

AISLAMIENTO DE MYCOBACTERIUM BOVIS EN LECHE DE BOVINOS TUBERCULINO POSITIVOS CON PRESENCIA DE MASTITIS CRONICA

Carlos Torres B. (1)
Rubén Clavijo. (1)
Víctor Cotrino B. (2)

INTRODUCCION

La tuberculosis bovina es una enfermedad infecto-contagiosa de curso crónico, cuyo agente etiológico es casi exclusivamente el **Mycobacterium bovis** pero en zonas donde se ha erradicado, aumenta la importancia relativa de las producidas por el **M. avium** y **M. tuberculosis**.

Comprobada la existencia de tuberculosis bovina en Colombia, conociendo el problema que representa las leches de animales tuberculosos en salud humana y teniendo en cuenta el alto porcentaje de leche cruda expendida a los consumidores, se realizó éste estudio tendiente a demostrar la eliminación de **M. bovis** a través de la leche.

El trabajo tiene como finalidad establecer el número de vacas en producción que eliminan **M. bovis** por la leche, teniendo en cuenta la positividad ó negatividad a la prueba de tuberculina y el estado clínico de la ubre.

(1) Estudiantes que adelantaron el proyecto como tesis de grado.

(2) Profesor Asistente Facultad de Medicina Veterinaria Universidad Nacional. Director de Tesis.

MATERIALES Y METODOS:

Se estudiaron 70 vacas en producción, realizando dos tomas de leche con intervalo de tres semanas para un total de 140 muestras examinadas.

Los animales pertenecían a dos fincas contiguas, ubicadas en el Municipio de Simijaca (Cundinamarca) que estaban bajo control del ICA por presentar 53.9% de animales tuberculino-positivos de un total de 1.000 animales.

La historia clínica, la prueba de tuberculina en el pliegue anocaudal y la prueba de mastitis California, fueron los parámetros que se tuvieron en cuenta para seleccionar los cuatro grupos siguientes: el primer grupo, conformado por 40 animales que correspondían al total de animales que presentaron mastitis crónica y reacción positiva a la prueba de tuberculina; el segundo grupo integrado por 10 animales con mastitis crónica y reacción negativa a la prueba de tuberculina; el tercer grupo lo componían 10 animales sin mastitis crónica y reacción positiva a la tuberculina y el cuarto grupo lo integró 10 animales sin mastitis y reactivos negativos a la prueba de tuberculina. Los tres últimos grupos se conformaron al azar.

AISLAMIENTO DE MYCOBACTERIAS

A cada una de las vacas se le recolectaron 50 ml. de leche en cantidades proporcionales de los cuatro cuartos. Las muestras se centrifugaron a 530 g por 5 minutos y de una parte del sedimento obtenido se realizaron frotis que se colorearon por el método de Ziehl-Neelsen (Z. N) para su posterior examen microscópico y determinación de bacilos ácido alcohol resistentes (3). La parte restante del sedimento se descontaminó con hidróxido de sodio al 4.0% por 10 minutos a 37°C, y se neutralizó con ácido clorhídrico al 0.2% y como indicador de pH, rojo de fenol al 1.0%. Una vez neutralizada la muestra se centrifugó nuevamente a 2.132 g por 10 minutos (3). De éste sedimento final se sembraron tubos de tapa rosca con medio Lowenstein-Jensen con piruvato y se inocularon cobayos vía intra muscular con

1.0 ml. La lectura de los medios de cultivo que se llevaron a incubación a 37°C, se efectuó diariamente por la primera semana para determinar la presencia de Mycobacterias rápido-creedoras y luego cada 3 días por las siete semanas restantes de incubación.

El estado clínico de los cobayos se observó diariamente durante 138 días. Tres semanas post-inoculación se efectuaron pruebas tuberculínicas intradérmicas comparativas en los cobayos, utilizando tuberculina del centro Panamericano de Zoonosis "Cepanzo", así: 1.0 mg/ml. de PPD bovino se diluyó 125 veces y 0.5 mg/ml. de PPD Aviar se diluyó 62.5 veces con agua destilada estéril. Logradas las diluciones se inyectó 0.2 ml. de cada una de las tuberculinas en el costado de los cobayos en línea horizontal. Las lecturas de la prueba se realizaron a las 24 horas midiendo el diámetro eritemal.

