es por ello que se obtuvo de un número de 43 pacientes, ocho ingresaron con signos anoréxicos de los cuales tres resulto positivo y cinco negativos. También se atendió nueve pacientes que presentaron signos neumónicos de los cuales los nueve resultaron negativos, cabe destacar que también se analizaron 26 muestras de pacientes con problemas gastroentéricos de los cuales 25 dieron positivos a campylobacter mientras uno dio negativo.

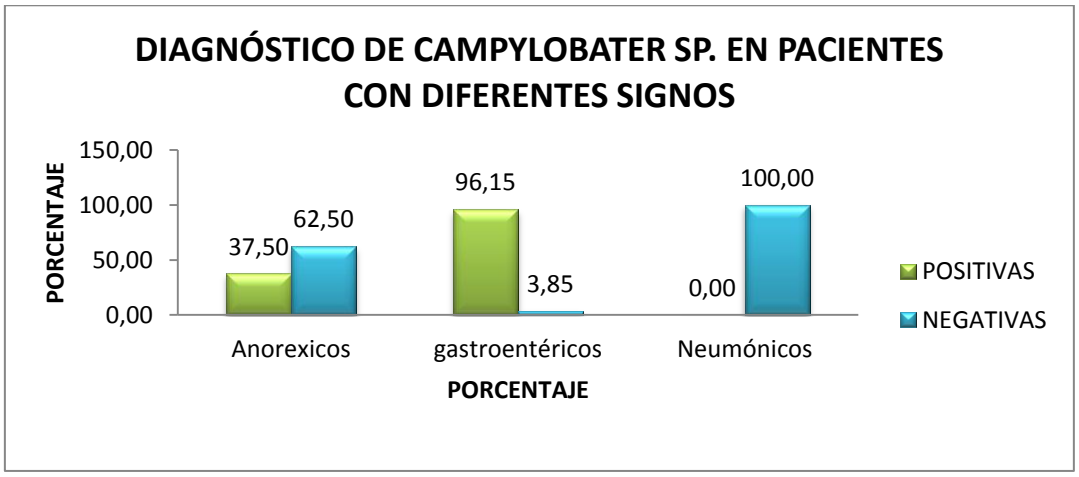


Figura 7. Diagnostico de Campylobacter en pacientes con diferentes signos de la enfermedad

4.4. COLORACIÓN EN EL AGAR TCBS (PORCENTAJE).

Se determinó tomando en cuenta los resultados de los cultivos con el agar TCBS, con respecto a la coloración que presentaron los cultivos positivos a Campylobacter sp. Los resultados se exponen en el cuadro 12 y se grafica en la figura ocho.

Cuadro 12. Coloración en el Agar TCBS (agar tiosulfato citrato bilis sacarosa**)**

COLOR	MUESTRAS	
	NUMERO	%
AMARILLO	28	65,12
VERDE	15	34,88
TOTAL	43	100,00

Fuente: Investigación directa
Elaborado por: El autor

En el cuadro 12 se logra apreciar que de las 43 muestras que se analizaron, 28 presentaron un color amarillo, con un porcentaje del 65,12 %, las cuales dieron positivas al diagnóstico de campylobacter utilizando el agar TCBS; mientras que las 15 restantes, presentaron un color verde, con un porcentaje del 34,88 % las cuales dieron negativo al diagnóstico de campylobacter.

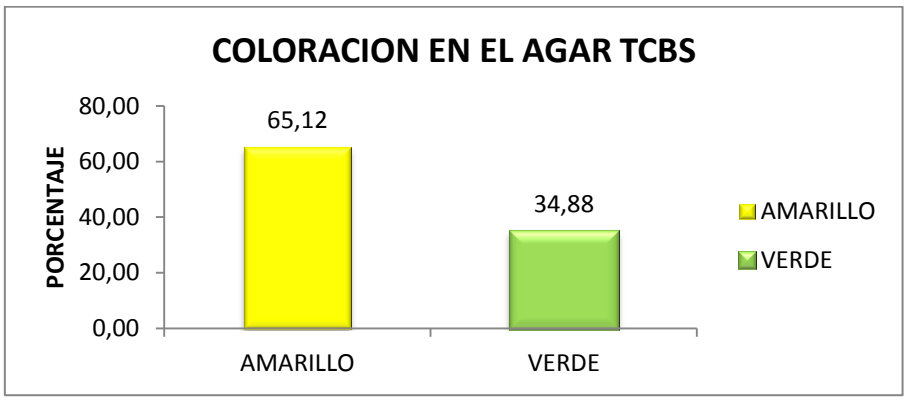


Figura 8. Forma de coloración en el Agar TCBS (agar tiosulfato citrato bilis sacarosa**)**

