

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA

“Diagnóstico de *Campylobacter jejuni* en cerdos de abasto a faenarse en el rastro CECARSA a través de cultivos de hisopados rectales”

OTTO DAVID MORALES GUTIÉRREZ

Guatemala, noviembre de 2004

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA

**Diagnóstico de *Campylobacter jejuni* en cerdos de abasto a faenarse en
el rastro CECARSA a través de cultivos de hisopados rectales.**

TESIS

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

POR

OTTO DAVID MORALES GUTIÉRREZ

Al conferírsele el Título Académico de

MÉDICO VETERINARIO

Guatemala, noviembre de 2004

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANO:	Dr. M.V. MARIO LLERENA
SECRETARIA:	Dra. M.V. BEATRIZ SANTIZO
VOCAL PRIMERO:	Dr. M.V. YERI VÉLIZ
VOCAL SEGUNDO:	Dr. M.V. FREDY GONZALEZ
VOCAL TERCERO:	Dr. M.V. EDGAR BAILEY
VOCAL CUARTO:	Br. ESTUARDO RUANO
VOCAL QUINTO:	Br. DANIEL BARRIOS

ASESORES:

Dra. M.V. Julia Virginia Bolaños de Corzo
Dra. M.V. Wilson Valdez Melgar
Dr. M.V. Gustavo Enrique Taracena Gil

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

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

Diagnóstico de *Campylobacter jejuni* en cerdos de abasto a faenarse en el rastro CECARSA a través de cultivos de hisopados rectales.

Como requisito previo a optar al título profesional de:

MÉDICO VETERINARIO

TESIS QUE DEDICO

A Dios, por estar en todo momento a pesar de que uno se olvida de él.

A mi esposa Ana Lucía y mi hijo Sebastián, por ser la motivación principal para llegar hasta aquí.

A mis padres, Otoniel y Leticia, por el apoyo incondicional que me han brindado durante toda la vida.

A mis hermanas Carla y Sandra, por acompañarme desde el principio.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de San Carlos de Guatemala.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

A mis asesores: Dra. M.V. Virginia de Corzo, Dr. M.V. Gustavo Taracena y Dr. M.V. Wilson Valdez, sumamente agradecido.

A mis familias: Morales, Gutiérrez y Mazariegos Girón.

A mis amigos, compañeros y profesores, con quienes comparto este logro.

Al personal del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por toda la ayuda prestada.

Al personal del rastro CECARSA, por su apoyo y permitirme realizar este trabajo.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS	2
III. OBJETIVOS	3
3.1. General	3
3.2. Específicos	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1. Enteritis por <i>Campylobacter jejuni</i>	4
4.1.1. Sinónimos	4
4.1.2. Historia	4
4.1.3. Etiología	5
4.1.4. Distribución Geográfica	6
4.1.5. Ocurrencia en el hombre	6
4.1.6. Ocurrencia en los animales	7
4.1.7. La enfermedad en el hombre	7
4.1.8. La enfermedad en los animales	8
4.1.8.1. <i>Bovinos</i>	8
4.1.8.2. <i>Ovinos</i>	9
4.1.8.3. <i>Perros y gatos</i>	9
4.1.8.4. <i>Aves</i>	9
4.1.8.5. <i>Porcinos</i>	10
4.1.8.5.1 <i>Papel que juega el cerdo en la enfermedad</i>	10
4.1.9. Fuente de Infección y modo de transmisión	10
4.1.10. Control	11
4.1.11. Diagnóstico	12
4.1.11.1. <i>Diagnóstico de laboratorio</i>	12
4.1.11.2. <i>Muestras</i>	13
4.1.11.3. <i>Examen microscópico directo</i>	13
4.1.11.4. <i>Cultivo en medios selectivos</i>	13
4.1.11.5. <i>Examen de las placas</i>	14
4.1.11.6. <i>Identificación Presuntiva</i>	14
4.1.11.7. <i>Identificación Final</i>	15
4.1.11.8 <i>Comparación de pruebas de identificación de especies del género campylobacter</i>	18

V. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1. Materiales	19
5.1.1. Recursos Humanos	19
5.1.2. Equipo de laboratorio	19
5.1.3. Recursos Biológicos	20
5.1.4. Medios y soluciones	20
5.1.5. Recursos Físicos	20
5.1.6. Centros de Referencia	20
5.2. Metodología	21
5.2.1. Universo	21
5.2.2. Diseño de Estudio	21
5.2.3. Obtención y toma de muestras	21
5.2.4. Preparación del agar selectivo Skirrow en el laboratorio	21
5.2.5. Procesamiento de la muestra en el laboratorio	22
5.2.6. Interpretación de la lectura	22
5.2.7 Pruebas Complementarias	22
5.2.8. Análisis estadístico	24
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
VII. CONCLUSIONES	27
VIII. RECOMENDACIONES	28
IX. RESUMEN	29
X. BIBLIOGRAFÍA	31
XI. ANEXOS	33
Cuadro No. 1: Resultados obtenidos de las siembras de las muestras en agar selectivo para <i>Campylobacter jejuni</i>	34
Cuadro No. 2: Resultados de las pruebas complementarias realizadas a las muestras con crecimiento característico	35

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades resultantes del consumo de alimentos contaminados han sido un problema básico para el hombre desde el comienzo. La identificación y corrección de los problemas surgidos de las enfermedades de origen alimentario presentan muchas situaciones difíciles para la salud pública al momento de descargar responsabilidades.

