



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE BORDETELLA
BRONCHISEPTICA AISLADA EN PERROS”.**

Tesis previa a la obtención
del Título de: Médico
Veterinario Zootecnista.

AUTORES:

ANDREA ESTEFANÍA RODRIGUEZ JARA

ANDREA MARGARITA MARTINEZ TORRES

DIRECTOR:

DR. JAIME EDUARDO MALDONADO RIVERA

CUENCA - ECUADOR

2016



RESUMEN

La *Bordetella bronchiseptica* es una bacteria que afecta principalmente al tracto respiratorio superior de los animales domésticos. Siendo la causa principal de la traqueobronquitis infecciosa canina, conocida como tos de las perreras. La presente investigación evaluó la presencia de *Bordetella bronchiseptica* y susceptibilidad antimicrobiana, en muestras de exudado conjuntival, nasal y orofaríngeo. Se tomaron muestras de 115 perros (cachorros, adultos y gerontes) con signos clínicos de enfermedad respiratoria de dos centros de rescate en la ciudad de Cuenca (Clínica Veterinaria Solidaria y Clínica Veterinaria de la Fundación Arca, localizados en la parroquia San Sebastián, como también en el refugio Pichacay localizado en la parroquia Santa Ana). Las muestras se procesaron para el aislamiento, se identificaron y se realizó el antibiograma en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Cuenca. Se realizó un muestreo dirigido y estratificado. *Bordetella bronchiseptica* está presente en un 9.57% de los pacientes identificados con traqueobronquitis infecciosa. La muestra con mayores aislamientos positivos fue la mucosa nasal con 72.7% de los casos positivos. La prueba estadística de Chi², determina que no existe asociación entre las variables



edad y sexo y la presencia de *Bordetella bronchiseptica*. Las cepas de *Bordetella bronchiseptica* aisladas mostraron sensibilidad a la Ciprofloxacina e Imipenem en un 90.0%, Azitromicina y Gentamicina en un 72.7% y Ácido Nalidíxico en un 54.5%. El resto de antibióticos utilizados para el estudio muestran un porcentaje de acción inferior al 50%.

PALABRAS CLAVE:

**TRAQUEOBRONQUITIS, TOS DE PERRERA, BORDETELLA
BRONCHISEPTICA, CANINOS, SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA,
ANTIBIÓTICOS.**



ABSTRACT

Bordetella bronchiseptica is a bacterium that mostly affects the upper respiratory tract of domestic animals. It remains the leading cause of canine infectious tracheobronchitis, known as kennel cough.

This investigation evaluated the presence of *Bordetella bronchiseptica* and antimicrobial susceptibility in samples of conjunctival exudate, nasal exudates and oropharyngeal mucous membrane, through biochemical tests; 115 samples of dogs were taken (puppies, adults and old dogs), patients should have clinical signs of respiratory disease; the samples were taken in two rescue centers in the city of Cuenca (Clínica Veterinaria Solidaria and Arca Foundation, located in San Sebastian , and “Pichacay” shelter located in Santa Ana).

The samples were processed at the microbiology laboratory of the School of Veterinary Medicine, they were incubated for 24 hours in brain heart infusion broth at 37 ° C, then planting in blood agar and MacConkey agar and incubated at 37 ° C for 24 hours, the suspect colonies underwent biochemical tests for identification (gram stain, catalase production, oxidase, nitrates, and urease production, using citrate and malonate and motility test), Finally, antibiotic susceptibility tests were performed using the colonies isolated and identified.



Purposive stratified sampling was used, and concluded that the bacterium is present in 9.57% of patients with infectious tracheobronchitis; The sample was taken from three different sites being in a higher percentage in the nasal exudates 72.7%.

The statistical test Chi 2 was applied, which showed no correlation between age and the presence of *Bordetella bronchiseptica*, as well as between the variable sex and presence of *Bordetella bronchiseptica*.

According to sensitivity tests, it was concluded that the *Bordetella bronchiseptica* strains isolated showed increased sensitivity to antibiotics Ciprofloxacin and imipenem with 90.0%, followed by azithromycin and gentamicin with 72.7% and nalidixic acid ranking third with 54.5 % of susceptibility; other antibiotics used for the study show a percentage lower than 50% action.

KEY WORDS:

TRACHEOBRONCHITIS, KENNEL COUGH, BORDETELLA BRONCHISEPTICA, CANINE, ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY, ANTIBIOTICS .



CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1 Objetivos.....	19
1.1.1 Objetivo general	19
1.1.2 Objetivos específicos.....	19
2. REVISIÓN DE LITERATURA	21
2.1 Enfermedades respiratorias en refugios caninos.....	21
2.2 Bordetella Bronchiseptica	22
2.2.1 Historia	22
2.2.2 Taxonomía	22
2.2.3 Epidemiología.....	22
2.2.4 Características y patogenia.....	23
2.2.5 Signos clínicos.....	25
2.2.6 Tratamiento.....	26
2.2.7 Prevención.....	28
2.2.6.1 Manejo de condiciones ambientales:	28
2.2.6.2 Vacunación	29
2.3 Cultivo y Caracterización de <i>Bordetella bronchiseptica</i>	29
2.3.1 Cultivo	29
2.3.2 Caracterización Bioquímica	30
2.3.3 Antibiograma	32
3. MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.1 MATERIALES.....	34
3.1.1 Materiales de campo	34
3.1.2 Materiales de laboratorio.....	35
3.1.3 Material de escritorio.....	38
3.1.4 Varios	38
3.2 MÉTODOS	39
3.2.1 Área de estudio.....	39
3.2.2 Lugar del ensayo y caracterización climática	40



3.2.3	Metodología para la Investigación Experimental	41
3.2.4	Variables de estudio.....	44
3.2.5	Análisis Estadístico	44
4.	RESULTADOS	46
5.	DISCUSIONES	54
6.	CONCLUSIONES.....	56
7.	RECOMENDACIONES.....	57
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
9.	ANEXOS	64



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No. 1 Caracterización de la muestra de acuerdo a lugar, edad y sexo.	46
Tabla No. 2 Número y porcentaje de casos positivos y negativos a Bordetella Bronchiseptica.....	47
Tabla No. 3 Casos positivos y negativos a Bordetella bronchiseptica según edad, lugar y sexo.	48
Tabla No. 4 Casos positivos y negativos de acuerdo a la edad y sexo	49
Tabla No. 5 Casos positivos y negativos de acuerdo al sexo.....	50
Tabla No. 6 Resultados de prueba de Chi cuadrado para edad y presencia de B. Bronchiseptica.....	50
Tabla No. 7 Resultados de prueba de Chi cuadrado para sexo y presencia de B. Bronchiseptica.....	51
Tabla No. 8 Sensibilidad Antibiótica de cepas aisladas de Bordetella bronchiseptica	52



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No. 1 Ubicación Clínica Veterinaria Solidaria.....	39
Figura No. 2 Ubicación Centro de Rescate FUNDACIÓN ARCA	39
Figura No. 3 Ubicación Refugio “Pichacay” FUNDACIÓN ARCA.....	40



ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo No. 1	Árbol para el planteamiento del problema	64
Anexo No. 2	Gráfico de caracterización de la muestra de acuerdo a lugar, edad y sexo.....	64
Anexo No. 3	Métodos de preparación de caldos y agares utilizados:	65
Anexo No. 4	Pesaje de agar urea para su preparación.....	70
Anexo No. 5	Rotulación de Erlenmeyer para la preparación de medios de cultivo	71
Anexo No. 6	Medios de cultivo	71
Anexo No. 7	Tubos de ensayo con medios de transporte (Infusión cerebro corazón)	72
Anexo No. 8	Tubos bacteriológicos con agar nutritivo	72
Anexo No. 9	Tubos bacteriológicos con agar citrato de Simmons	73
Anexo No. 10	Asas de platino	73
Anexo No. 11	Mechero Bunsen.....	74
Anexo No. 12	Prueba Catalasa positiva	74
Anexo No. 13	Prueba Oxidasa positiva	75
Anexo No. 14	Cultivo y siembra de cepa estándar de Bordetella Bronchiseptica .	75
Anexo No. 15	Cultivo bacteriológico, colonias bacterianas lactasa positivas (negativas para el estudio)	76
Anexo No. 16	Cultivo bacteriológico, colonias con presencia de hemolisis.....	76
Anexo No. 17	Cultivo bacteriológico, colonias con hemolisis	77
Anexo No. 18	Tinción de gram (Cocobacilos gram negativos).....	77
Anexo No. 19	Antibiograma (Halo de inhibición antibiótica)	78



Cláusula de Derechos de Autor

Yo, Andrea Estefanía Rodríguez Jara, autora de la tesis "SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *BORDETELLA BRONCHISEPTICA* AISLADA DE PERROS", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Médico Veterinario Zootecnista. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora

Cuenca, 29 de Marzo de 2016

Andrea Estefanía Rodríguez Jara

C.I: 0105757082



Cláusula de Derechos de Autor

Yo, Andrea Margarita Martínez Torres, autora de la tesis "SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *BORDETELLA BRONCHISEPTICA* AISLADA DE PERROS", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Médico Veterinario Zootecnista. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora

Cuenca, 29 de Marzo de 2016

Andrea Margarita Martínez Torres

C.I: 0104258215



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo, Andrea Estefanía Rodríguez Jara, autora de la tesis "SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *BORDETELLA* BRONCHISEPTICA AISLADA DE PERROS", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 29 de Marzo de 2016

Andrea Estefanía Rodríguez Jara

C.I: 0105757082



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo, Andrea Margarita Martínez Torres, autora de la tesis "SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *BORDETELLA* BRONCHISEPTICA AISLADA DE PERROS", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 29 de Marzo de 2016

Andrea Margarita Martínez Torres

C.I: 0104258215



AGRADECIMIENTO

Al finalizar nuestra tesis, tras un período de buenos y duros momentos es primordial para nosotros agradecer a Dios, manifestado en la fuerza, perseverancia e iluminación que nos acompañaron durante este largo proceso; así también a todas las personas e instituciones que de diferentes maneras aportaron para que esta investigación llegue a feliz término.

Queremos agradecer a la facultad de Ciencias Agropecuarias, a nuestro director, Dr. Jaime Maldonado Rivera y a los profesores miembros del tribunal, Dr. Freddy Carpio, Dr. Antonio Vallecillo y Dr. Diego Rodríguez por guiarnos en el desarrollo de este trabajo; y de especial manera a la Dra. María Estela Encalada y al Econ. Carlos Torres, quienes desinteresadamente nos compartieron su tiempo y conocimientos, sin los cuales no habría sido posible alcanzar esta meta.

A Fundación ARCA y Clínica Veterinaria Solidaria, por abrirnos las puertas de sus instituciones de manera incondicional, permitiéndonos conocer a fondo la problemática situación de los animales domésticos abandonados en nuestra ciudad e incentivándonos a formar parte del cambio.

Andrea R. y Andrea M.



DEDICATORIA

A mis padres, por todas sus expectativas y esperanzas puestas en mí, porque más que padres han sido compañeros en mi vida, celebrando conmigo cada meta alcanzada, fortaleciéndome en las caídas, ayudándome a crecer y llenando mi vida con su amor. Por la enorme bendición que es tenerles a mi lado cada día.

A mi hermana, por su cariño y apoyo incondicional desde siempre y más aún en el curso de mi formación profesional.

A Christian, por escucharme con paciencia y dulzura y sostenerme en los momentos difíciles, por ser mi compañero a lo largo de esta etapa y uno de los más grandes motivos de alegría en mi vida.