Los cobayos que murieron a causa de las lesiones y los que se sacrificaron, se les realizó una minuciosa necropsia, obteniendo tejidos para realizar impresiones y su posterior examen baciloscópico (coloración de Z.N), examen histopatológico y siembras tisulares en medios Lowenstein-Jensen y Stonebrink.

TIPIFICACION DE LAS CEPAS AISLADAS:

Se realizaron las observaciones siguientes: examen baciloscópico de los frotis de leche e impresiones de órganos lesionados (Ziehl Neelsen), examen histopatológico para observar el poder patógeno de destrucción tisular, tiempo de aparición de colonias en los medios Lowenstein-Jensen con piruvato, Lowenstein Jensen y Stonebrink, morfología de las colonias, temperatura óptima de crecimiento (37 y 45°), comparación de crecimiento de las colonias en los tres medios empleados, cromogenidad y fotocromogenidad, prueba de niacina (3,4), prueba de catalasa a temperatura ambiente (4,5) catalasa inactivada a 68°C (4,5), nitrato reducción (5), hidrólisis del Tween 80 (5) y prueba biológica tomada como base para la clasificación de la virulencia de las cepas para el cobayo (4,7).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Al examen de las 420 láminas (3 frotis por muestra de leche) coloreadas con Ziehl-Neelsen, solamente una lámina presentó bacilos ácido alcohol resistente. Si se compara éste resultado obtenido con el diagnóstico de aislamiento en los medios de cultivo y la inoculación en cobayos, el examen microscópico de los sedimentos de leche tiene una co-positividad de 12.5% y de 11.1% respectivamente, haciéndose evidente la baja sensibilidad de éste método de diagnóstico para **M. bovis**. Un total de 16 sedimentos de leche (11.43%), presentaron crecimiento de microorganismos ácido alcohol resistentes, entre la segunda y octava semana de incubación, en el medio de Lowenstein Jensen más piruvato. Realizadas las pruebas microbiológicas para su clasificación, ocho cepas se reconocieron como Mycobacterias atípicas y ocho como **M. bovis** correspondientes a 5 animales, confirmándose así la presencia de **M. bovis** en leche de bovinos (2).

El aislamiento por cultivo, analizado según el número de muestras, tiene una co-positividad del 88.8% frente al aislamiento por inoculación en cobayos y del 100% si se analiza por el número de animales diagnosticados como positivos a **M. bovis** en el primero y segundo muestreo. Esto demuestra la mayor sensibilidad del aislamiento por inoculación en cobayos frente a otros métodos de diagnóstico, hecho que está de acuerdo con lo reportado en otros estudios (3.4.5).

Las muestras que presentaron aislamiento de Mycobacterias atípicas ó **M. bovis**, provenían de animales positivos a la prueba de tuberculina anocaudal. No se aislaron Mycobacterias en leches de ninguno de los animales tuberculino negativos con ó sin mastitis.

La tabla 1, relaciona el estado de la ubre, las pruebas de tuberculina, el tiempo de aparición de colonias y lesiones en el cobayo en el primer y segundo muestreo.

La tabla 2, muestra las características microbiológicas, y biológicas que se tuvieron en cuenta para la clasificación de las mycobacterias aisladas. Una vez más se

evidenció la poca afinidad del **M. bovis** por los medios con glicerol (4).

De los 140 cobayos inoculados con los sedimentos de leche, solamente nueve animales fueron reactores positivos a la tuberculina mamífera y negativos a la aviar en la prueba intradérmica comparativa e igualmente presentaron lesiones macro y microscópicas propias de una infección tuberculosa activa. La Tabla 3, muestra los resultados de las pruebas de tuberculina comparativa, la severidad de las lesiones (signos) y la lectura semicuantitativa de la baciloscopia de los diferentes órganos de los cobayos y su correspondiente número de vaca, que una vez realizadas las pruebas para la tipificación del germen, se identificaron como eliminadoras de **M. bovis**.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

Por primera vez en el país, se realizó una investigación para aislar e identificar **M. bovis** en leches pertenecientes a animales tuberculino positivos con y sin mastitis clínica y para comparar los hallazgos frente a animales tuberculino negativos con y sin mastitis.