Las diarreas infecciosas de origen alimentario continúan siendo un gran problema en los países en vías de desarrollo ocupando estadísticas alarmantes, especialmente en niños de corta edad. Hasta hace poco tiempo sólo era posible conocer su etiología en un porcentaje de casos relativamente bajo. Sin embargo desde hace algunos años, con la aplicación de nuevas metodologías, se ha podido incluir dentro del espectro de agentes microbianos a nuevos enteropatógenos.

Campylobacter jejuni es uno de los agentes etiológicos que ha tomado mayor importancia en los últimos años, es la principal causa de diarreas alimentarias de origen bacteriano en Estados Unidos y Europa. En los países tercermundistas se considera que puede ser una de las principales causas de diarrea en niños y personas de edad avanzada; pudiendo provocar incluso la muerte.

Los animales domésticos en su mayoría se consideran portadores sanos de esta entidad patológica. En nuestro país no se ha realizado ningún estudio que confirme la positividad de los animales a esta bacteria, siendo importante ya que de confirmarse su presencia, deben tomarse medidas necesarias para prevenir la contaminación. Por lo anteriormente expuesto se justifica el presente trabajo, iniciando el primer estudio de este patógeno con la especie porcina realizando el diagnóstico a través de cultivos de hisopados rectales sembrados en un medio selectivo para *Campylobacter jejuni*.

II. HIPÓTESIS

Los cerdos de abasto que llegan al rastro CECARSA se encuentran positivos a *Campylobacter jejuni*.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General:

Realizar el primer estudio para determinar la presencia de *Campylobacter jejuni* en cerdos en Guatemala.

3.2 Objetivo Específico:

Determinar la presencia de *Campylobacter jejuni* en cerdos a faenarse en el rastro CECARSA a través de cultivos de hisopados rectales.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Enteritis por *Campylobacter jejuni*

4.1.1 Sinónimos

Enteritis vibriónica, Campylobacteriosis (2,3)

4.1.2 Historia

Las primeras observaciones de bacterias semejantes a *Campylobacter* fueron realizadas por Escherich en 1886 a partir de materia fecal de niños y de gatos con diarrea. Aunque no pudo realizar los aislamientos, Escherich denominó *Vibrio felinus* a las bacterias observadas sólo microscópicamente. Los primeros aislamientos de especies del género *Campylobacter* fueron realizados en el área de la microbiología veterinaria en 1909 y 1913.(2)

Mac Fadyean y Stockmann y posteriormente Smith en 1918 establecieron la participación de una bacteria microaerófila en el aborto del ganado bovino y ovino, de morfología similar a las especies del género *Vibrio*, por lo que se la denominó *Vibrio fetus*.(3)

En 1931, Jones y Little aislaron a partir de bovinos con disturbios intestinales un vibrión microaerófilo al que denominaron *Vibrio jejuni*.(2,3)

En 1944, Doyle describió un vibrión aislado del intestino de cerdos con diarrea y lo denominó *Vibrio coli*.(2)

La primera asociación entre estas bacterias curvas y diarrea en el hombre fue sugerida por Levy en 1946, el que realizó un estudio en un brote de gastroenteritis sobre 357 pacientes en dos establecimientos penales en Illinois, observando en

exámenes directos la presencia de formas bacterianas semejantes a *Vibrio* en el 20% de las muestras.(3)

En 1957, E. King, estudiando las características de estos vibrios aislados de diferentes fuentes, estableció que no todos correspondían a *Vibrio fetus*, determinando dos grupos con características serológicas y bioquímicas diferentes. Mientras algunos eran capaces de crecer a 25 y 37°C, otros lo hacían a 42°C. A estos últimos se los consideró como Vibrios relacionados, sugiriendo que eran agentes de diarrea aguda.(2,3)

En 1963, Sébald y Veron proponen la creación del género *Campylobacter* para incluir estas bacterias.

En la década del 70, Butzler y Skirrow, Bolton y Robertson, Blazer y Col, desarrollaron medios selectivos que permitieron aislar estos microorganismos con relativa facilidad y establecer su participación en diferentes cuadros infecciosos en el hombre.(2)

En 1972 Dekeyser y Butzlerl 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, pero retenía microorganismos fecales más grandes. Esa técnica se utiliza actualmente para el aislamiento de otras especies del género, diferentes de *C. jejuni* subsp. *jejuni* o *C. coli* como son, por ejemplo, *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis* y *C. jejuni* subsp. *doylei*.(2)

4.1.3 Etiología

La campilobacteriosis es una enfermedad infecciosa ocasionada por el *Campylobacter jejuni*. Es un bacilo Gram negativo curvo, espirilado o en forma de "S" que presenta un flágeno 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*.

Es una especie termófila ya que crece a 42-43°C pero no a 25°C.

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.(2,3,8,12)

4.1.4 Distribución Geográfica

La campylobacteriosis es una zoonosis de distribución mundial.(2,3,8,9)

4.1.5 Ocurrencia en el hombre

El Campylobacter jejuni es la causa bacteriana más común de la enfermedad diarreica en los Estados Unidos y países industrializados. Prácticamente todos los casos ocurren en eventos aislados y esporádicos, no como parte de brotes grandes. La vigilancia activa por medio de un sistema de vigilancia especial denominado FoodNet indica que alrededor de 15 casos por cada 100,000 personas en la población, son diagnosticados cada año. Mucho más casos pasan sin diagnosticar o sin notificar. Se estima que la campylobacteriosis afecta a más de 1

millón de personas cada año, o 0,5% de la población. La campilobacteriosis ocurre mucho más frecuentemente en los meses de verano que en el invierno. El organismo se aísla de lactantes y jóvenes adultos con más frecuencia que en otros grupos de edades y de los varones con más frecuencia que de las mujeres. Aunque *el Campylobacter* no causa por lo común la muerte, se ha estimado que 500 personas con infecciones de *Campylobacter* pueden morir cada año. En Europa y otros países industrializados también es el primer agente de diarrea.