A mi compañera Andrea, por su esfuerzo y tenacidad para alcanzar esta meta que compartimos.

ANDREA MARTÍNEZ T.



DEDICATORIA

A Dios por ser el motor que mueve mi vida, por darme la fuerza y la sabiduría para seguir adelante.

A mis padres José Antonio y Mónica, por ser mi apoyo y sacrificar gran parte de su vida en educarme y convertirme en la persona que soy; a mis hermanos José Antonio y Domenica por brindarme su apoyo, ser mis amigos y motivarme para alcanzar mis sueños.

A mis abuelos en especial a mi abuela Olga por su inmenso apoyo, paciencia y amor, por ayudarme a salir adelante y llenar mi vida de sabios consejos.

A mi amor y compañero de vida Gustavo por dar cada paso junto a mí, por el infinito amor que me brinda y por ser mi inspiración para lograr mis objetivos.

A mi amiga y compañera de tesis Andrea por darme su amistad, apoyo y paciencia en esta esta etapa de mi vida.

A mis amigos y personas que colaboraron en la realización de este sueño.

ANDREA RODRIGUEZ



1. INTRODUCCIÓN

La *Bordetella bronchiseptica* es un cocobacilo Gam- negativo que puede colonizar el tracto respiratorio de varios mamíferos, como cuyes, conejos, cerdos, perros y en casos muy aislados puede encontrarse como un patógeno en los humanos (Molina, 2006). Puede afectar a animales de todas las edades, siendo más sensibles los cachorros y gerontes (Quinn, Markey, 2011)

Se localiza principalmente en el tracto respiratorio superior y es considerada una de las causas principales de la traqueobronquitis infecciosa canina. En pacientes inmunocompetentes suele ser de baja morbilidad, mortalidad y autolimitante. No así en lugares donde los perros conviven en hacinamiento como en refugios, perreras, criaderos, tiendas de mascotas, etc, en estos casos es un problema de difícil manejo y su tratamiento es costosos (Mauro, 2006).

Los niveles inestables de temperatura, humedad y ventilación, así como las deficiencias nutricionales y la inmunosupresión de los pacientes debida al estrés ambiental son condiciones determinantes del avance y cronicidad de las infecciones respiratorias en lugares de alta densidad poblacional canina (Sinclair, 2000).

Es necesario para el manejo de estas infecciones, que el médico tratante no se vea limitado a realizar un tratamiento empírico, si no que conozca a que agente infeccioso se enfrenta y cuál es la mejor opción antibiótica; de aquí la importancia



de realizar pruebas bioquímicas para la identificación de la bacteria y el manejo de antibiogramas como herramienta fundamental para la aplicación adecuada de antibioterapia.

En base a lo expuesto, el objetivo de la presente investigación fue determinar la susceptibilidad antibiótica de cepas de *Bordetella bronchiseptica* obtenidas de muestras tomadas de exudado conjuntival, exudado nasal y mucosa orofaríngea de perros, con signología respiratoria, residentes en los centros de rescate canino de la ciudad de Cuenca.



1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

- Determinar la susceptibilidad antibiótica de cepas de *Bordetella bronchiseptica* obtenidas de muestras tomadas de perros residentes en los centros de rescate canino de la ciudad de Cuenca.

1.1.2 Objetivos específicos

- Aislar *Bordetella bronchiseptica* presente en muestras de mucosa orofaríngea, exudado nasal y exudado conjuntival, obtenidas en los centros de rescate canino de la ciudad de Cuenca, mediante procedimientos de diagnóstico bacteriológico.
- Identificar bioquímicamente a la bacteria -objeto de la investigación- mediante métodos y técnicas bacteriológicas, para relacionar los casos positivos de *Bordetella bronchiseptica* con las variables establecidas.
- Determinar la susceptibilidad a antibióticos en cepas de *Bordetella bronchiseptica*, por medio de la difusión en disco, para establecer posibles protocolos de tratamiento a seguir en los casos positivos a la bacteria.



1.1 Preguntas de la Investigación

¿Cuántos pacientes con signos respiratorios resultan positivos a la presencia de *Bordetella bronchiseptica*?

¿A qué antibióticos son más susceptibles las cepas de *Bordetella bronchiseptica* presentes en las muestras obtenidas?



2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Enfermedades respiratorias en refugios caninos

Cuando hablamos de enfermedades respiratorias en refugios y centros de rescate con alta densidad de animales sabemos que el manejo es diferente al que se daría cuando estas mismas enfermedades se presentan en otras circunstancias. Cada nuevo paciente puede traer enfermedades en proceso de incubación o latentes, lo que incrementa significativamente el riesgo de contagio a los animales sanos.

La medicina veterinaria orientada a refugios es un área en reciente crecimiento, hace no muchos años la solución ante un brote de una enfermedad infecciosa era la eutanasia, como medida de protección para los demás habitantes del refugio o centro de rescate, pero los avances científicos nos han proporcionado herramientas para actuar frente a estos problemas (Hurley, Miller, 2009).

La ventilación deficiente, espacio físico reducido, alta densidad poblacional, temperaturas bajas y humedad excesiva son factores predisponentes para el desarrollo de infecciones del tracto respiratorio (D Vieson, et al, 2012). En la mayoría de refugios y centros de rescate se observa estas condiciones, siendo las infecciones respiratorias las de mayor frecuencia (Crawford, 2013).



2.2 Bordetella Bronchiseptica

2.2.1 Historia

Bordetella bronchiseptica se aisló por primera vez en 1896 por Galli-Valerio, quien la denomina *Bacillus caniculae*. Paralelamente en 1901, Lignieres la llamó *Pasteurella canina*, atribuyéndole ser el agente causal del Distemper canino. En 1911 fue aislada y descrita en los EE.UU por Ferry con el nombre de *Bacillus bronchicanis*, cambiando luego a *Bacillus bronchisepticus*, para finalmente, en 1957, ser definido dentro del género *Bordetella* en la Edición del Manual Bergey, denominándose finalmente *Bordetella bronchiseptica* (Lugo, Peña, 2007).

2.2.2 Taxonomía

Clase: Betaproteobacteria

Orden: Burkholderiales

Familia: Alcaligenacea

Género: *Bordetella*

Especie: *Bronchiseptica* (Vasanthakumari, 2007)

2.2.3 Epidemiología

Aunque *Bordetella bronchiseptica* ha sido considerada uno de los principales agentes causales de la traqueobronquitis infecciosa canina, se conoce poco sobre su epidemiología en la naturaleza (Molina, 2006). No se ha confirmado cual es el



reservorio principal ni la transmisión de una especie a otra, los mayores avances se han obtenido en el estudio de su transmisión en animales domésticos (Mattoo, Cherry, 2005).

Bordetella bronchiseptica es un patógeno de distribución mundial, con baja mortalidad y morbilidad variable según el entorno del animal, aumentando en condiciones de hacinamiento, estrés y déficit nutricional (Crestoni & Dall Acqua, 2004), se presenta mayormente en épocas frías y en lugares de alta densidad poblacional y condiciones ambientales desfavorables como refugios, centro de rescate, criaderos y tiendas de mascotas (Mattoo & Cherry, 2005)

La transmisión horizontal se da mediante contacto directo con las secreciones respiratorias y aerosoles y por contacto indirecto a través de fómites: platos, jaulas, utensilios, ropa del personal, etc. (Fuentes, Jhonson, & Dennis, 2010). La *Bordetella bronchiseptica* puede aislarse de las vías respiratorias de animales sanos, siendo estos portadores asintomáticos y además ser liberada durante meses en animales que superaron la infección (Baldwin, 2009).

2.2.4 Características y patogenicia

El género *Bordetella* está diferenciado en 4 especies: *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica* y *Bordetella holmesii* (Mattoo, Cherry, 2005). Todas ellas relacionadas con infecciones de las vías respiratorias;



Bordetella pertussis y *Bordetella parapertussis* afectan al ser humano y las dos especies restantes, son patógenos de animales (Lugo, Peña, 2007).

Bordetella bronchiseptica está considerada como agente etiológico primario de la traqueobronquitis infecciosa canina, conocida como tos de las perreras, en conjunto con algunos virus, conforman el complejo respiratorio canino (Mochizuki, et al, 2008). Es un cocobacilo, aerobio obligado, Gram negativo, betahemolítico, oxidasa, catalasa, ureasa y citrato positivo, reduce nitratos y tiene movilidad por flagelos peritricos. (Quinn, et al, 2011).

La bacteria ingresa al organismo y se localiza principalmente en el tracto respiratorio superior, su multiplicación llega al máximo nivel entre el tercer y sexto día de colonización, que es cuando se presentan los primeros signos de la enfermedad, dos semanas después comienza a disminuir la carga bacteriana si no se han presentado infecciones secundarias. La transmisión puede ocurrir durante ocho a diez días después de la infección (Crestoni & Dall Acqua, 2004).

La bacteria posee fimbrias, para su fijación en el hospedador, y adhesinas (hemaglutinina filamentosa y pertactina), que le permiten colonizar el epitelio respiratorio. Luego de la colonización el daño en el tejido es causado por exotoxinas (adenilato ciclasa – hemolisina, toxina dermonecrótica y cytotoxina traqueal) y endotoxinas que inhiben la fagocitosis, e inmunidad humoral y celular (Ford, 2010). Tras la fijación de la bacteria en el epitelio respiratorio se produce



parálisis ciliar y se incrementan la actividad secretora con acumulación de moco en la superficie traqueal y bronquial (Fingerman, 2011), favoreciendo la proliferación de bacterias oportunistas y complicando el cuadro causando neumonía (Crestoni, Dall Acqua, 2004).

Bordetella bronchiseptica se caracteriza por producir cuadros crónicos debido a su capacidad de invadir células epiteliales y fagocíticas (Nelson & Couto, 2010), dentro de la célula hospedadora la bacteria se localizará en de la vacuola, su supervivencia se debe a que altera el pH de la misma (Fingerman, 2011); de esta manera evita los mecanismos de defensa inmunológica del organismo y puede permanecer en el hospedador hasta tres meses (Ford, 2010).

El daño a los tejidos se puede manifestar en los pulmones como inflamación perivascular y peribronquial con infiltración de granulocitos polimorfonucleares, pudiendo llegar a presentarse áreas necróticas (Fingerman, 2011).

2.2.5 Signos clínicos

Las primeras manifestaciones clínicas pueden darse de 3 a 6 días después de la exposición a *Bordetella bronchiseptica*, y durar hasta 14 días si no existen infecciones secundarias que compliquen el cuadro clínico. Los pacientes afectados levemente suelen permanecer activos y no presentan fiebre (Quinn, et



al, 2011), siendo en la mayoría de los casos auto-limitante y de fácil resolución inclusive sin aplicar tratamiento alguno (Fuentes, et al, 2010).

Un síntoma característico es la presencia de tos paroxística, conocida también como tos de ganso que puede agravarse con el ejercicio, arcadas y expectoración que suelen ser confundidas con vómito, así como descarga mucoide y mucopurulenta nasal y ocular (Ford, 2010); Cuando se producen infecciones secundarias se manifiesta fiebre, disnea, decaimiento y anorexia; en cuadros complicados puede desarrollarse neumonía o bronconeumonía, siendo esta la principal causa de muerte en cachorros, en casos aislados los animales jóvenes pueden pasar de signos respiratorios leves a la muerte en un período de 24 horas (Crestoni, Dall Acqua, 2004).

2.2.6 Tratamiento

El tratamiento de la infección con *Bordetella bronchiseptica* se basa en el control bacteriano mediante antibióticos y una terapia sintomática.