5. DISCUSIÓN

5.1. AISLAMIENTO DE LA BACTERIA (NÚMERO).

Las muestras fueron analizadas utilizando el método de Filtración en agar TCBS con membrana de Nitrocelulosa de 0.45 micras, e incubadas por 72 horas en un medio microaerófilo de 37ºC a 42ºC. De 43 muestras analizadas en el laboratorio se obtuvo un total de 28 muestras positivas dando un porcentaje de 65.12 %, y los 15 restantes de muestras dieron negativos con un porcentaje del 34.88 %.

Con el método de filtración utilizado se logró aislar la bacteria y 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 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.

Otros métodos de identificación, se les realizó a todos los cultivos las pruebas de TSI y SIM en los cuales se observó que dé los 43 cultivos sembrados en estas pruebas un 65,12 % resultaron positivos, presentando una coloración negra en el fondo de los tubos y un 34,88 % no presentaron cambio alguno. También se les realizo la prueba de catalasa a todas las muestras, dando como

resultado que de las 43 muestras 28, resultaron positivas a esta prueba y 15 negativas.

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

5.2. SUSCEPTIBILIDAD DE ACUERDO A LA EDAD, RAZA Y SEXO (PORCENTAJE).

5.2.1. Susceptibilidad de acuerdo a la Edad.

Con respecto a la susceptibilidad en cuanto a la edad de los pacientes, se llegó a determinar que los animales que se encuentran entre uno a seis meses de edad son más susceptibles a contraer la enfermedad con un 78,26 %; este resultado tiene congruencia con un estudio realizado por Ettinger, SJ. Y Feldman, EC. (2002) que dice que los perros y gatos jóvenes menores de seis meses de edad parecen ser más susceptibles a la infección y a presentar la enfermedad clínica. Al parecer es mas probable que los cachorros y los gatitos adquieran la bacteria y muestren la enfermedad clínica por la falta de exposición y formación de anticuerpo protector, esto se debe a que los anticuerpos maternos tienen una duración hasta los tres meses de edad luego de ello disminuyen progresivamente por lo que el animal queda a expensas a adquirir la enfermedad, a más que es posible que otros patógenos entéricos como parvovirus, coronavirus y salmonella tengan un efecto sinérgico con Campylobacter sp, de ahí la importancia de inmunizar a los animales para la prevenir estas enfermedades.

5.2.2. Susceptibilidad de acuerdo a la Raza.

Con respecto a la raza de los pacientes se llegó a determinar que los más susceptibles a adquirir la bacteria de campylobacter sp son los de razas pequeñas con un 83.33 %, esto se debe a que ellos en su mayoría están expuestos a diversos factores como son: mala alimentación, manejo inadecuado, estrés ambiental, y fisiológico, a más de que la mayor parte de estos no son inmunizados ni mucho menos desparasitados, ya que como se sabe que la transmisión de parásitos de la progenitora a sus cachorros se produce con anterioridad al parto o a través de la lactancia, por lo que inmunológicamente están propensos ante cualquier desafío de campo.

5.2.3. Susceptibilidad de acuerdo al Sexo.

En cuanto al sexo de los pacientes se obtuvo 26 pacientes de sexo macho y 17 pacientes de sexo hembra de los cuales se llego a determinar que los primeros ocupan el 65,38 % del total de las muestras, esta prevalencia no es muy significativa, debido a que los pacientes de sexo hembra obtuvieron un porcentaje del 64,71 %. En si el sexo no constituye en un factor de relevancia con respecto a adquirir la enfermedad de Campylobacter sp.; ya que la mayoría de estos están expuestos a las mismas condiciones de cuidado, alimentación, etc.