En países en vías de desarrollo es el segundo o tercer agente de diarrea, según sea el lugar geográfico. La enfermedad parece ser más frecuente en estos países en niños de corta edad y personas de edad avanzada.

Esta bacteria es causa importante de diarreas agudas en viajeros que visitan zonas en vías de desarrollo.(3,9,11)

4.1.6 Ocurrencia en los animales

Los animales y aves domésticas y silvestres constituyen el gran reservorio de *C. jejuni* pero es difícil incriminar a este agente como causa de enfermedad diarreica ya que se encuentra una tasa alta de infección en animales clínicamente sanos.(2,5)

4.1.7 La enfermedad en el hombre

La mayoría de las personas que enferman de campilobacteriosis contraen diarrea, calambres, dolor abdominal y fiebre dentro de 1 a 10 días después de la exposición al organismo con una media de 2 a 5 días. La diarrea puede ser sanguinolenta y puede ir acompañada de náusea y de vómitos. La enfermedad dura típicamente una semana. Algunas personas que son infectadas con *Campylobacter jejuni* no tienen ningún síntoma. En las personas con sistemas

inmunológicos comprometidos, el *Campylobacter jejuni* se propaga ocasionalmente a la corriente sanguínea y ocasiona una grave infección que pone en peligro la vida.

La mayoría de las personas que adquieren campilobacteriosis se recuperan completamente dentro de 2 a 5 días, aunque algunas veces la recuperación puede llevar hasta 10 días. En raras ocasiones, pueden resultar de la infección con *Campylobacter jejuni* algunas consecuencias a largo plazo. Algunas personas pueden tener artritis como consecuencia de la campilobacteriosis; otras pueden adquirir una enfermedad rara que afecta a los nervios del cuerpo a partir de varias semanas después de la enfermedad diarreica. Esta enfermedad, llamada síndrome de Guillain-Barré, ocurre cuando el sistema inmunológico de la persona recibe "instrucciones" de que ataque a los nervios propios del cuerpo y puede conducir a parálisis que dura varias semanas y de ordinario requiere atención intensiva. Se estima que aproximadamente 1 de cada 1,000 casos notificados de campilobacteriosis conducen al síndrome de Guillain-Barré. Hasta 40% de los casos de síndrome de Guillain-Barré en los Estados Unidos pueden haber sido desencadenados por la campilobacteriosis. (8,9,11)

4.1.8 La enfermedad en los animales

Los animales mamíferos y las aves domésticas y silvestres constituyen el gran reservorio de *C. jejuni* pero, muchas veces, es difícil incriminar a este agente como causa de enfermedad diarreica en ellos ya que se encuentra una alta tasa de infección en animales clínicamente sanos. (2,,3,5)

4.1.8.1 Bovinos

En terneros causa una enteritis clínicamente similar a la del hombre. Las terneras presentan fiebre moderada, y diarrea que puede durar hasta 14 días. También es

posible que este agente pueda causar mastitis en las vacas, como lo demostraría en forma indirecta el hecho de que el hombre puede contraer la enfermedad por el consumo de leche no pasteurizada. Además, la inoculación experimental de un muy pequeño número de bacterias en la ubre provoca una mastitis aguda.(2,5)

4.1.8.2 Ovinos

C. jejuni es una importante causa de abortos en los ovinos. En la proporción de brotes se le atribuye un papel similar al de *C. fetus subsp. fetus* . Las ovejas abortan en el último tercio de la gestación o dan nacimiento a corderitos muertos o débiles que pueden morir a los pocos días. La infección también origina metritis o placentitis que pueden llevar a septicemia y muerte de las madres. Es bastante común una pérdida del 10 al 20% de los corderos. (2,3,5)

4.1.8.3 Perros y gatos

Cachorros con diarrea han constituido la fuente de infección de sus dueños. La diarrea es el síntoma predominante y el vómito parece frecuente. La enteritis en gatos por *C. jejuni* es rara.(7)

4.1.8.4 Aves

Las aves constituyen un importante reservorio de *C. jejuni*. Si bien en pollitos de tres días se pudo provocar diarrea con *C. jejuni* administrado por vía oral, no se sabe si la enfermedad ocurre naturalmente, ya que una alta proporción de aves sanas contienen la bacteria en su intestino.(2,11)

4.1.8.5 Porcinos

El cerdo constituye un reservorio para *C. jejuni* pero éste no se considera un agente etiológico de importancia en las causas de enteritis en esta especie.(2,5)

4.1.8.5.1 Papel que juega el cerdo en la enfermedad

El cerdo es un reservorio de *C. jejuni*, pero es difícil incriminar a este agente como causa de enfermedad diarreica en esta especie doméstica, ya que según estudios realizados en Europa se encuentra una tasa alta de infección en animales clínicamente sanos, es decir, animales sin ningún síntoma aparente; estos estudios se han realizado a través de muestras de heces a nivel rectal transportándose éstas en un medio de transporte adecuado, aislándose la bacteria en el laboratorio. La carne puede contaminarse durante su manejo, normalmente en el momento de la matanza y una canal puede constituirse en foco de diseminación al contacto con otras canales.