- Antibióticos:

Se recomienda una amplia gama de antibióticos como amoxicilina más ácido clavulánico, tetraciclinas, gentamicina, azitromicina, doxiciclina, enrofloxacina, sulfas mas trimetoprim (Couto, Nelson, 2000), que en la mayoría de los casos son usados sin realizarse un antibiograma previo, esto ha llevado a que las bacterias



generen resistencias a muchos antimicrobianos, comprometiendo el tratamiento efectivo de las infecciones y pudiendo llegar a causar un problema de salud pública (OMS, 2015).

- Terapia Sintomática:

Terapia antitusígena:

Se sugiere el uso de butarfanol en dosis de 0.055 mg/kg cada 6 a 12 horas o codeína en dosis de 1.1 a 2.2 mg/kg cada 6 a 8 horas.

Broncodilatadores:

Como la teofilina usada en dosis de 20 mg/Kg cada 24 horas, aminofilina en dosis 11 mg/Kg cada 8 horas y Salbutamol en dosis de 0.1 mg/Kg cada 8 horas (Ford, 2010).

Antipiréticos:

Si el paciente presenta pirexia se debe aplicar antipiréticos como: Dipirona en dosis de 25 mg/kg cada 12 horas.

Terapia con Aerosol:

Las nebulizaciones se recomiendan en pacientes que presenten acumulación de secreción mucosa en tráquea y bronquios, usando 6 a 10 ml de solución salina estéril por 20 minutos cada 6 horas.

- Oxigenoterapia:

La acumulación de secreciones mucopurulentas dificulta el intercambio gaseoso a nivel alveolar, por tanto es ampliamente recomendable la aplicación de oxígeno



para facilitar la respiración del paciente y acelerar su recuperación. (García de la Osa, 2002)

- **Fluídoterapia:**

En casos que presenten complicaciones, la rehidratación ayuda a fluidificar las secreciones y mejorar así la ventilación.

- **Corticoesteroides:**

La aplicación de Corticoesteroides se puede emplear como medida de emergencia para controlar una tos grave y dificultad respiratoria; se puede administrar prednisolona en dosis de 0.025-0.5mg/kg cada 12 o 24 horas evaluando el caso (Ford, 2010).

2.2.7 Prevención

2.2.6.1 Manejo de condiciones ambientales:

Se recomienda aislar al paciente enfermo para reducir la contaminación de los animales sanos, mantener una ventilación adecuada y temperatura ambiental confortable evitando extremos fríos y corrientes de aire fuertes, así como limpieza estricta de jaulas y utensilios usando clorhexidina, amonio cuaternario o hipoclorito de sodio (Ruíz, 2009).

Es necesario contar con un área de cuarentena, donde los nuevos ingresos deben permanecer por al menos 10 días antes de insertarse en la población general, el personal encargado del manejo de estos animales debe cumplir con medidas profilácticas antes y después del contacto con los mismos (Mauro, 2006)



2.2.6.2 Vacunación

La vacunación tiene un papel fundamental en la prevención de la infección con *Bordetella bronchiseptica*. Existen tres tipos de vacunas para *Bordetella bronchiseptica*: vacuna de *Bordetella bronchiseptica* atenuada de administración oral, vacuna de *Bordetella bronchiseptica* atenuada de aplicación intranasal, las cuales requieren aplicación de una sola dosis con refuerzo anual y vacuna de *Bordetella bronchiseptica* muerta de aplicación subcutánea, de la cual se requieren dos dosis con refuerzo anual, estudios han demostrado que la mayor protección se alcanza con la vacuna de aplicación intranasal entre las 6 y 8 semanas de vida (Larson, et al, 2013) (Haines, et al, 2001).

A pesar de que se haya aplicado la vacuna, el paciente puede presentar la enfermedad pero con síntomas leves (Ford, 2010).

2.3 Cultivo y Caracterización de *Bordetella bronchiseptica*

2.3.1 Cultivo

Bordetella bronchiseptica puede ser aislada en diferentes medios de cultivo como: agar MacConkey, agar Bordet-Gengou, o agar Smith- Baskerville (Quinn, Markey, Leonard, 2011); En todos los casos, los cultivos deben ser incubados en condiciones aeróbicas, a 37°C y durante 24 a 48 horas para permitir el crecimiento de la bacteria (Bhardwaj, et al, 2013).



A pesar de que estos medios permiten un adecuado crecimiento de *B. bronchiseptica*, pueden existir otros tipos de bacterias que se encuentren contaminando los cultivos, por esto es importante la realización de pruebas bioquímicas que confirmen la presencia de *Bordetella bronchiseptica*.

2.3.2 Caracterización Bioquímica

Bordetella bronchiseptica, mediante tinción de Gram se observa como un cocobacilo gram negativo (Couto, Nelson, 2000). Presenta reacción positiva a las pruebas de motilidad, oxidasa, catalasa, producción de ureasa, reducción de nitratos (Molina, 2006), utilización de citrato y malonato (Denés, et al, 2006).

Prueba de la Oxidasa:

Se basa en la detección de la enzima citocromooxidasa presente en la cadena respiratoria de algunos microorganismos; el reactivo contenido en los discos se oxida en presencia de dicha enzima y de oxígeno atmosférico, pasando de ser incoloro a un color morado o rosa oscuro. Los reactivos contenidos en los discos pueden ser Tetrametil-p-fenilendiamina., Dimetil-p-fenilendiamina o Indofenol (OMS, 2003).

Prueba de la Catalasa:

Mediante esta prueba se puede observar una reacción burbujeante al mezclar una gota de peróxido de hidrógeno con una colonia bacteriana; por



acción de la enzima catalasa, presente en algunas bacterias, el peróxido de hidrógeno es transformado en agua y oxígeno, el cual se presenta como burbujas cuando la prueba es positiva (Koneman, Allen, 2008)

Prueba de producción de ureasa:

Los organismos que contienen producen enzima ureasa hidrolizan la urea presente en el medio de cultivo, causando la liberación de amoníaco y el cambio de color de amarillo a rojo o rosa encendido (OMS, 2003).

Reducción de Nitratos:

Permite determinar la capacidad de la bacteria de reducir nitratos a nitritos por acción de la enzima nitrato reductasa (Fernandez, García, 2010), mediante la adición de dos gotas de la solución A y B del reactivo de Griess a caldo nitrato previamente inoculado con la colonia bacteriana. Si al agregar las soluciones se produce una coloración roja, por a la presencia de nitritos, el resultado se considera positivo. (Koneman, Allen, 2008). Existen bacterias capaces de reducir nitratos a nitritos y posteriormente nitritos a nitrógeno gaseoso, en este caso la coloración no será rosa al agregar los reactivos A y B, debido a que ya no existen nitritos en el medio, este resultado se confirma al agregar polvo de zinc y no obtener cambios en la coloración, ya que si se obtiene un color rosa significaría la presencia de nitratos y por tanto la incapacidad de la bacteria de reducirlos (OMS, 2003).



Utilización de Citrato:

Permite identificar si una bacteria puede utilizar compuestos amoniacaes como única fuente de nitrógeno y citrato como única fuente de carbono, gracias a la acción de la enzima citrato permeasa, causando una alcalinización del medio y obtención de un color azul fuerte en el agar (Fernandez, García, 2010).

Utilización de Malonato:

Si una bacteria es capaz de usar el malonato como única fuente de carbono, es positiva a esta prueba, causando alcalinización del medio y cambio de color del agar de verde a azul (OMS, 2003).

Prueba de Motilidad

Esta prueba determina la movilidad de las bacterias, mediante la inoculación de una colonia en el medio usando una aguja o asa recta; si la prueba es positiva se observa un crecimiento difuso lejos de la línea de inóculo (Koneman, Allen, 2008).

2.3.3 Antibiograma

El uso de los estudios de sensibilidad antibiótica permite al clínico escoger el mejor tratamiento en una infección bacteriana, reduciendo el riesgo de generar agentes resistentes, el tiempo de recuperación y el costo del tratamiento (OMS,



2015). El antibiograma, mide la efectividad in vitro de un grupo de antibióticos frente a un microorganismo, simulando lo que sucedería en el organismo del paciente. Los resultados no son totalmente extrapolables considerando las diferencias y particularidades del proceso in vivo (Cercenad, Saavedra, 2009).

La sensibilidad de un microorganismo se define como la menor concentración de antimicrobiano que evita el crecimiento in vitro del microbio; el halo inhibitorio marca la transición de resistente a sensible (Sánchez, Feris, 1998)



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Materiales de campo

- **Físicos**
 - Hisopos de algodón estériles
 - Tubos bacteriológicos
 - Gel refrigerante
 - Algodón
 - Papel secante de cocina
 - Hielera
 - Catlones
 - Jeringas
 - Agujas
 - Guantes de exploración

- **Químicos**
 - Caldo Infusión Cerebro corazón
 - Alcohol etílico 70%



- **Biológicos**
- Caninos
- Muestra:
 - Exudado Conjuntival
 - Exudado Nasal
 - Mucosa Orofaringea

3.1.2 Materiales de laboratorio

- **Físicos**
- Mesas
- Mechero Bunsen
- Asas de platino
- Microscopio
- Esterilizador
- Erlenmeyer
- Pipetas
- Probetas
- Varillas de cristal
- Espátula
- Fundas plásticas transparentes
- Fundas plásticas negras



- Fundas plásticas rojas
- Papel de aluminio
- Papel de empaque
- Cajas Petri de cristal
- Refrigeradora
- Balanza digital
- Incubadora Bacteriológica
- Guantes estériles
- Mascarillas
- Gorros
- Mandil
- Etiquetas de identificación
- Cajas Petri descartables
- Gradillas
- Portaobjetos
- Cubreobjetos

- **Químicos**
 - Gas butano
 - Agua Destilada
 - Agua Oxigenada
 - Alcohol etílico 95%
 - Agar Sangre base



- Agar MacConkey
- Agar Mueller Hinton
- Caldo Triptosa Fosfato
- Papel reactivo Bactident Oxidasa
- Peróxido de Hidrógeno
- Agar Nutritivo
- Agar Citrato de Simmons
- Caldo Malonato
- Caldo Nitrato
- Reactivo Griessilovay de los nitritos
- Polvo de Zinc
- Motility Test Medium
- Agar Urea
- Agar Base
- Tinción de Gram
- Aceite de inmersión

- **Biológicos**
 - Sangre
 - Cultivos bacteriológicos



3.1.3 Material de escritorio

- Rotulador
- Cinta blanca
- Cinta transparente
- Computadora
- Programas para la elaboración del estudio
- Libros
- Cámara de Fotos

3.1.4 Varios

- Vehículo

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Área de estudio



Figura No. 1 Ubicación Clínica Veterinaria Solidaria

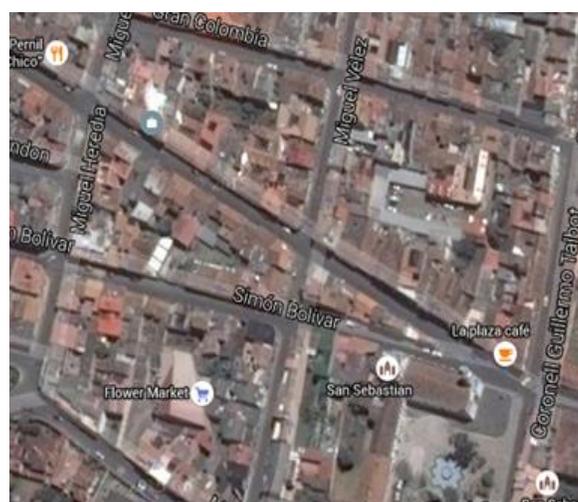


Figura No. 2 Ubicación Centro de Rescate FUNDACIÓN ARCA



Figura No. 3 Ubicación Refugio “Pichacay” FUNDACIÓN ARCA

3.2.2 Lugar del ensayo y caracterización climática

La investigación se realizó a partir de muestras que se tomaron en refugios caninos y centros de rescate de la ciudad, ubicados de la siguiente manera: Clínica Veterinaria Solidaria y Clínica Veterinaria de Fundación Arca, ubicados en la parroquia San Sebastián de la ciudad de Cuenca, cuyos datos meteorológicos son los siguientes: latitud $2^{\circ} 5' 13''$ sur; longitud $78^{\circ} 56' 55''$ oeste; altitud 2545 m., (INAMHI, 2013).