De los 50 animales tuberculino positivos examinados, se aisló e identificó **M. bovis** en 5 vacas, cuatro con mastitis clínica y una sin manifestación clínica de la glándula mamaria.

El hecho de aislar **M. bovis** en un 10.0% de los animales tuberculino positivos, y por las implicaciones patológicas para la salud humana, se hace necesario que las entidades de salud, tomen acciones inmediatas tendientes a: Intensificar la campaña de tuberculinización en bovinos para conocer la real incidencia de la tuberculosis bovina en en país; proyectar e implementar legalmente y ejecutar una campaña tendiente a la erradicación de la enfermedad; tomar las acciones conducentes para evitar el comercio de leche cruda y establecer políticas de control médico para el personal que labora en fincas donde se detecten animales positivos a la prueba de tuberculina.

El método de diagnóstico por inoculación de cobayos es la prueba que ofrece la

mayor sensibilidad. El examen de frotis teñidos con Ziehl-Neelsen, por presentar una co-positividad tan baja con relación a las otras técnicas de diagnóstico no se recomienda como método diagnóstico para detectar animales que eliminan *M. bovis* a través de la leche.

El diagnóstico por cultivo realizado en forma seriada en el mismo animal tiene una co-positividad del 100.0% frente al aislamiento en cobayos, no así en muestras independientes donde la co-positividad fué del 88.8%.

La prueba de tuberculina comparativa en los cobayos, detectó la totalidad de los animales que desarrollaron lesiones tuberculosa por inoculación de los sedimentos de leche.

RESUMEN

En el presente trabajo se trata de determinar el número de animales que eliminan *M. bovis* a través de la leche, con las siguientes características: animales tuberculino positivos con ó sin mastitis clínica y animales tuberculino negativos con y sin mastitis clínica.

Del total de muestras sembradas con el sedimento de las leches se obtuvieron 8 cepas clasificadas como *M. bovis* y 8 cepas de Mycobacterias atípicas. Todas las cepas patógenas para el cobayo correspondieron a *M. bovis* pertenecientes a éstas cepas a cinco vacas.

Tabla 1. Prueba de tuberculina y estado de la ubre de los bovinos con respecto al tiempo de aparición de colonias Ziehl-Neelsen positivas, y patogenicidad para el cobayo a partir de sedimento de leche.

Vaca No.	Prueba M.C.T.*	Tuberculina simple caudal (mm)	<u>Primer muestreo</u>		<u>Segundo muestreo</u>	
			Tiempo de aparición colonias (días)	Lesiones tiempo en días	Tiempo de aparición colonias (días)	Lesiones tiempo en días
A-23	-	15.3	50	84 ⁽¹⁾	Estéril	No. ⁽²⁾
73	+	13.7	14	No. ⁽²⁾	14	No.(2)
122	+	11.2	50	81 ⁽¹⁾	Estéril	93(2)
194	-	13.3	13	No ⁽²⁾	13	No.(2)
384	+	26.4	56	82 ⁽¹⁾	50	93(2)
657	+	27.0	57	92 ⁽¹⁾	53	100(2)
884	-	5.8	13	No. ⁽²⁾	Estéril	No(2)
926	-	12.0	14	No. ⁽²⁾	Estéril	No.(2)
944	+	20.8	60	80 ⁽¹⁾	59	138(2)
1716	-	8.2	14	No. ⁽²⁾	14	No.(2)

(1): Tiempo de muerte de los cobayos, debidas a las lesiones

(2): Tiempo al sacrificio

*: Prueba de Mastitis California

Tabla 2. Características microbiológicas de las colonias aisladas a partir del sedimento de leche.