El consumo de la carne de cerdo está aumentando a nivel mundial y en nuestro medio la demanda está mejorando sustancialmente. Es entonces el cerdo, un importante eslabón en la cadena de transmisión de este agente infeccioso, la cual como ya vimos puede desencadenar en un problema para el hombre, por lo cual es importante tomar las medidas necesarias para evitar que el problema se agrave.(2,3,5)

4.1.9 Fuente de infección y modo de transmisión

Los mamíferos y las aves tanto silvestres como domésticos constituyen el principal reservorio de *C. jejuni*.

La campilobacteriosis ocurre de ordinario en casos únicos y esporádicos, pero también puede ocurrir en brotes, cuando un número de personas enferman todas a la vez. La mayoría de los casos de campilobacteriosis están asociados con la

manipulación de carne cruda o la ingestión de carne cruda o no cocinada suficientemente. Un número muy pequeño de organismos *C. jejuni* (menos de 500) pueden ocasionar la enfermedad en los seres humanos. Incluso una gota de jugo de carne de pollo cruda puede infectar a una persona. Una forma de infectarse ocurre a través de contaminación cruzada al prepararse los alimentos. El organismo *Campylobacter* procedente de la carne cruda puede propagarse a los otros alimentos. El organismo no se propaga por lo general de una persona a otra, pero esto puede ocurrir si la persona infectada es un niño pequeño o está produciendo un gran volumen de diarrea. Los brotes más grandes debidos al *Campylobacter* no están asociados de ordinario con carne cruda sino que usualmente están relacionados con el consumo de leche no pasteurizada o agua contaminada. Los animales también pueden infectarse y algunas personas han adquirido su infección de contacto con las heces infectadas de un perro o gato enfermo.(2,3,4,8)

4.1.10 Control

De acuerdo con el conocimiento actual de la epidemiología de la enfermedad solo se pueden tomar medidas preventivas en forma parcial. En un estudio sobre los factores de riesgo en Colorado, Estados Unidos, en donde ocurrieron casos esporádicos de infección por *C. jejuni*, se estimó que cerca de un tercio de los casos se hubieran podido prevenir por medidas tales como evitar el consumo de agua no tratada, de leche no pasteurizada o de carne insuficientemente cocida. Las medidas de higiene personal como lavarse las manos se deben tomar en consideración al estar en contacto con gatos o perro con diarrea, así como también en la cocina al manipular alimentos crudos.(1)

4.1.11 Diagnóstico

En el estado inicial de la enfermedad es posible aislar el agente de la sangre y luego de las heces. El diagnóstico clínico es difícil debido a que los síntomas son similares a la diversidad de patologías entéricas. (2,7,10)

4.1.11.1 Diagnóstico de laboratorio

Puede realizarse el diagnóstico por la demostración del microorganismo en examen directo o a través del cultivo.

El uso de los métodos serológicos para el diagnóstico tiene valor para la investigación epidemiológica, ya que en países subdesarrollados los títulos en la población suelen ser altos. El examen en fresco de muestras fecales diarreicas utilizando microscopía de contraste de fase o de campo oscuro, dentro de las 2 primeras horas de evacuación, puede permitir un diagnóstico presuntivo rápido. Se observa la forma y la típica motilidad con giros sobre su propio eje característico de *Campylobacter* y en la mayoría de los casos se puede observar también eritrocitos y leucocitos fecales.

Para cultivo y aislamiento a partir de materia fecal se requiere de una atmósfera microaerófila, medios de cultivo selectivos para inhibir la flora acompañante, temperatura óptima de desarrollo (42-43°C), aunque pueden desarrollar a 37°C, pH óptimo de crecimiento cercano al neutro (6.5 – 6.9).

A partir de alimentos congelados, o de muestra de materia fecal de pacientes con tratamiento antibiótico previo, es necesario hacer un pasaje reconstituyente de la estructura celular, de por lo menos 6 hora a 37°C, por un medio en base a Caldo Brucella, succinato de sodio al 0.3%, cisteína al 0.01% y cuidando de utilizar una mezcla antibiótica que no contenga antimicrobianos que ejerzan un efecto inhibitor sobre las células dañadas como es el caso de la polimixina y de la rifampicina. Para las células dañadas por calor, no hace falta realizar este pasaje.

Para aislar de agua es necesario filtrar un gran volumen, centrifugar y sembrar. También para cuerpos de agua con corriente, se puede utilizar la tórula de Moore,

la que consiste en un rollo de gasa que se deja en el agua por 18 a 24 horas y luego se siembra en un caldo de enriquecimiento para posterior traspaso a medio sólido.(2,3,10)

4.1.11.2 Muestras

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 en algunos días la sobrevivencia del microorganismo.

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%.(2,3)

4.1.11.3 Examen Microscópico Directo

Las muestras de materia fecal pueden ser examinadas a través de una tinción de Gram utilizando carbolfucsina como colorante de contraste, o por tinción simple con azul de metileno para identificar leucocitos y formas bacilares curvas. La observación en microscopio de contraste de fase o de campo oscuro de bacilos curvos y/o espirilados con gran motilidad en forma circular o de sacacorchos permite un diagnóstico presuntivo rápido cuyo valor predictivo sobrepasa el 85%. La bacteria es Gram negativa.(2,8,10)

4.1.11.4 Cultivo en medios selectivos

Las placas de medios selectivos (agar Skirrow, Virion, Blazer, etc.) se siembran en forma directa con hisopo o con 2-3 gotas de deposiciones acuosas o de una suspensión de ellas y se disemina por estrías. Se incuban en una atmósfera microaerófila que tenga 5 – 10% de oxígeno y 3 a 10% de dióxido de carbono a 42 a 43°C por 24 a 48 horas.