Así como en el Refugio de Fundación Arca, ubicado en Pichacay perteneciente a la parroquia Santa Ana del cantón Cuenca, siendo los datos meteorológicos de la zona los siguientes: latitud $09^{\circ} 55' 09''$ norte; longitud $84^{\circ} 12' 30''$ oeste; altitud 2600 m., (ETAPA, 2013).



El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Bacteriología y Micología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.

3.2.3 Metodología para la Investigación Experimental

El proceso investigativo consta de las siguientes etapas:

3.2.3.1 Toma, conservación, empaque, transporte y recepción de muestras en laboratorio.

En el sistema de Gestión de Calidad Microbiológica, la fase preanalítica comprende la toma, conservación, empaque, transporte y recepción en el laboratorio de las muestras clínicas. Para todas las muestras se utilizó como medio de transporte el caldo de infusión cerebro-corazón, transportados en un envase con gel refrigerante, Los tubos con las muestras fueron transportados hasta el laboratorio en recipientes con triple empaque; que consta de un primer empaque, en este caso el tubo de ensayo que contenía la muestra envuelto en papel absorbente y colocado en una gradilla que se transportaba dentro de un segundo empaque de plástico rígido y este a su vez dentro de una caja de espuma flex, entre los dos últimos empaque se colocaba papel y gel refrigerante para mantener una temperatura adecuada para las muestras.

De cada paciente las muestras fueron tomadas de tres puntos: exudado conjuntival, exudado nasal y mucosa orofaríngea.



a) Muestras de exudado conjuntival

Las muestras se tomaron por duplicado con hisopos de algodón estéril frotando suavemente el fondo del saco conjuntival, para luego transportarlo hasta el laboratorio en caldo infusión cerebro-corazón, dentro recipientes de triple empaque con gel refrigerante.

b) Muestras de Exudado Nasal

Con hisopos de algodón estéril se tomaron por duplicado muestras de exudado del fondo de la fosa nasal; se cumplió con todas las medidas de bioseguridad para la conservación y el traslado de las muestras al laboratorio.

c) Muestra de Mucosa Orofaringea

Con hisopos de algodón estéril se tomaron por duplicado muestras de mucosa orofaringea, estas fueron trasladadas al laboratorio en caldo de infusión cerebro-corazón y conservante bacteriológico; cumpliendo con las medidas de bioseguridad para su estudio.

3.2.3.2 Aislamiento de Bordetella bronchiseptica

El aislamiento se consiguió con los siguientes pasos:

- Incubación aeróbica en tubos de transporte con caldo infusión cerebro-corazón durante 24 horas a 37°C.
- Siembra en Agar sangre ovina por 24 horas a 37°C.



- Identificación de las colonias compatibles con *Bordetella bronchiseptica*, (color gris y diámetro de 1 a 2 mm).
- Tinción de Gram para determinar morfología y caracteres tintoriales (*cocobacilo Gram negativo*).
- Los aislados que presentaron colonias y morfología característica fueron resembrados en Agar MacConkey e incubados por 24 horas a 37°C.
- Los aislados con colonias características en agar MacConkey (diámetro de 1 a 2 mm, translúcidas o incoloras), se sometieron a pruebas bioquímicas para la caracterización bacteriana: producción de catalasa, oxidasa, nitratos, y ureasa, utilización de citrato y malonato, y test de motilidad.

3.2.3.3 Antibiograma

Las colonias aisladas de *Bordetella bronchiseptica* se incubaron a 37°C por 4 horas, en tubos con caldo Triptosa Fosfato con un índice de turbidez 0,5 de acuerdo a McFarland. Posteriormente se vació el contenido del tubo bacteriológico, 5ml, en tres cajas Petri con Agar Muller Hinton, El inóculo se distribuyó de manera homogénea en superficie del medio, retirando el sobrante. Se colocó los discos de antibiótico y dejó reposar por 10 minutos. Las cajas cargadas se incubaron a 37°C por 24 horas, para realizar la lectura.



3.2.4 Variables de estudio

Se consideró las siguientes variables; procedencia de las muestras, edad y sexo de los animales muestreados.

En la variable lugar se consideraron tres puntos de muestreo:

- Fundación Arca (Centro de rescate)
- Refugio de Fundación Arca
- Clínica Veterinaria Solidaria (Centro de rescate)

En la variable edad se consideraron los siguientes rangos:

- Cachorros: 0 - 12 meses
- Adultos: 1 - 7 años
- Adultos mayores: más de 7 años

Variable sexo:

- Hembras
- Machos

3.2.5 Análisis Estadístico

Población universo

La población de caninos en los refugios y centros de rescate considerados para esta investigación es de 275, se ha observado que alrededor del 60% de ellos, es decir 165 animales, presentan signos compatibles con enfermedad respiratoria, a



su ingreso o durante su estadía en los refugios. Los animales con signos de afección respiratoria fueron la población objeto de estudio

Muestra

El tamaño de la muestra se calculó, usando la siguiente fórmula: $n =$

$$\frac{N * Z^2 * P * (1-P)}{N * e^2 + Z^2 * P * (1-P)}$$

En base a la probabilidad del 50%, porque se desconoce la probabilidad de acierto; con un 95% de confiabilidad y 5% del error estimado.

$N = 165$ caninos

$$Z^2 = (1,96)^2$$

$P = 0,5$ porque se desconoce la probabilidad de acierto

$e = 0.05$

$$n = \frac{165 * 3,8416 * 0,5 * (1-0,5)}{(165 * 0,0025) + (3,8416 * 0,25)} = 115,42$$



4. RESULTADOS

Tabla No. 1 Distribución de la muestra de acuerdo a lugar, edad y sexo.

Lugar	Edad	Hembras		Machos		Total	
		Casos	%	Casos	%	Casos	%
Clínica Arca	0 - 12 meses	32	76,2%	10	23,8%	42	100%
	1 - 7 años	21	51,2%	20	48,8%	41	100%
	+ de 7 años	2	40%	3	60%	5	100%
Subtotal		55		33		88	
Refugio Arca	0 - 12 meses	0	0%	0	0%	0	0%
	1 - 7 años	7	58,3%	5	41,7%	12	100%
	+ de 7 años	7	50,0%	7	50%	14	100%
Subtotal		14		12		26	
C.V Solidaria	0 - 12 meses	0	0%	1	100%	1	100%
	1 - 7 años	0	0%	0	0%	0	0%
	+ de 7 años	0	0%	0	0%	0	0%
Subtotal		0		1		1	
TOTAL		69		46		115	

Para la investigación se tomaron en cuenta 115 perros con signología respiratoria, hembras y machos con edades entre 0-12 meses, 1-7 años y mas de 7 años. Se establecieron tres puntos de muestreo: Fundación Arca, Refugio de Fundación Arca y Clínica Veterinaria Solidaria.

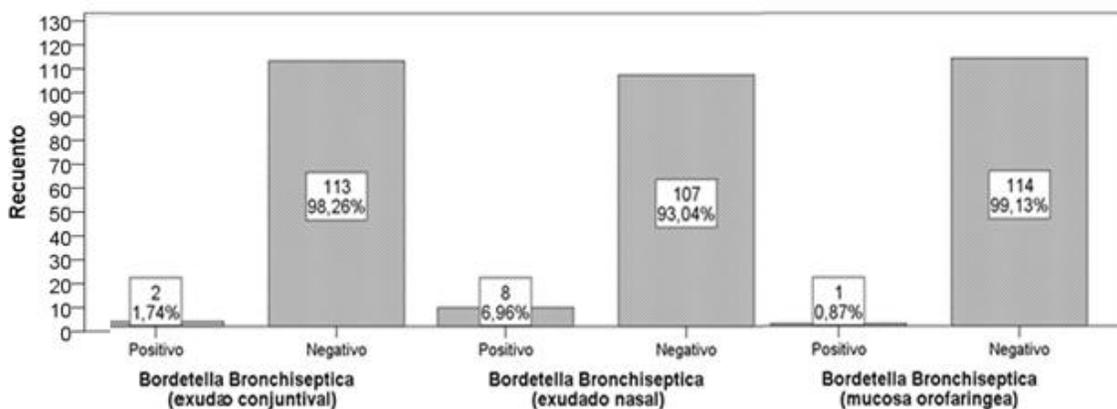


Tabla No. 2 Número y porcentaje de casos positivos y negativos a *Bordetella Bronchiseptica*

Bordetella bronchiseptica		
	Casos	%
Positivo	11	9,6%
Negativo	104	90,4%
TOTAL	115	100%

Como se puede observar en la tabla No.2, de los 115 pacientes muestreados, se obtuvieron 11 aislamientos de *Bordetella bronchiseptica*, es decir el 9.6%, y 104 resultaron negativos a la presencia de la bacteria, es decir 90.4%.

Gráfico No. 1 Distribución de los casos positivos y negativos según el sitio de toma de muestra



En el Gráfico No.1 se observan los casos positivos y negativos según los tres sitios de toma de muestra. De las muestras de exudado conjuntival el 1.74% fueron positivas y el 98.26% negativas; en cuanto a exudado nasal, el 6.96% fueron positivas y 93.04% negativas; de las muestras de mucosa orofaringea,



el 0.87%, es decir menos de 1%, fueron positivas y el 99,13% negativas. Es importante notar que 8 de las 11 muestras positivas a *Bordetella bronchiseptica* pertenecen a exudado nasal es decir 72.72%.

Tabla No. 3 Casos positivos y negativos a *Bordetella bronchiseptica* según edad, lugar y sexo.

Lugar	Edad	Sexo							
		Hembras				Machos			
		Positivo		Negativo		Positivo		Negativo	
		Casos	%	Casos	%	Casos	%	Casos	%
Clínica Arca	0 - 12 meses	4	12,5%	28	87,5%	1	10%	9	90%
	1 - 7 años	4	19%	17	81%	2	10%	18	90%
	+ de 7 años	0	0%	2	100%	0	0%	3	100%
Subtotal		8		47		3		30	
Refugio Arca	0 - 12 meses	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	1 - 7 años	0	0%	7	100%	0	0%	5	100%
	+ de 7 años	0	0%	7	100%	0	0%	7	100%
Subtotal		0		14		0		12	
C.V Solidaria	0 - 12 meses	0	0%	0	0%	0	0%	1	100%
	1 - 7 años	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	+ de 7 años	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
Subtotal		0		0		0		1	
TOTAL		8		61		3		43	

En la tabla No. 3 se muestran el total de casos positivos y negativos obtenidos, relacionados con el punto de toma de muestra, la edad y el sexo de los pacientes.