5.3. SIGNOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD (PORCENTAJE).

En cuanto al diagnóstico de los signos de la enfermedad, de los 43 pacientes que ingresaron a atención médica, 26 ingresaron exclusivamente con signos

gastroentéricos (Diarrea), a los cuales se les realizó el diagnóstico de Campylobacter Sp, mediante el cultivo en Agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa) utilizando membrana de Nitrocelulosa, resultando 25 casos positivos y un caso negativo, por lo que se deduce que el principal síntoma de esta enfermedad es la Diarrea, esto se debe a que el principal mecanismo de patogenicidad de la bacteria de Campylobacter Sp, es la invasión de la mucosa intestinal a nivel del intestino delgado y el colon en forma similar a otras enfermedades como lo es Salmonella y Shigella, interfiriendo la absorción intestinal provocando una disminución de la absorción de agua y electrolitos por las vellosidades del epitelio y aumentando la secreción de éstos por las criptas, el volumen que llega al intestino grueso supera la capacidad de absorción de éste, con lo que se produce la diarrea.

Puede que algunos de los animales padezcan Campylobacteriosis sin tener ningún síntoma diarreico confirmando lo que dijo Morgan, RV. (1999), que pueden haber animales infectados que eliminan el germen en las heces y no presentan sintomatología clínica de diarrea.

También se atendió a ocho pacientes con síntoma de anorexia resultando tres pacientes positivos y cinco negativos, este síntoma se debe a que el campylobacter sp, muchas de las veces al ser ingerido produce endotoxinas en contacto con el asido gástrico, provocando espasmos e inflamación estomacal impidiendo que el animal coma por el dolor provocado.

Además se atendió a nueve pacientes con síntomas neumónicos, de los cuales su totalidad resultó negativa al diagnóstico de campylobacter sp.

5.4. COLORACIÓN EN EL AGAR TCBS (PORCENTAJE).

En cuanto a la coloración en el Agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa), de las 43 muestras que fueron sembradas durante 72 horas a una temperatura de 42ºC, 28 presentaron colonias de tamaño mediano, planas, de textura cremosa y de un color amarillo, significando un 65,12 % esto se debe a la acción de la sacarosa, ya que esta es fermentada por acción del campylobacter, mientras que las 15 restantes presentaron una coloración verde dando un 34,88 %.

De esta manera al haber hecho este estudio aislado Campylobacter sp. en perros de la ciudad utilizando un método de diagnóstico accesible y efectivo, es un hallazgo de gran importancia en la Medicina Veterinaria ya que podría incluirse dentro del diagnóstico como causante de diarrea en mascotas.

6. CONCLUSIONES

- Se determinó que de las 43 muestras analizadas, 28 resultaron positivas al diagnóstico de Campylobacter sp. con un porcentaje del 65,12%.

- Los individuos más jóvenes son más propensos a adquirir la enfermedad

- Los pacientes de raza pequeña, presentaron mayor susceptibilidad a adquirir la enfermedad.

- El sexo de los pacientes no está asociada con la presencia de Campylobacter sp.

- La presencia de diarrea clínica resultó como principal síntoma de la enfermedad de Campylobacteriosis.

- En ocasiones la ausencia del síntoma de diarrea, no indica que el paciente esté libre de Campylobacter sp.

- El método de Filtración en agar TCBS utilizando la membrana de Nitrocelulosa de 0.45 micras. logra un cultivo puro de *Campylobacter sp*. sin necesidad de la adición de antibióticos inhibitorios de flora acompañante.

7. RECOMENDACIONES

- Incluir el aislamiento de Campylobacter sp. en las pruebas bacteriológicas de rutina en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la CMVZ - UNL.

- Implementar el método de Filtración en Agar TCBS utilizando membrana de Nitrocelulosa para el aislamiento de *Campylobacter sp*, ya que evita la utilización de medios de cultivo y suplementos especiales.

- A los Médicos Veterinarios que atienden clínica de especies menores, se recomienda consideren al Campylobacter sp. como causante de diarrea en las mascotas.

- Desparasitar e inmunizar a sus mascotas contra enfermedades especialmente parvovirus y coronavirus ya que estas pueden favorecer a la infección por Campylobacter sp.

- Proporcionarle a su mascota un buen manejo y cuidado adecuado diario, ya que muchos de los casos que presentaron la enfermedad carecen de estos, especialmente en la alimentación.

- Considerar las medidas de bioseguridad adecuadas con el manejo de mascotas por parte de sus dueños.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ALVARADO Carlos. Búsqueda de actividad contra campylobacter en cinco puntos de uso popular guatemalteco. 2007, p 6.

- BACTERIOLOGÍA DE MICROBIOLOGÍA E IMMUNOLOGÍA (en línea). Consultado 4 Ene. 2011. Disponible en: http://www.bacteriologia.com.

- BLASER. Campylobacter Jejuni y especies afines. 2000, p 70-71.