Características	Crecimiento entre 13-14 días de incubación a 37°C		Crecimiento entre 50-60 días de incubación a 37°C
	Pigmentadas	No pigmentadas	No pigmentadas
Crecimiento en L.J.*	+	+	-
Crecimiento en L.J.P.**	+	+	+
Morfología de colonias	Lisas a ásperas, húmedas	Lisas, convexas y húmedas	Blancas, húmedas y convexas resistentes
Morfología celular	Bacilos	ácido alcohol	
Crecimiento en L.J.P. a 37°C	+	+	+
Crecimiento en L.J.P. a 45°C	-	±	-
Producción de pigmento con luz	+	-	-
Producción de pigmento sin luz	+	-	-
Prueba de Niacina	-	-	-
Patogenicidad para el cobayo	-	-	+
Tuberculina mamífera (cobayos)	-	-	+
Tuberculina aviar (cobayos)	-	-	-

* Medio Lowenstein Jensen

** Medio Lowenstein Jensen con piruvato

Se encontró un porcentaje de co-positividad del 11.1% entre la prueba de baciloscopía de los frotis de los sedimentos de leche con respecto a la prueba de inoculación en cobayos, y un porcentaje de co-positividad del 12.5% entre la prueba de baciloscopía de los frotis de los sedimentos de leche con respecto a la prueba de aislamiento en medios de cultivo.

Se encontró un porcentaje de co-positividad del 88.8% entre la prueba de cultivo de los sedimentos de leche con respecto a la prueba de inoculación de cobayos.

Tabla 3. Prueba de tuberculina y baciloscopía en cobayos inoculados con sedimentos del primero y segundo muestreo de animales confirmados como eliminadores de *Mycobacterium bovis* en leche.

Vaca No.	Muestreo	Tubercu-	Tubercu-	Signo*	Baciloscopía a la necropsia			
		lina mamífera	lina Aviar		Bazo	Hígado	Pulmón	Ganglios
A-23	1o.	10.0	2.0	V	++	++	+	++
	2o.	0	0	0	-	-	-	-
122	1o.	10.0	0	V	++	++	+	++
	2o.	13.0	0	I	++	+	+	++
384	1o.	11.0	2.0	V	++	+	-	++
	2o.	9.0	0	II	++	+	-	++
657	1o.	12.0	0	V	++	++	+	++
	2o.	11.0	2.0	III	++	+	-	++
944	1o.	9.0	0	IV	++	-	-	+
	2o.	10.0	0	V	++	++	+	++

* Diferentes grados de tuberculosis en cobayos (según tabla 4).

BIBLIOGRAFIA

- /1/ Buchanan R.E. Bergey's Manual of determinative bacteriology. 8a. ed. Baltimore. Williams y Wilkins. 1974. p. 1268.
- /2/ Botero, G. L. y Diaz, G. F. Atípicas micobacterias en leches. Antioquia. Médica 24 (5): 455-463. 1974.
- /3/ Centro Panamericano de Zoonosis de la OPS-OMS. Diagnosis de laboratorio de la tuberculosis animal. Buenos Aires, 1972. 11 p. (Nota Técnica No. 16).
- /4/ _____ Métodos de laboratorio de Micobacteriología Veterinaria para el aislamiento e identificación de micobacterias. Buenos Aires, 1973. 48 p. (Nota Técnica No. 6).
- /5/ David, H.L. Bacteriology of the Mycobacterises V.S. Departament of Health Education and Welfare. Publication No. 76-8316. 1976. 166 p.
- /6/ Davis et. at. Microbiology. London, Hoeber Medical, 1968. pp. 842-863.
- /7/ Merchant, A., Packer, R. Bacteriología y Virología Veterinaria 3 ed. Zaragoza, Acrliba, 1970. pp. 441-528-529.
- /8/ Rodríguez, G. y col. Tuberculosis bovina en Colombia aislamiento y tipificación del *Mycobacterium bovis* en el Valle de Ubaté. Revista Acovez 3 (9) año 3. 1979.

Servicio de Consulta Externa para grandes animales.

Atención médica - veterinaria, médico quirúrgica, hospitalización, cirugía, Rayos X.

**Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Universidad Nacional de Colombia
Ciudad Universitaria — Bogotá D.E.**

Dr. Mario Pérez P. D.M.V.Z.
Dr. Didacio Arango O. D.M.V.Z.
Dr. Augusto Segura C. D.M.V.Z.