Dado que en una diarrea el número de *Campylobacter* es alto, no es necesario realizar enriquecimiento. Se recomienda utilizar medios de enriquecimiento sólo en caso de esperar un bajo número de microorganismos.(3,9)

4.1.11.5 Examen de las Placas

Para las especies termófilas, el tiempo de incubación ideal es de 48 horas, aunque si el caso lo requiere, se pueden examinar a las 18-24 horas.

Las colonias sospechosas pueden observarse planas, no hemolíticas de aspecto acuoso, grisáceas, con bordes irregulares y con tendencia a diseminarse por la estría de inoculación. Muchas veces se pueden ver incoloras. (2,3,9)

4.1.11.6 Identificación Presuntiva

- *Tinción de Gram:* debido a que este microorganismo no se tiñe bien con safranina se recomienda el uso de carbolfucsina (fucsina fenicada) al 0.8% como coloración de contraste. Teniendo en cuenta la morfología característica, es posible realizar sólo una coloración simple con este colorante.
- *Prueba de Catalasa:* Se debe colocar sobre un portaobjetos limpio una colonia de un cultivo fresco, agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 3%. Una reacción positiva se evidencia por la formación de burbujas producto de la liberación de oxígeno a partir de la reducción del peróxido de hidrógeno.
- *Prueba de Oxidasa:* se debe utilizar un buen inóculo que se coloca en un tubo de hemólisis conteniendo 0.2 ml de agua destilada a la que se le introduce un disco impregnado en la solución de oxalato de p-aminodimetilamina. La enzima, citocromo oxidasa es convertida a su forma activa por la transferencia de electrones al oxígeno molecular. En presencia de oxígeno molecular un gran número de electrones pueden ser transferidos por el sistema citocromo oxidasa a una cantidad de compuestos orgánicos,

entre ellos a la p-aminodimetilamina. Una reacción positiva se evidencia por el desarrollo de color rojo.

- La prueba se realiza también con un papel filtro impregnado en la solución reactiva, la que se pone en contacto con una asada del cultivo. La aparición de un color violeta al cabo de aproximadamente 2 minutos indica reacción positiva.
- *Prueba de Motilidad:* se realiza por microscopía de contraste de fase o campo oscuro se observa microorganismos espirilados o con forma de S con movimientos en espiral o en tirabuzón.

4.1.11.7 Identificación Final

- *Crecimiento a 42-43°C:* suspender al microorganismo en solución fisiológica estéril hasta una densidad óptica del # 1 de la escala de Mac Farland. Sembrar 0.5 ml de la suspensión dos tubos con caldo brucella, incubar uno a 42-43°C y el otro a 25°C. Controlar a las 48 horas si hubo o no desarrollo. Se puede usar también placas de agar sangre o con medios selectivos para *Campylobacter*.
- *Sensibilidad al ácido nalidíxico y cefalotina:* la suspensión anterior (1 en la escala de Mac Farland) se siembra con hisopo sobre la superficie de una placa de agar sangre, agar para antibiograma u otro medio de para *Campylobacter*, colocar un disco de ácido nalidíxico de 30 ug y un disco de cefalotina de 30 ug. Se incuba 48 horas y se observa si hay halo de inhibición o no de manera de determinar si la cepa es sensible a los antimicrobianos estudiados.
- *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 μ l de una solución de hipurato de sodio al 1%. Luego de incubar a 37°C durante 2 horas, se le agrega 200 μ l de ninhidrina al 3.5% en acetona-butanol 1:1 por la pared del tubo y se deja en reposo a 37°C observándolo a los 10 minutos. La aparición de una coloración azul-violeta indica una reacción positiva que revela la presencia de glicina, producto final de la hidrólisis del hipurato. Producción de ácido sulfhídrico: se determina depositando una asada grande en el centro de la columna del tubo del medio para SH2 (medio de Lior). Los tubos se incuban en baño María a 37°C por 2 horas. La aparición de una coloración negra alrededor del inóculo indica una reacción positiva. La reacción se basa en la liberación de ácido sulfhídrico por la acción de la enzima cisterna desulfhidrasa sobre los aminoácidos que contienen azufre. Se pone en evidencia por indicadores como sulfato ferroso, tiosulfato de sodio, etc. En caso de dudas, la incubación puede prolongarse a temperatura ambiente o a 37°C. Una alternativa consiste en usar medio de cultivo TSI o Kligler incubando en microaerofilia.

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

- *Crecimiento en CINA al 3.5%:* sembrar 0.1 ml de suspensión de una cepa 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 microaerofilia. Observar si se forma una delgada línea de desarrollo por debajo de la superficie.

- *Hidrólisis de indoxil acetato*: Esta prueba se basa en la hidrólisis del indoxil acetato por medio de esterasas bacterianas, las que actúan sobre el sustrato produciendo liberación de indol. Se preparan discos de indoxil acetato por adición de 50 μ l de una solución al 10% (p/v) de acetona a discos Standard y dejando secar al aire. Luego se deben guardar a 4 °C en envase con desecante (sílicagel) y al abrigo de la luz. En estas condiciones duran 1 año. La técnica se puede realizar de dos formas: Se adiciona una o varias colonias del microorganismo sobre un disco y se agrega una gota de agua. Si se produce la hidrólisis aparece un color azul entre 10 y 15 minutos después. El otro método consiste en suspender una o varias colonias en 0.3 ml de agua destilada estéril y luego agregar el disco. La lectura se realiza igual que en el punto anterior.