Se observa que dentro de las 55 hembras y 33 machos muestreados en Fundación Arca se encuentran los 11 aislamientos positivos obtenidos en la investigación, distribuidos de la siguiente forma: 4 hembras ente 0 a 12 meses, 4



hembras entre 1 a 7 años, 1 macho entre 0 a 12 meses y 2 machos ente 1 a 7 años.

Todos los muestreos realizados en el Refugio de Fundación Arca y en Clínica Veterinaria Solidaria fueron negativos a la presencia de *Bordetella bronchiseptica*.

Tabla No. 4 Casos positivos y negativos de acuerdo a la edad y sexo

		<i>Bordetella bronchiseptica</i>				TOTAL	
		positivo		negativo			
		Casos	%	Casos	%	Casos	%
Edad	0 - 12 meses	5	11,6%	38	88,4%	43	100%
	1 - 7 años	6	11,3%	47	88,7%	53	100%
	+ de 7 años	0	0%	19	100%	19	100%
TOTAL		11		104		115	

En la tabla No 4 Se muestra los resultados del estudio, casos positivos y negativos en relación con la edad de los pacientes. Se puede observar que 5 de los 43 casos correspondientes al rango de 0-12 meses son positivos, es decir 11,6%, 6 de los 53 casos correspondientes al rango de 1-7 años son positivos, es decir el 11,3%, todos los pacientes de más de 7 años que fueron muestreados resultaron ser negativos a la presencia de la bacteria.



Tabla No. 5 Casos positivos y negativos de acuerdo al sexo

Sexo	<i>Bordetella bronchiseptica</i> Positivo		Negativo		Total
	Casos	%	Casos	%	
Hembras	8	11,6%	61	88,4%	69
Machos	3	6,5%	43	93,5%	46
Total	11	9,6%	104	90,4%	115

En la tabla No. 5 se muestran los resultados del estudio, relación entre los casos positivos y negativos y el sexo de los pacientes muestreados. Se observa que 8 de las 69 muestras tomadas en hembras fueron positivas a *Bordetella bronchiseptica* esto quiere decir que el 11.6% de hembras presentaban infección por *Bordetella bronchiseptica*; en el caso de los machos, en 3 de los 46 muestreados se determinó la presencia de la bacteria es decir, en el 6,5% de los machos analizados eran positivos a la presencia de la bacteria.

Tabla No. 6 Resultados de prueba de Chi cuadrado para edad y presencia de *B. Bronchiseptica*

	Valor estadístico	Grados libertad	Significación* exacta
Chi-cuadrado de Pearson	2,410	2	0,307
Prueba exacta de Fisher	2,232		0,366
N de casos válidos	115		

* Casillas (33,3%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 1,82.



Considerando las variables edad y presencia de la bacteria, se encuentra que no existe una asociación estadística ($P > 0.05$) entre las variables indicadas.

Tabla No. 7 Resultados de prueba de Chi cuadrado para sexo y presencia de Bordetella bronchiseptica

	Valor Estadístico	Grados Libertad	Significación * exacta
Chi-cuadrado de Pearson	,821	1	,522
Prueba exacta de Fisher			,522
N de casos válidos	115		

**Casillas (25,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 4,40.*

La prueba de chi cuadrado determina que considerando las variables sexo y presencia de la bacteria, no existe una asociación estadística entre dichas variables. ($P > 0.05$).



Tabla No. 8 Sensibilidad Antibiótica de cepas aisladas de *Bordetella bronchiseptica*

Antibiótico	Sensibilidad Antibiótica					
	Susceptible		Intermedio		Resistente	
	Casos	%	Casos	%	Casos	%
CN10ug	8	72,7%	3	27,3%	0	0%
F300ug	1	9,1%	7	63,6%	3	27,3%
L2ug	0	0%	0	0%	11	100%
CIP5ug	10	90,9%	1	9,1%	0	0%
NA30ug	5	45,5%	4	36,4%	2	18,2%
CRO30ug	3	27,3%	8	72,7%	0	0%
IMP10ug	10	90,9%	1	9,1%	0	0%
VA30ug	0	0%	3	27,3%	8	72,7%
TE30ug	0	0%	0	0,0%	11	100%
AZM15ug	8	72,7%	2	18,2%	1	9,1%
CAZ30ug	6	54,5%	3	27,3%	2	18,2%
AMC30ug	1	9,1%	0	0,0%	10	90,9%
P10ug	0	0%	5	45,5%	6	54,5%

Como se puede observar en la tabla “Sensibilidad Antibiótica”, los 11 aislamientos de *Bordetella bronchiseptica* que se obtuvieron de todas las muestras tomadas fueron sometidos a pruebas de sensibilidad a 13 antibióticos; cabe recalcar que los porcentajes analizados en la tabla No.6 se obtuvieron del total de fila.

Las cepas de *Bordetella bronchiseptica* aisladas mostraron más susceptibilidad a los antibióticos Ciprofloxacina e Imipenem con un porcentaje de 90.9%, seguidos de Azitromicina y Gentamicina con un porcentaje de 72.7%, Ácido Nalidíxico y Cefacidima se encuentran en tercer lugar con porcentajes de 54.5% y 45.5% respectivamente; en quinto lugar Ceftriaxona con un porcentaje de 27.3% , por último las cepas fueron resistentes ante Amoxicilina + Ácido Clavulánico y



Nitrofurantoina con 9.1% y Lincomicina, Vancomicina, Penicilina y Tetraciclina con un porcentaje de 0%.

La susceptibilidad intermedia nos indica el punto de Concentración Mínima Inhibitoria, es decir que el agente antibiótico evita que las colonias bacterianas sigan creciendo pero no ejerce acción bactericida sobre las existentes. Las cepas mostraron sensibilidad intermedia a Ceftriaxona con un porcentaje de 72.7%, seguido de Nitrofurantoina con un porcentaje de 63.3% y Penicilina con 45.5%; presentando menor susceptibilidad intermedia se encuentra el Ácido Nalidixico con 36.4%, Gentamicina, Vancomicina, Cefatidima con 27.3% y Azitromicina 18.2%; y por último con un mínimo porcentaje de susceptibilidad intermedia encontramos a la Ciprofolxacina e Imipenem con 9.1%, Lincomicina, Tetraciclina y Amoxicilina más Ácido Clavulánico con un porcentaje de 0% de efectividad.

Los antibióticos que han generado resistencia en las cepas bacterianas aisladas son: Tetraciclina y Lincomicina en el 100% de los aislamientos, Amoxicilina más Ácido Clavulánico en el 90.9%, Vancomicina con 72.2% , Penicilina con 54.5%; presentando un porcentaje mínimo de resistencia se encuentra la Cefacidima y Ácido Nalidíxico con 18.2% y Azitromicina con 9.2%; los antibioticos que no han generado resistencia en las cepas aisladas son: Gentamicina, Ciprofloxacina, Imipenem y Ceftriaxona.



5. DISCUSIONES

Esta investigación demostró que el 9,6 % de las afecciones respiratorias que presentaron los pacientes estudiados están asociadas a *Bordetella bronchiseptica*; similar a los resultados presentados por otros autores como Molina y colaboradores en 2006, quienes obtuvieron un porcentaje de aislamiento de 8.4% y Mochisuki y colaboradores en 2008, cuya investigación dio un porcentaje de 10.3% de aislamientos de *Bordetella bronchiseptica*. (Molina, 2006) (Mochizuki, Yachi, & Oshima, 2008). El porcentaje de aislamiento de la bacteria nos indica que *Bordetella Bronchiseptica* no es o no está asociada con las principales causas de enfermedad del tracto respiratorio de los caninos en centros de recate. Probablemente la inmunización contra la bacteria no sea estrictamente necesaria dentro del calendario de vacunación de un paciente. Mónica Bhardwaj, en su estudio “Deficiente Asociación entre la infección de *Bordetella bronchiseptica* y la presencia de tos de las perreras en el norte de India”, recomienda que se realicen estudios más profundos para probar esta afirmación. (Bhardwaj, 2013).

La literatura sugiere que los cachorros y gerontes suelen ser más susceptibles a la infección por *Bordetella bronchiseptica* (Fuentes, Jhonson, & Dennis, 2010) (Crestoni & Dall Acqua, 2004), pero en este estudio, mediante la prueba estadística de chi cuadrado, se determinó que no existe asociación entre la edad y presencia de la bacteria, aislándose en cachorros, adultos o gerontes sin



propensión alguna, lo cual concuerda con la investigación de Mochisuki y colaboradores.

Bhardwaj, en su investigación, afirma que si existe una correlación entre el sexo y la presencia de la bacteria, siendo las hembras más susceptibles a la misma; pero en este trabajo se observa que no existe asociación estadística entre las dos variables, presentándose de la misma forma en hembras y machos.

Se sugiere a la amoxicilina más ácido clavulánico, tetraciclinas o penicilina como primera opción en la terapia antibiótica contra *Bordetella bronchiseptica*. (Mauro, 2006). Pero en las pruebas de sensibilidad realizadas a nuestros aislados se observó que estos antibióticos no inhiben el crecimiento bacteriano, siendo resistentes a estos quimioterapéuticos. Mientras que la ciprofloxacina, gentamicina y azitromicina son los que generaron mayor susceptibilidad, esta diferencia en los resultados puede deberse a la amplia gama de tratamientos previamente aplicados a los pacientes para diferentes procesos infecciosos, a los cuales se encuentran expuestos debido a las condiciones del medio.



6. CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos en la presente investigación se concluye que *Bordetella bronchiseptica* no es o no está asociada como principal agente etiológico de traqueobronquitis infecciosa conocida como *Tos de las perreras*.

El mejor sitio y la muestra para el aislamiento de *Bordetella bronchiseptica* son la cavidad y el exudado nasal.

No existe asociación entre la edad y la presencia de *Bordetella bronchiseptica*.

No existe asociación entre el sexo y la presencia de *Bordetella bronchiseptica*.

Los aislados de *B. Bronchiseptica* presentaron sensibilidad en el siguiente orden

1) Ciprofloxacina e Imipenem, 2) Azitromicina y Gentamicina, 3) Ácido Nalidixico.



7. RECOMENDACIONES

- Debido a que el porcentaje de aislamientos positivos a *Bordetella bronchiseptica* fue de 9.57%, se puede concluir que la bacteria no es la principal causa de traqueobronquitis infecciosa canina, por lo que se sugiere que se realicen investigaciones para determinar otros posibles agentes causales.
- Si bien *Bordetella bronchiseptica* no es la principal causa de las afecciones respiratorias en los pacientes analizados, su presencia determina que si es necesario incluir la inmunización dentro del protocolo de vacunación; con el objetivo de controlar los pocos casos que se presentan y lograr una erradicación completa de la bacteria dentro de población de los centros de rescate de la ciudad.
- Se recomienda que frente a los pacientes que presenten afecciones respiratorias, no se inicie un tratamiento sin antes realizar pruebas de sensibilidad antibiótica, con la finalidad de evitar el desarrollo de resistencias bacterianas, incrementar la efectividad y reducir los costos de dichos tratamientos.