- CAMPYLOBACTERIOSIS. 2005 (en línea). Consultado 4 Ene. 2011. Disponible en http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/campylobacter_g_sp.htm.

- ETTINGER Y FELDMAN. Tratado de medicina interna veterinaria. Enfermedades del perro y el gato. Trad. Rubén Angel Taibo. 5 ed. Buenos Aires, AR. 2002. p. 432-433, 1351, 1382.

- FADDIN. Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias. 1985, p 102.

- FROST. Actuales problemas epidemiológicos en la campilobacteriosis humana. Volumen 90. 2001, p 85 – 95.

- HARRISON. Principio de la medicina interna. 17ª edición. 2000, cap 148.

- INCAP (Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá): Comparación de la resistencia antimicrobiana de *Campylobacter jejuni* aislado en 1986-1989 con *Campylobacter jejuni* aislado entre 2000-2003. (en línea). Consultado 6 Ene. 2011. Disponible en: http://www.incap.org.gt/coope/diag.pdf+hospital+general+campylobacter+guatemala&hl=es&gl=gt&ct=clnk&cd

- JAWETZ, MELINICK Y ADELBERG. Microbiología médica 19ª edición. 2007, p 287-289.

- MALBRAN Carlos. Manual de procedimientos Campylobacter. 2001, p 4-13.

- MENDEZ Y COLS. Campylobacter. 1994, p 69. (en línea). Consultado 17 de Ene. 2011. Disponible en: http://www.bvsops.org.uy/pdf/campylobacter.pdf.

- MERCK. Manual de medios de cultivo. 1994, p 148-152.

- MORALES Otto, Diagnóstico de Campylobacter jejuni en cerdos de abasto a faenarse en el rastro CECARSA a través de cultivos de hisopados rectales. 2004. p. 13-14. (en línea). Consultado 15 Ene 2011. Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/10/10_0943.pdf.

- MORGAN, Rhea. Clínica de Pequeños animales.1999, 3 ed.

- MURRAY. Medical Microbiology. St. Louis, Missouri, US, The C.V. Mosby Company. 1990, p 132

- SAENZ Sandra. Determinación de la presencia de campylobacter spp, en perros de la ciudad de Guatemala. 2007, p 3-20.

9. ANEXOS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PROYECTO DE TESIS: DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *CAMPYLOBACTER SP.* EN PERROS CON SINTOMATOLOGÍA CLINICA DE DIARREA EN LAS CLINICAS VETERINARIAS DE LA CIUDAD DE LOJA

HOJA CLÍNICA Nº

I. REFERENCIAS:

FECHA:…….....
NOMBRE DEL TESISTA:……
NOMBRE DEL PROPIETARIO:……

II. IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE:

Nombre:…… Especie:……. Edad:……..
Sexo:…….. Raza:…….

III. ANAMNESISI:

……
……
……..

Desparasitado ( ) **Vacunado ( )**

IV. EXAMEN FÍSICO GENERAL:

1. Constantes Fisiológicas:

- Temperatura:…….
- Frecuencia Respiratoria:……..
- Frecuencia Cardiaca:……

2. Otros

Síntomas:……

V. PRESUNCIÓN DIAGNÓSTICA CLÍNICA:

……

……..

VI. EXAMEN DE LABORATORIO:

Examen de Heces Fecales……

VII. RESULTADOS DE LABORATORIO:

…….....

f…… **f…….**

DIRECTORA DE TESIS **TESISTA**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

AREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TESIS: ‘‘DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE CAMPYLOBACTER SP. EN PERROS CON SINTOMATOLOGÍA CLÍNICA DE DIARREA EN LAS CLINICAS VETERINARIAS DE LA CIUDAD DE LOJA Y EL HOSPITAL DOCENTE VETERINARIO DE LA UNL.’’

FOTOS DE LA REALIZACIÓN DE LA TESIS

Foto 1 y 2.- Material utilizado en laboratorio para el diagnostico de Campylobacter.