- *Hidrólisis de 2,3,5 cloruroo trifeniltetrazolium*: esta prueba se utiliza como complementaria cuando hay dudas con la prueba de hidrólisis del hipurato para diferenciar *C. jejuni* de *C. coli*. Se deben cortar tiras de papel de filtro de 7 por 1 cm embebidas en una solución de la sal de tetrazolium en agua destilada al 4% (p/v).(3)

4.1.11.8 Comparación de pruebas de identificación de especies del género *Campylobacter*

PRUEBA	<i>C. fetus</i>	<i>C. hyointestinalis</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. concisus</i>
Catalasa	+	+	+	+	+	-
Reducción NO ₃	+	+	+	+	+	+
H ₂ S	-	+	+/-	-	+	+
Requerimiento H ₂	-	-	-	-	-	+
Hidrólisis de hipurato	-	-	+	-	-	-
Hidrólisis de indoxilacetato	-	-	+	+	-	-
Crecimiento a:						
25°C	+	+	-	-	-	-
30°C	+	+	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+	+
42°C	-		+	+	+	

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales:

5.1.1. Recursos Humanos:

- Estudiante Investigador
- Asesores del estudio

5.1.2. Equipo de Laboratorio:

- Refrigeradora
- Incubadora
- Autoclave
- Balanza
- Cajas de Petri
- Frascos de vidrio
- Mechero de Bunsen
- Asas para siembras bacteriológicas de punta circular
- Hielera
- Marcador para vidrio
- Hisopos
- Campana de flujo laminar
- Jarra para anaerobios

5.1.3. Recursos Biológicos:

60 muestras de heces de cerdos, obtenidas mediante hisopados rectales.

5.1.4. Medios y soluciones:

- Placas con agar Skirrow
- Tubos con medio de transporte

5.1.5. Recursos Físicos:

- Equipo de oficina (computadora, papel bond, impresora, diskettes, etc)
- Vehículo propio
- Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala

5.1.6. Centros de Referencia:

- Laboratorios Merck, S.A.
- Biblioteca de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

5.2 Metodología:

5.2.1 Universo:

60 cerdos a faenarse en el rastro CECARSA ubicado en la 8 Av. 20-00 Zona 17, ciudad de Guatemala.

5.2.2 Diseño de Estudio:

Se realizaron tres muestreos al azar con intervalos de 15 días entre cada uno. Las muestras se tomaron de los distintos grupos de cerdos que llegaron al rastro para ser faenados en el transcurso del día.

Diariamente se faenan un promedio 170 cerdos en el rastro CECARSA. De los cuales se muestreo el 12% de animales, recolectando por lo tanto 20 muestras por día, para un total de 60 animales muestreados.

5.2.3 Obtención y toma de muestras

Cada muestra consistió en un hisopado rectal realizado después del degollamiento del cerdo, el cual se colocó en un tubo estéril con un medio de transporte debidamente identificado, trasladándose en hielera al laboratorio para su posterior procesamiento.

5.2.4 Preparación del agar selectivo Skirrow en el laboratorio

- Disolver 40 g/litro, esterilizar en autoclave (15 min. a 121°C), dejar enfriar a 40-50°C, incorporar 50 a 70 ml de sangre desfibrinada y un frasco de "suplemento

selectivo" por cada 200 ml de medio de cultivo y verter en placas. pH: 7,3 más menos 0,1.

- El medio de cultivo preparado es, antes de la adición de la sangre, claro y de color amarillento y posteriormente del color de la misma y no hemolizado.

5.2.5 Procesamiento de la muestra en el laboratorio

- Se sembraron las placas de medio de cultivo por estrías utilizando la materia fecal obtenida como muestra a través de los hisopos.

- Incubándose a 42°C durante 48 horas bajo condiciones de microaerofilia en una jarra para este fin.

- Luego del tiempo de incubación se realizó la lectura de las placas.

5.2.6 Interpretación de la lectura

La morfología característica de la colonia de *Campylobacter jejuni* es de un color grisáceo, de apariencia plana y con tendencia a invadir por la estría de inoculación. Con estas características de crecimiento observadas en una placa sembrada se puede dar por presuntivo el diagnóstico de *Campylobacter jejuni* en la muestra.

5.2.7 Pruebas complementarias

A las muestras que tuvieron crecimiento característico se les realizaron las siguientes pruebas complementarias.

- *Coloración de Gram*: Se realizó esta coloración cambiando la safranina debido a que este microorganismo no se tiñe bien con este colorante y se utilizó carbolfucsina al 0.8% como colorante de contraste. Esta bacteria debe ser Gram negativa.

- *Prueba de la catalasa*: Se colocó sobre un portaobjetos limpio una colonia de un cultivo fresco con crecimiento característico, se agrega una gota de peróxido de hidrógeno al 3%. La reacción positiva se evidencia por la formación de burbujas.

- *Prueba de la oxidasa*: Se inocula una pequeña muestra en un tubo de hemólisis conteniendo 0.2 ml de agua destilada a la que se le introduce un disco impregnado en la solución de oxalato de p-aminodimetilamina. Una reacción positiva se evidencia por el desarrollo de color rojo.

- *Hidrólisis del hipurato*: Se suspende una muestra con el asa de la cepa en 400 ul de una solución de hipurato de sodio al 1%. Luego de incubar a 37°C durante 2 horas, se le agrega 200 ul de solución de ninhidrina al 3.5% en acetona-butanol 1:1 por la pared del tubo y se deja en reposo a 37°C observándolo a los 10 minutos. La aparición de una coloración azul-violeta indica una reacción positiva.

- *Hidrólisis de indoxil acetato*: Se preparan discos de indoxil acetato por adición de 50 ul de una solución al 10% (p/v) de acetona a discos Standard u dejando secar al aire. Luego se deben guardar a 4°C en envase con dessecante y protegidos de la luz. Se adiciona una o varias colonias del microorganismo sobre un disco y se agrega una gota de agua. Si se produce la hidrólisis aparece un color azul entre 10 y 15 minutos después.