8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bagcigil, F., Sennazli, G., & Metiner, K. (2001). A case of death caused by Bordetella Bronchiseptica in a dog. *J.Fac.Med. Istanbul Univ.*, 75-83.
2. Bhardwaj, M. (2013). "Poor Association of Bordetella Bronchiseptica Infection with Kennel Cough in Dogs in Northern India". *Universal Journal of Microbiology Research*, 10-14.
3. Bhardwaj, M., Singh, B. R., & Vadanna, P. (2013). Bordetella Bronchiseptica and Kennel Cough in Dogs. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 1-4.
4. Cercenado, E., & Saavedra, J. (2009). Interpretación del antibiograma: conceptos generales. *An Pediatr Contin.*, 214-217.
5. Chalker, V., Toomey, C., & Brooks, H. (2003). Respiratory Disease in Kennelled Dogs: Serological Responses to Bordetella bronchiseptica Lipopolysaccharide Do Not Correlate with Bacterial Isolation or Clinical Respiratory Symptoms. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 352-356.
6. Couto, G., & Nelson, R. (2000). *Medicina Interna de Animalñes Pequeños*. Buenos Aires: inter-médica.
7. Crawford, C. (2013). Canine respiratory Infections inm animal Shelters. *Maddie's Shelter Medicine Program, College of Veterinary medicine University of Florida*, 1-6.



8. Crestoni, S., & Dall Acqua, S. (2004). Traqueobronquite infecciosa canina – revisão. *Rev Inst Ciênc Saúde*, 279-285.
9. D Vieson, m., Piñeyro, p., & LeRoith, t. (2012). A review of the pathology and treatment of canine respiratory infections. *Veterinary Medicine Research and reports*, 25-39.
10. Díaz, d., & San Andres, d. (07 de MAYO de 2009). *TERAPÉUTICA ANTIBIÓTICA DE INFECCIONES RESPIRATORIAS EN CANINOS Y FELINOS*. Recuperado el 05 de SEPTIEMBRE de 2015, de PORTALFARMA: <https://botplusweb.portalfarma.com/Documentos/2009/5/7/38629.pdf>
11. Fernadez, A., & García, C. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Procedimientos en Microbiología Clínica*.
12. Fingerman, m. (2011). *caracterizacion molecular y funcional de l arespuesta a la acides en bordetella bronchiseptica. posible rol en la infeccion persistente*.
13. Ford, R. (2010). TIC: un nuevo mirar sobre un antiguo problema. *Focus*, 37-40.
14. Fuentes, V., Jhonson, L., & Dennis, S. (2010). *Canine and Feline Cardiorespiratory Medicine*. VIRGINIA: BSAVA.
15. Fuentes, V., Jhonson, L., & Dennis, S. (2010). *manual of canine and feline cardiorespiratory medicine*. BSAVA.
16. García de la Osa, M. (2002). Oxigenoterapia en medio hospitalario. *Revista Cubana de Medicina*, 42.



17. Gastón, A., Mora, L., & Court, A. (1996). Estudio de la Flora Bacteriana Secundaria en el Distemper y la sensibilidad a los antibióticos. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 131-133.
18. Gross, R., Keidel, K., & Schmitt, K. (2010). Resemblance and divergence: the “new” members of the genus *Bordetella*. *Med Microbiol Immunol*, 155-163.
19. Haines, West, & Ellis. (2001). Effect of vaccination on experimental infection with *Bordetella bronchiseptica* in dogs. *J AM Vet Med Assoc*, 367-375.
20. Hurley, K., & Miller, L. (2009). Disease management in animal shelters. En K. Hurley, & L. Miller, *Infectious disease management in animal shelters* (págs. 5-10). Iowa: Wiley Blackwell.
21. Hurley, K., & Miller, L. (2009). *Infectious Disease Management in Animal Shelters*. Iowa: Wiley-Blackwell.
22. King, J., Vinogradov, E., & Preston, A. (2008). Post-assembly Modification of *Bordetella bronchiseptica* O Polysaccharide by a Novel Periplasmic Enzyme Encoded by *wbmE*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2-11.
23. Koneman, E., & Allen, S. (2008). *Diagnóstico Microbiológico*. Madrid: Panamericana.
24. Larson, L., Thiel, B., Sharp, P., & Schultz, R. (2013). A Comparative Study of Protective Immunity Provided by oral, Intranasal and Parenteral Canine *Bordetella Bronchiseptica* Vaccines. *Intern J Appl Res Vet Med*, 153-160.



25. Lugo, S., & Peña, J. (2007). Bordetella bronchiséptica en animales de laboratorio. *CENPALAB*.
26. Mattoo, S., & Cherry, J. D. (2005). Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infection due to B. Pertussis and other bordetella subespecies. *Clinical microbiology reviews*, 326-382.
27. Mauro, D. L. (2006). Manejo de la traqueobronquitis infecciosa canina (TIC) "Tos de. *REDVET*.
28. Mochizuki, M., Yachi, A., & Oshima, T. (2008). Etiologic Study of Upper Respiratory Infections of Household Dogs. *J. Vet. Med. Scientist*, 563-569.
29. Molina, G. (2006). Aislamiento y caracterización de cepas de Bordetella Bronchiseptica en perros. *vetmex*.
30. Nelson, R., & Couto, G. (2010). *Medicina Interna de Pequeños Animales*. Río de Janeiro: Elsevier.
31. OLmos, A., & De la Fuente, C. (2010). *Métodos de Identificación Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología*. eimic.
32. OMS. (2003). *Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la salud Publica en el Mundo en Desarrollo*. Atlanta.



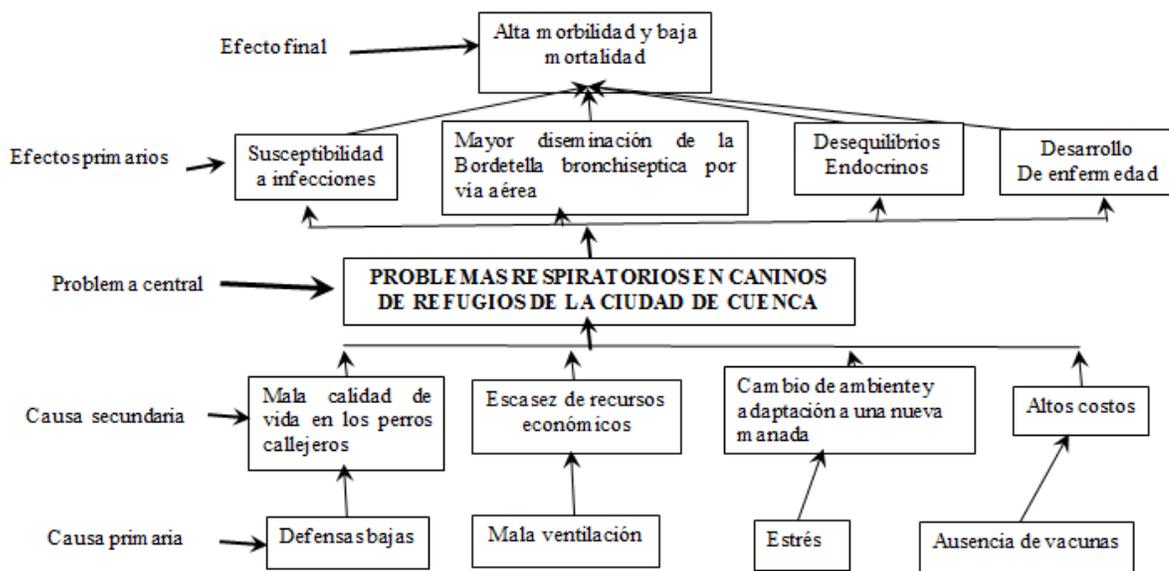
33. OMS. (abril de 2015). *Resistencia a los Antimicrobianos*. Recuperado el 15 de noviembre de 2015, de Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
34. Quinn, P. J., Markey, B. K., & Leonard, F. C. (2011). *Veterinary microbiology and microbial disease*. oxford: wiley-blackwell.
35. Rapuntean, G., Cosmina, C., Nadas, G., & Calina, D. (2006). Biochemical Test Used For Identification Of Bordetella Bronchiseptica. *Buletinul USAMV-CN*, 67-70.
36. rogg, h. w. (2000). *Manual de Entomología Agrícola del Ecuador*. Quito: Abya-Yala.
37. Ruíz, M. A. (2009). Manejo de colectividades Caninas. *Canis et Felis*, 6-31.
38. Sánchez, J., & Feris, J. (1998). Antibiograma: utilidad y limitaciones. *Arch. Dom. Ped.*, 83-87.
39. Schulz, B., Kurz, S., Webewr, K., & Hartmann. (2014). Detection of respiratory viruses and Bordetella bronchiseptica in dogs with acute respiratory infections. *The Veterinary Journal*, 365-370.
40. Sinclair, L. (2000). CONTROL DE INFECCIONES DEL SISTEMA RESPIRATORIO SUPERIOR EN REFUGIOS. *Human Society International, electronic library*.



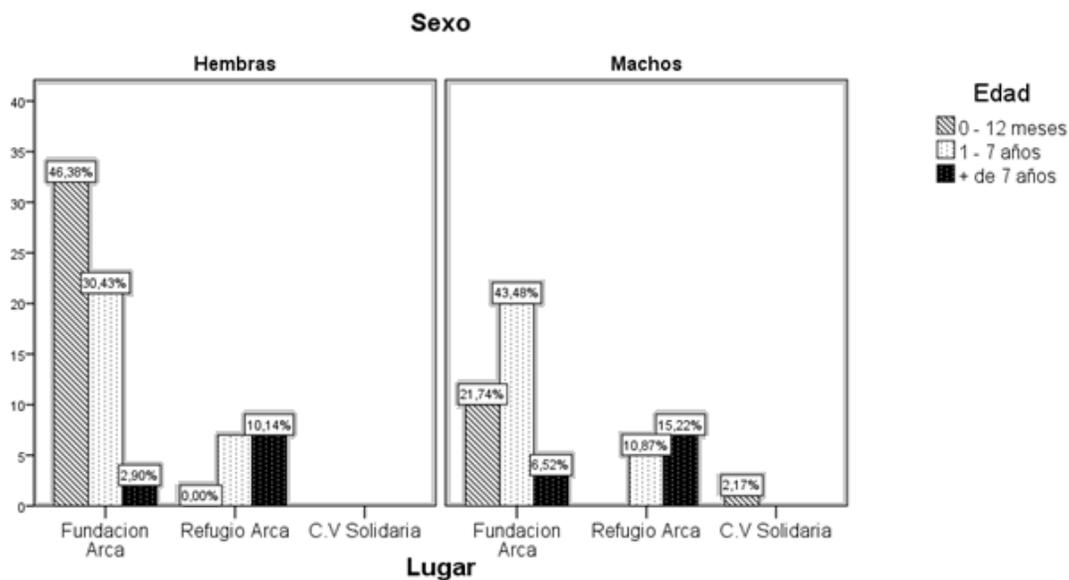
41. Vasanthakumari, R. (2007). *Textbook of microbiology*. Nueva Deli: BI Publications.

9. ANEXOS

Anexo No. 1 Árbol para el planteamiento del problema



Anexo No. 2 Gráfico de caracterización de la muestra de acuerdo a lugar, edad y sexo.





Anexo No. 3 Métodos de preparación de caldos y agares utilizados:

1. Caldo infusión cerebro corazón

1. Se suspendió 37 gramos en un litro de agua purificada en un Erlenmeyer de 1000 CC.
2. A continuación, se mezcló y se procedió a hervir durante 1 minuto para disolver completamente el polvo.
3. Finalmente, se distribuyó en los tubos respectivos y se introdujeron estos en el autoclave a 121 °C., durante 15 minutos

2. Agar MacConkey

1. Se suspendió 50 gramos del polvo en un litro de agua purificada en un Erlenmeyer de 1000 CC.
2. Luego se mezcló y se procedió a hervir durante 1 minuto para disolver completamente el polvo.
3. A continuación se introdujo en el autoclave a 121 °C., durante 15 minutos y se colocó en cajas de Petri estériles.