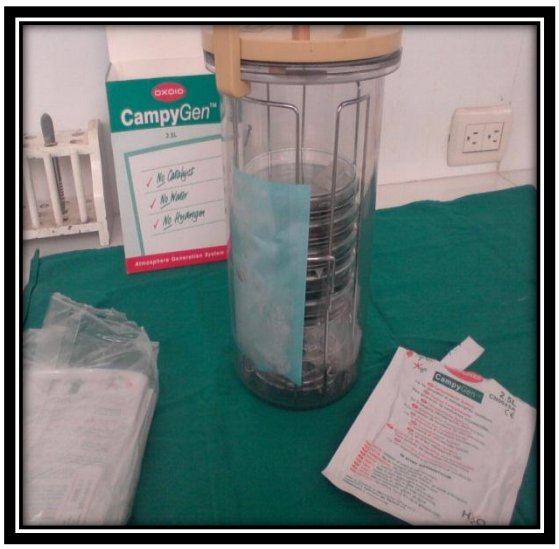


Foto 3 y 4.- Agar TCBC listo para incubar, pruebas TSI y SIM

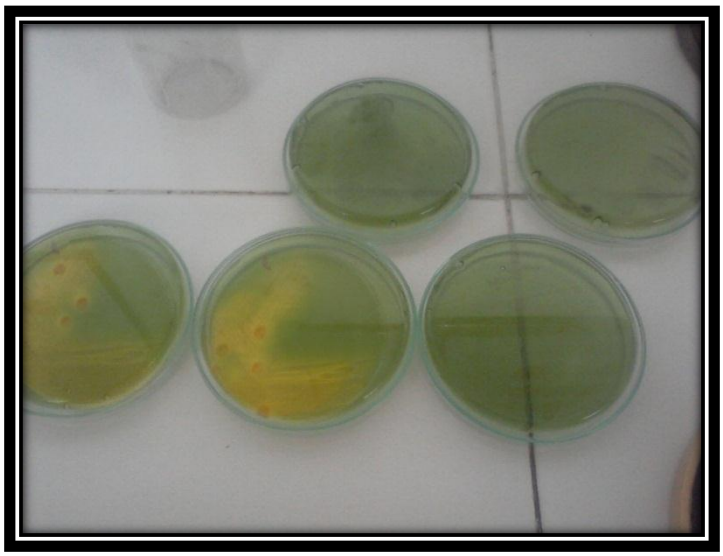


Foto 5.- Cultivo de Campylobacter sp, Positivo y Negativo

Foto 6 y 7.- Placas teñidas con Coloración de Gram y Observación de las Placas en el Microscopio