- *Sensibilidad al ácido nalidíxico y cefalotina*: El procedimiento es el mismo para ambas pruebas. Se realiza una suspensión de la colonia en solución fisiológica estéril hasta una densidad óptica del # 1 de la escala de Mac Farland. Se siembra con hisopo sobre la superficie de una placa de agar sangre, luego se coloca un disco de ácido nalidíxico de 30 ug y un disco de cefalotina de 30 ug. Se incuba 48 horas y se observa si hay halo de inhibición o no de manera de determinar si la cepa es sensible a los antimicrobianos estudiados.

5.2.8 Análisis Estadístico:

Para la distribución y presentación de datos se utilizó la Estadística Descriptiva. Empleando porcentajes y la media para analizar y mostrar los resultados. La fórmula de la media(\bar{X}) es la siguiente:

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{N}$$

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos luego de realizar las siembras de los hisopados rectales en agar selectivo para *Campylobacter jejuni* y hacer las lecturas 48 horas después, mostraron crecimiento característico en algunas de las muestras. En el primer muestreo realizado se observaron 2 placas con crecimiento característico, en el segundo también se observaron 2 y en el tercero se encontraron 3. (Anexos-Cuadro No. 1)

En las muestras con crecimiento característico de *Campylobacter jejuni*, se observaron colonias con una apariencia plana y color grisáceo.

De estas colonias se realizaron pruebas complementarias para confirmar que el crecimiento típico observado era debido a *Campylobacter jejuni* (Anexos-Cuadro No. 2). Los resultados de las pruebas complementarias confirmaron el hallazgo de *Campylobacter jejuni* en las muestras sembradas donde se observó el crecimiento característico de las colonias de esta bacteria.

Los datos obtenidos nos revelan que el 12% de los animales muestreados son positivos a *Campylobacter jejuni*, además es importante notar que el 100% de las muestras en las que se observó un crecimiento característico resultó positivo, lo que comprueba la efectividad del agar selectivo para esta especie bacteriana.

Campylobacter jejuni es una bacteria importante como una de las causas principales de diarreas de origen alimentario a nivel mundial, por lo tanto, el hallazgo de esta bacteria en Guatemala a través del presente estudio hace que se tome en cuenta para futuras investigaciones tanto en humanos como en otras

especies animales además del cerdo y determinar así el grado de presencia en nuestro medio y su incidencia como causante de problemas entéricos.

El hallazgo de esta bacteria en un 12% de cerdos del rastro CECARSA a través de las muestras obtenidas por hisopados rectales es solamente el inicio en una cadena de manejo de los animales que va desde el sacrificio de los cerdos (momento en que se obtuvo la muestra) pasando por todo el proceso de faenado de los mismos, hasta que se entregan las canales a la persona encargada de distribuir las canales para llegar al consumidor final; distintas etapas en cada una de las cuales podría haber una contaminación mayor o disminuir la misma de acuerdo al manejo; razón por la cual se hace importante ampliar la investigación del presente tema.

VII. CONCLUSIONES

1. El 12% de los cerdos muestreados en el rastro CECARSA resultó positivo a *Campylobacter jejuni*.
2. Algunos cerdos en Guatemala son portadores sanos del *Campylobacter jejuni*.
3. El agar selectivo Skirrow empleado para realizar este estudio resultó 100% confiable, ya que todas las colonias que se observaron con crecimiento característico de *Campylobacter jejuni* resultaron positivas al confirmarlo con las pruebas bioquímicas respectivas.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Efectuar investigaciones similares a la presente, en áreas específicas tales como departamentos, municipios o ciudades. Además de establecer diferencias entre animales de traspatio y animales criados en granjas tecnificadas al realizar los muestreos.
2. Realizar estudios en la especie porcina para determinar el grado de contaminación de la carne con *Campylobacter jejuni*.
3. Debido a que los matarifes y operarios que manejan los cerdos en el rastro CECARSA tienen un contacto constante con los cerdos que allí se faenan, están expuestos a padecer la campilobacteriosis, por lo que las buenas prácticas de higiene deben ser supervisadas constantemente.
4. Ampliar esta investigación a otras especies sería importante. Si se encontró el *Campylobacter jejuni* en cerdos, es muy probable que se encuentre presente en otras especies de animales domésticos tanto los que se utilizan para consumo humano como los de compañía.
5. *Campylobacter jejuni* debe ser tomado en cuenta como una entidad patológica que puede ser causante de enteritis en la población de Guatemala.

IX. RESUMEN

Campylobacter jejuni es la principal causa de diarreas de origen alimentario en los países desarrollados y una de las principales en los países en vías de desarrollo, motivo por el cual el presente estudio tuvo como finalidad determinar la presencia de esta entidad patológica en los cerdos a faenarse en el rastro CECARSA siendo el primer estudio realizado en animales domésticos en Guatemala.

Para el estudio se realizaron 3 muestreos con intervalos de 15 días entre cada uno. Muestreando al azar el 12% de los animales faenados cada día, trabajándose en total 60 muestras que consistieron en un hisopado rectal obtenido luego del degollamiento del animal.

En el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala se realizaron las siembras de las muestras para determinar la presencia de *Campylobacter jejuni*. Para este fin se utilizó un agar selectivo para esta bacteria denominado agar Skirrow el cual permite el crecimiento de dicha entidad inhibiendo el crecimiento de otras bacterias. Se incubaron las placas a 42°C durante 48 horas bajo condiciones microanaeróbicas en una jarra para este fin. Luego del tiempo de incubación se realizó la lectura de las placas. La colonia es de color grisáceo, de apariencia plana y con tendencia a invadir por la estría de inoculación.