3. Agar sangre-ovina

1. Se añadió 40 gramos de polvo en un litro de agua purificada en un Erlenmeyer de 1000 cc.



2. A continuación se mezcló e hirvió durante 1 minuto para disolver completamente el polvo.
3. Luego se introdujo en el autoclave a 121°C ., durante 15 minutos.
4. Se dejó reposar la base de agar sangre a temperatura ambiente hasta que llegó a enfriarse entre 45 a 50°C , e inmediatamente se agregó asépticamente sangre ovina al 5% y se homogenizo adecuadamente.
5. Finalmente se colocó en cajas de Petri estériles.

4. Urea agar base

1. Se disolvió 29 gramos de urea en 100 ml de agua destilada y se esterilizo por filtración.
2. A continuación se suspendió 15 gramos del agar base de urea en 900 ml de agua purificada y se autoclavará a 121°C por 15 minutos.
3. Luego se enfriará el agar base de urea a 50°C y se añadirá los 100 ml de la urea estéril.
4. Se mezclará bien y se distribuirá asépticamente en tubos estériles.
5. Los tubos con los medios se procederán a enfriar en una posición inclinada, de manera que se forme el bisel respectivo.



5. Agar citrato de Simmons

1. Se suspendió 24,2 gramos del polvo en 1 litro de agua purificada.
2. Luego se calentó con frecuente agitación y se procedió a hervir por 1 minuto para disolver completamente el polvo.
3. Se colocó en tubos estériles y se introdujeron en el autoclave a 121 °C por 15 minutos.
4. Los tubos se los enfriaron en posición inclinada con lo que se formaron en bisel.

6. Caldo malonato

1. Se suspendió 8 gramos del polvo en 1 litro de agua purificada, luego se mezcló.
2. Se agitó, luego se procedió a hervir por 1 minuto para disolver completamente el polvo.
3. A continuación se colocó en los tubos bacteriológicos y se introdujeron en el autoclave a 121 °C por 15 minutos.

7. Caldo nitrato

1. Se disolvió 9 gramos del polvo en 1 litro de agua purificada.
2. Luego se colocó en los tubos bacteriológicos y se introdujo en el autoclave



a 121 °C por 15 minutos.

8. Motility Test Medium

1. Se agregó 22 gramos del polvo en 1 litro de agua purificada y se procedió a mezclar.
2. Se calentó y se agitó frecuentemente, a continuación hirvió por 1 minuto hasta disolverse completamente el polvo.
3. El medio se colocó en tubos estériles y se introdujo en el autoclave a 121 °C por 15 minutos.
4. Los tubos se los enfriaron en posición vertical.

9. Agar MuellerHinton

1. Se suspendió 38 gramos del polvo en 1 litro de agua purificada y se procedió a mezclar.
2. Se calentó y se agitó frecuentemente, a continuación hirvió por 1 minuto hasta disolverse completamente el polvo, luego se introdujo en el autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
3. El medio se lo colocó en cajas de Petri estériles

10. Solución estándar de turbidez de sulfato de bario McFarland 0,5

- Se utilizaron tubos estériles.
- Se obtuvo la solución estándar de turbidez de sulfato de bario McFarland



0.5 para lo cual se añadió 0.5 ml de cloruro de bario (BaCl_2) 0.048 mol/L (1.175% w/v $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 99.5 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.18 mol/L (0.36 N) (1% v/v).

- Cloruro de bario al 1.175% quiere decir que se pesa 1.175 gramos de cloruro de bario y se diluirá en 100 ml.
- Como se necesitó 0.5 ml de cloruro de bario al 1.175% realizamos lo siguiente

$$\begin{array}{rcl} 1.175 \text{ gramos } \text{BaCl}_2 & & 100 \text{ ml de agua destilada} \\ X & & 10 \text{ ml de agua destilada} \\ X = 0.1175 \text{ gramos } \text{BaCl}_2 & & \end{array}$$

- De la cantidad obtenida de 0.1175 gramos de BaCl_2 se diluyó en 10 ml de agua destilada y de esta se utilizará 0.5 ml de BaCl_2 al 1.175%
- Para el ácido sulfúrico se procedió de la siguiente manera:

$$\begin{array}{rcl} 95\% \text{ concentración} & & 100 \\ 1\% \text{ necesitamos} & & X = 1.05 \text{ H}_2\text{SO}_4 \end{array}$$

- 1.05 de H_2SO_4 se llevó a 100 ml de agua destilada y de esto se tomó 99.5 ml de H_2SO_4 que se encontró al 1%.
- Entonces la solución estándar se trata de: añadir 0.5 ml de Cloruro de Bario al 1.175% a 99.5 ml de ácido sulfúrico al 1%.
- Mediante un espectrofotómetro se verificó la densidad correcta de la solución estándar de turbidez de sulfato de bario McFarland 0.5, para el efecto con un haz luminoso de 1 centímetro y la cubeta correspondiente,



se determinó la absorbancia, para el efecto se utilizará 625 nm., y deberá ser de 0.08 a 0.10 para la solución estándar McFarland 0.5

- Se colocó de 4 a 6 ml en tubos con tapón de rosca, del mismo tamaño de los utilizados para cultivar o diluir el inóculo en cultivo de caldo.
- Luego se cerró bien los tubos y se almacenó en cámara oscura, a temperatura ambiente.
- Se agitó vigorosamente la solución estándar de turbidez, inmediatamente antes de utilizar.

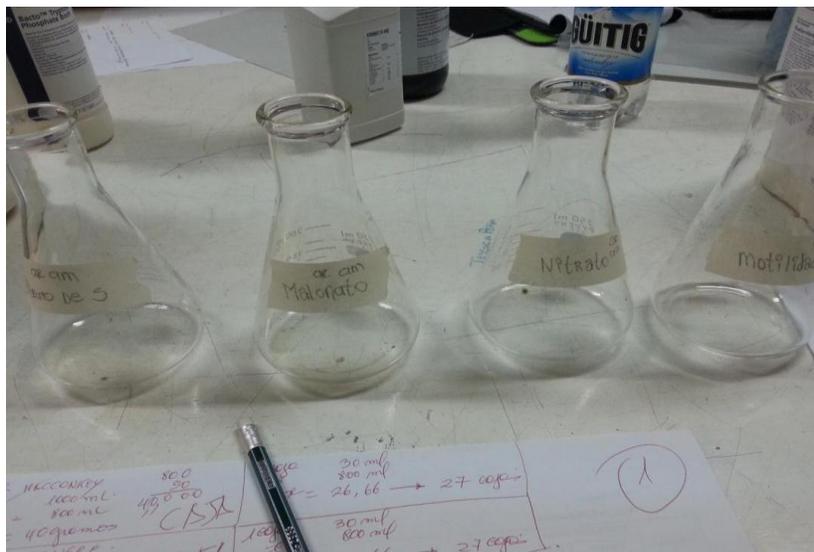
11. Caldo con fosfato de Triptosa

1. Se disolvió 29,5 gramos del polvo en 1 litro de agua purificada.
2. Luego se colocó en tubos bacteriológicos y se introdujo en el autoclave a 121°C por 15 minutos.
- 3.

Anexo No. 4 Pesaje de agar urea para su preparación



Anexo No. 5 Rotulación de Erlenmeyer para la preparación de medios de cultivo



Anexo No. 6 Medios de cultivo



Anexo No. 7 Tubos de ensayo con medios de transporte (Infusión cerebro corazón)