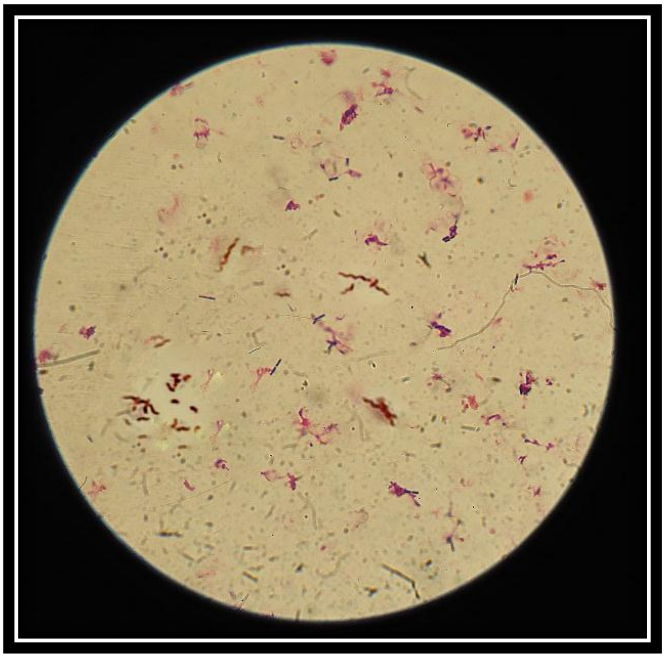


Foto 8.- Imágenes de la bacteria de Campylobacter observadas en el microscopio

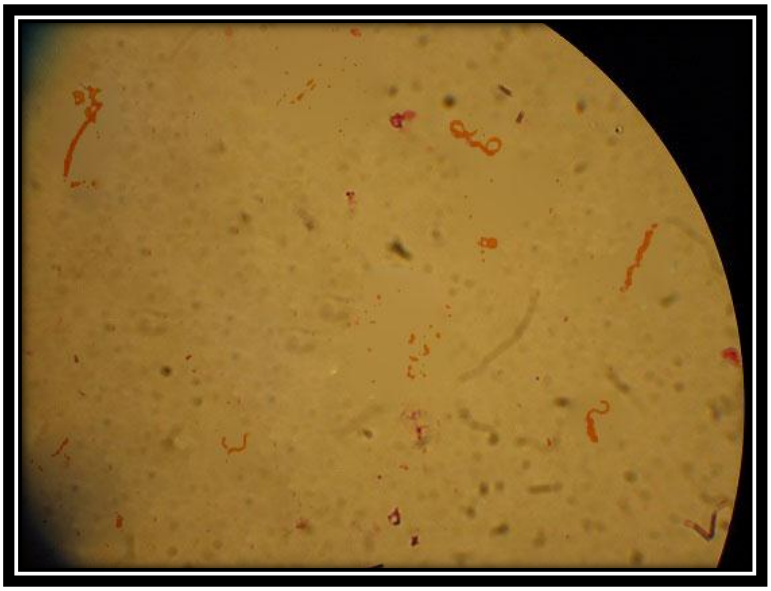
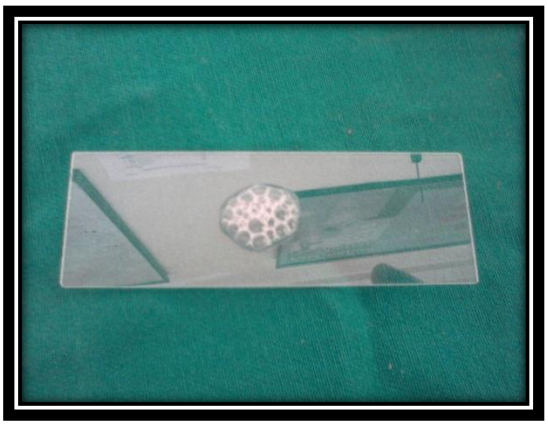


Foto 9.- Campylobacter sp, en forma de espiral y ala de gaviota



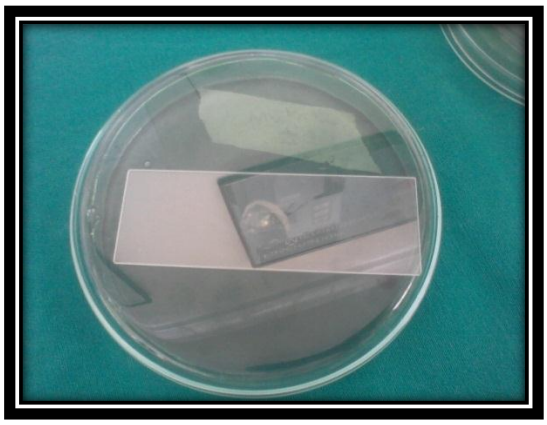
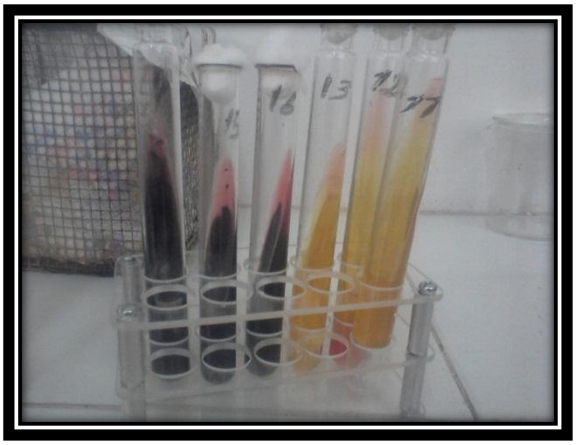
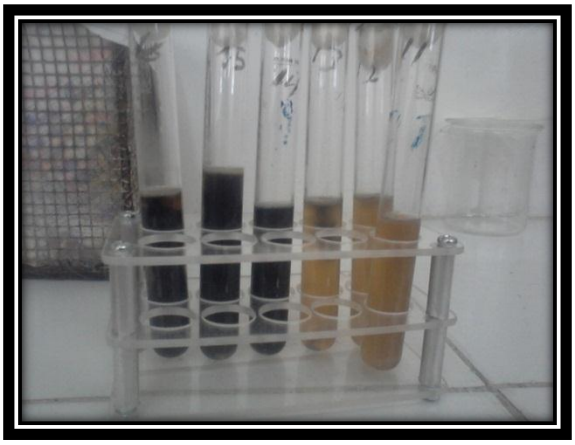


Foto 10 y 11.- Prueba de Catalasa positiva y negativa





Fotos 12 y 13.- Pruebas TSI y SIM Positivas y Negativas