Los resultados obtenidos en el laboratorio demostraron la presencia de *Campylobacter jejuni* en el 12% de los animales muestreados.

Se determinó por primera vez la presencia de *Campylobacter jejuni* en cerdos en Guatemala y estos resultados hacen que de aquí en adelante se considere a esta entidad como un posible patógeno causante de enteritis diarreica en las personas de este país dejando además la interrogante abierta para ampliar los estudios en esta especie doméstica o extenderse a otros animales domésticos que también podrían ser portadores sanos.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Anderson, MR. 1989. Microbiología alimentaria, detección de bacterias con significado higiénico-sanitario. Madrid, Agisa. 440 p.
2. Fang, G; Araujo, V; Guerrant, RL. 1991. Enteric infections associated with exposure to animals or animal products. (en línea) United States of America. 10p. Consultado 8 oct. 2003. Disponible en: <http://www.about-campylobacter.com/>
3. Fernández, H; Price, L. 2002. Manual de procedimientos *Campylobacter*. Chile; Instituto de Microbiología Clínica, Universidad Austral de Chile. 25p.
4. Fernández, M. 2000. Higiene alimentaria. (en línea) Madrid. 5 p. Consultado 8 oct. 2003. Disponible en: [www.saludalia.com/saludalia/web-saludalia/vivir-sano.](http://www.saludalia.com/saludalia/web-saludalia/vivir-sano)
5. Gallardo, F; Gascon, J; Ruiz, J. 1998. *Campylobacter jejuni* as a cause of traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial susceptibility. (en línea) España. 5p. Consultado 12 dic. 2003. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9772312&dopt=Abstract
6. García, O. 2002. De la finca a la mesa, realidad actual. (en línea) Guatemala. 2 p. Consultado 8 oct. 2003. Disponible en: <http://ns1.oirsa.org.sv/Dio501/Edición-Especial-50/Volumen-06-02.htm>.
7. Gracey, J. 1989. Higiene de la carne. Trad. por Bernabé Sanz Pérez. 8 a. ed. España, Interamericana. 522 p.
8. Guevremont, E. 2001. Genotyping of *Campylobacter* isolates from swine, poultry and humans in Canada. (en línea) Canada. 7p. Consultado 11 nov. 2003. <http://www.salinpork2001.com/Proceedings-CD-ROM/5%20-%20Manuscripts/090-Guevremont3.doc>

9. Hobbs, BC; ROBERTS, D. 1993. Higiene y toxicología de los alimentos. Trad. por Pedro Ducar Maluenda. 3 ed. España, Acribia. 275 p.
10. Jawetz, E. 1996. Microbiología médica. Trad. por Jorge A. Mérito Fane. 15 ed. México, Manual Moderno. 807 p.
11. Knabel, SJ. 2002. Enfermedades transmitidas a través de los alimentos: Papel que juegan las prácticas usadas en el manejo de los alimentos en el hogar. (en línea) Estados Unidos. 22 p. Consultado 11 nov. 2003. Disponible en: <http://www.worldfoodscience.org/ciencia/hogar.html>.
12. Libby, JA. 1986. Higiene de la carne. México, Continental. 659 p.
13. Mansfield, LS; Gauthier, DT; Abner, SR. 2003. Lymphoglandular complexes of the colon are invaded by *Campylobacter jejuni* in a swine model. (en línea) United States of America. 3p. Consultado 11 nov. 2003. Disponible en: <http://www.nal.usda.gov/ttic/tektran/data/000009/58/0000095875.html>
14. MANUAL de medios de cultivo. 1994. Alemania, Merck. 364 p.
15. Merchant, IA; Packer, RA. 1984. Bacteriología y virología veterinarias. Trad. por Miguel Cordero del Campillo. España. Acribia. 768p.
16. Nicolet, J. 1985. Compendio de bacteriología médica veterinaria. Trad. por José Romero Muñoz de Arenillas. España, Acribia. 275 p.
17. Varnam, AH; Sutherland, JP. 1995. Carne y productos cárnicos; Tecnología, química y microbiología. Trad. por Isabel Jaime Moreno. España, Acribia. 423 p.

XI. ANEXOS

Cuadro No. 1: Resultados obtenidos de las siembras de las muestras en agar selectivo para *Campylobacter jejuni*

No. de Muestreo	Cantidad de muestras	Muestras con crecimiento característico
1°.	20	2
2°.	20	2
3°.	20	3

(Fuente: Morales, O.; Nov. 2004)

Cuadro No. 2: Resultados de las pruebas complementarias realizadas a las muestras con crecimiento característico

1er. Muestreo (No. de muestra)	2º. Muestreo (No. de muestra)	3er. Muestreo (No. de muestra)
--------------------------------------	-------------------------------------	--------------------------------------

Pruebas Complementarias	Resultado Esperado	1*			2			3		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
Coloración de Gram	Negativo (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prueba de catalasa	Positiva (+)									
Prueba de oxidasa	Positiva (+)									
Hidrólisis del hipurato	Positiva (+)									
Sensibilidad a Cefalotina	Resistente (R)	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Sensibilidad al ácido nalidíxico	Sensible (S)	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Hidrólisis del indoxil acetato	Positiva	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

* Estos números corresponden a las muestras con crecimiento característico en el agar selectivo Skirrow para *Campylobacter jejuni*.

(Fuente: Morales, O.; Nov. 2004)