Anexo No. 8 Tubos bacteriológicos con agar nutritivo



Anexo No. 9 Tubos bacteriológicos con agar citrato de Simmons



Anexo No. 10 Asas de platino



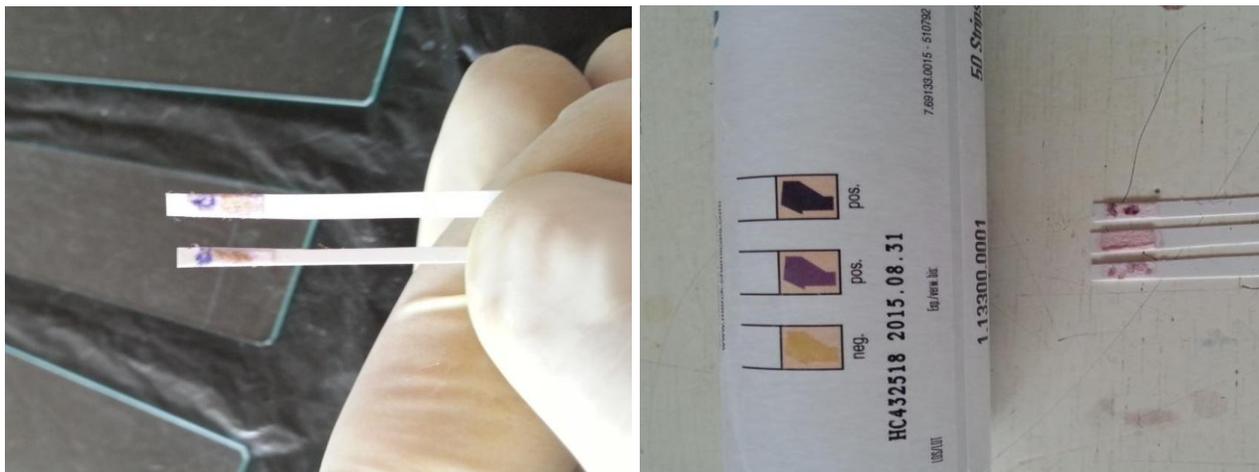
Anexo No. 11 Mechero Bunsen



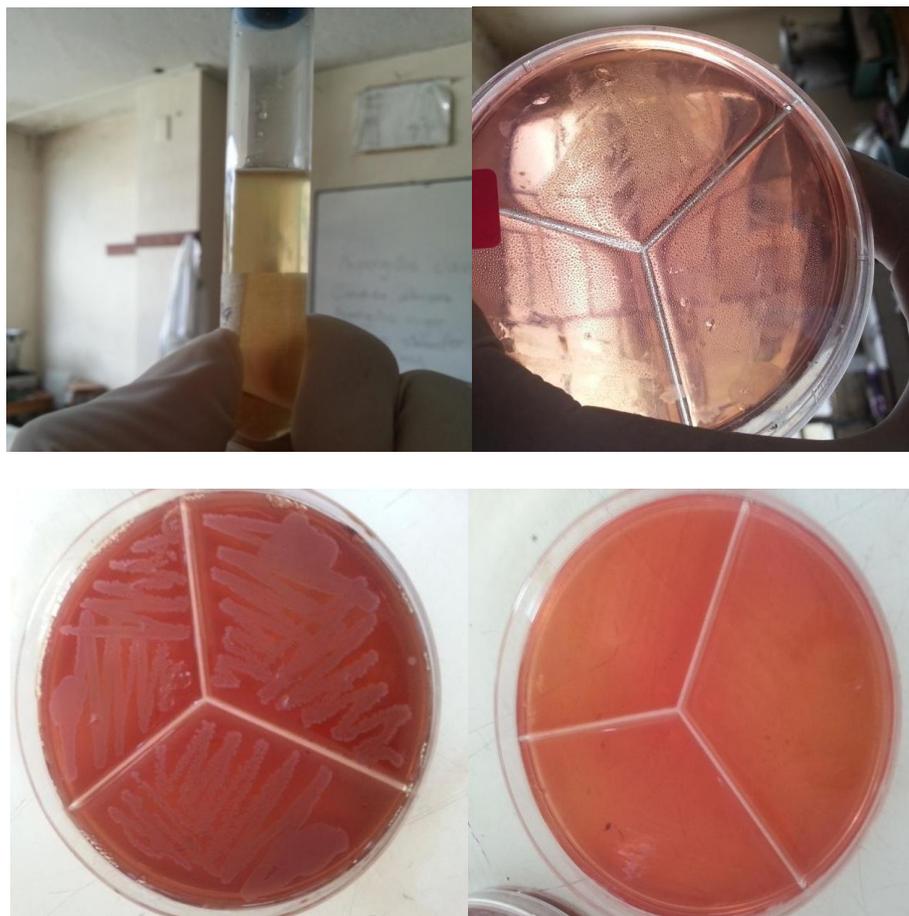
Anexo No. 12 Prueba Catalasa positiva



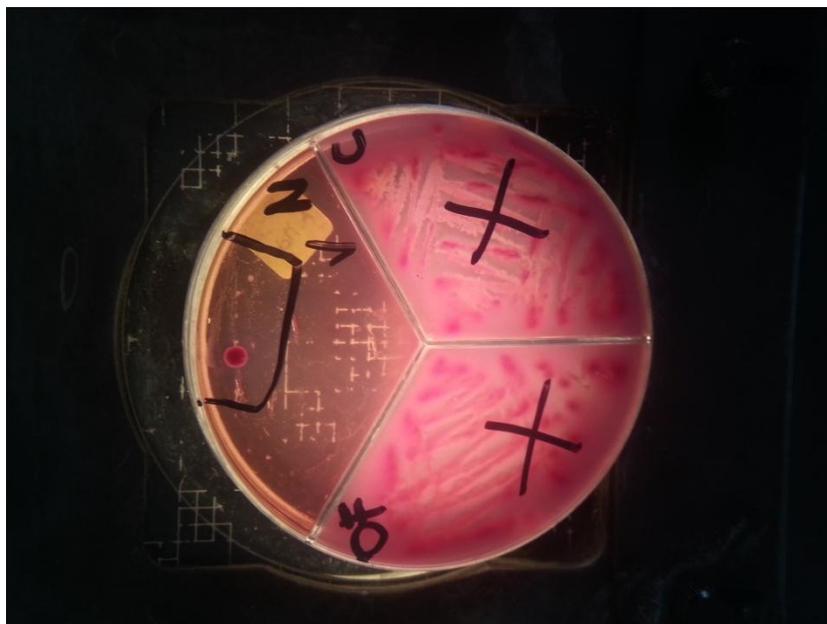
Anexo No. 13 Prueba Oxidasa positiva



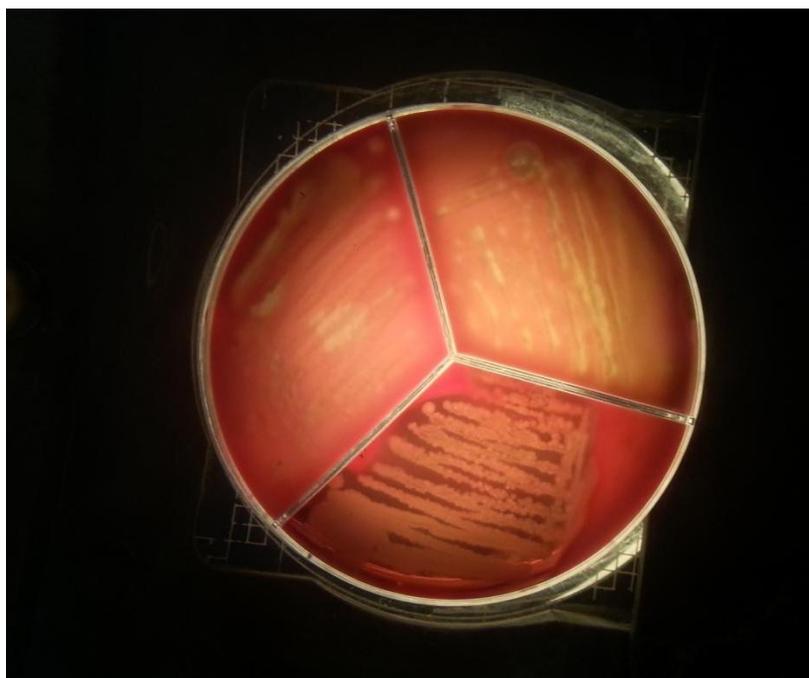
Anexo No. 14 Cultivo y siembra de cepa estándar de Bordetella Bronchiseptica



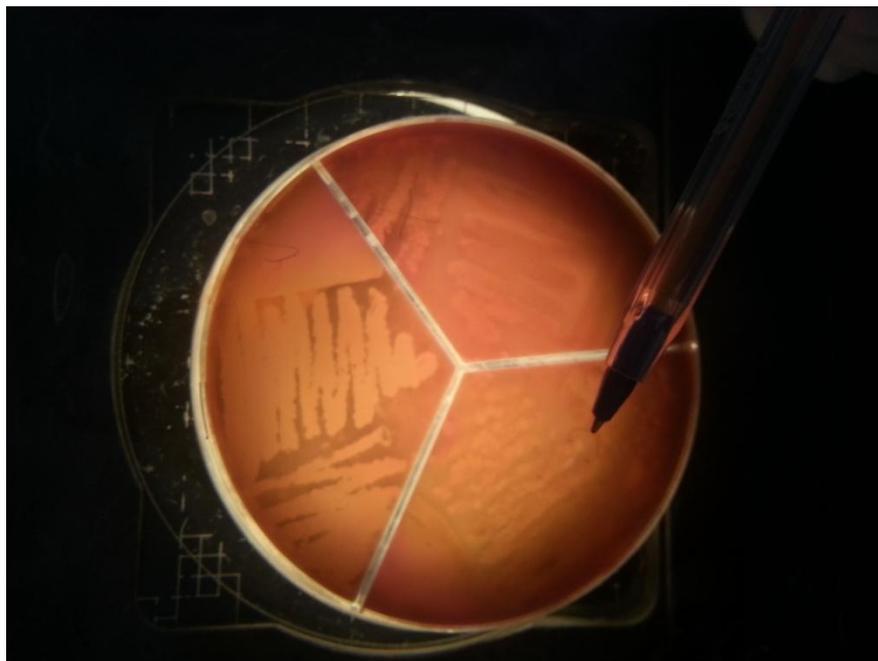
**Anexo No. 15 Cultivo bacteriológico, colonias bacterianas lactasa positivas
(negativas para el estudio)**



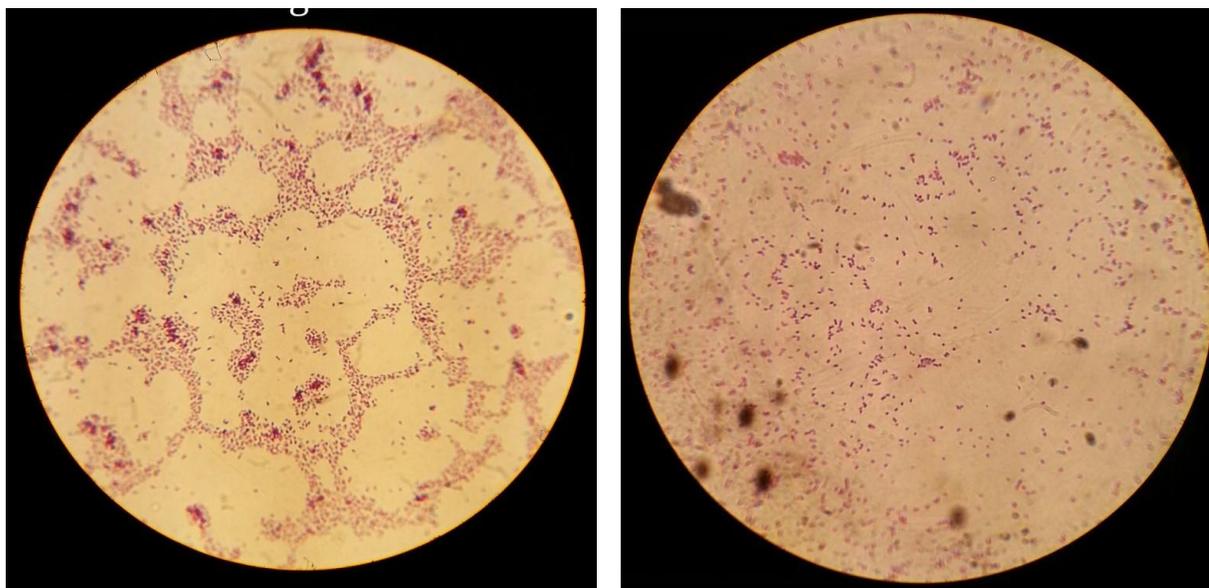
Anexo No. 16 Cultivo bacteriológico, colonias con presencia de hemolisis



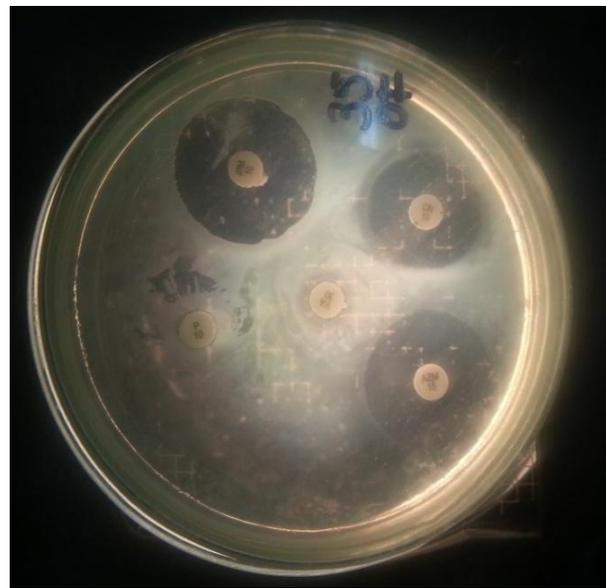
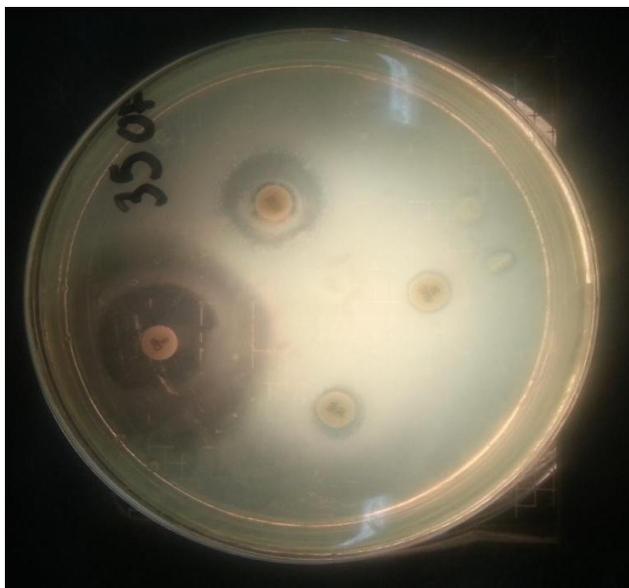
Anexo No. 17 Cultivo bacteriológico, colonias con hemolisis



Anexo No. 18 Tinción de gram (Cocobacilos gram negativos)



Anexo No. 19 Antibiograma (Halo de inhibición antibiótica)



Anexo No. 20 Localidades





Centro de Rescate
Clínica Veterinaria Solidaria



Centro de Rescate
Clínica Veterinaria Solidaria



Centro de Rescate
Clínica Veterinaria Fundación ARCA



Centro de Rescate
Clínica Veterinaria Fundación ARCA