

# DetECCIÓN DE TUBERCULOSIS BOVINA EN EXUDADO NASAL DE BOVINOS LECHEROS DE LA COMARCA LAGUNERA

## Bovine tuberculosis detection in nasal exudate from dairy cows producers in La Comarca Lagunera

Rodolfo Mendoza-Apolonio<sup>1</sup>, Sara Elisa Alonso-Rojo<sup>2</sup>, Alberto Morales-Loredo<sup>3</sup>, Genoveva Álvarez-Ojeda<sup>3</sup>, Jesús Vásquez-Arroyo<sup>1</sup>

E-mail: jvarroyo@itesm.mx

<sup>1</sup>Depto. de Agroecología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna. Periférico y Carretera a Santa Fe s/n. Torreón, Coah., México. CP 27059. <sup>2</sup>Clínica de Especialidades No. 71. Instituto Mexicano del Seguro Social. Torreón, Coah., México. <sup>3</sup>Centro de Investigaciones Regionales del Noreste-Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. General Terán, Monterrey N.L. México.

### Abstract

The bovine tuberculosis is an infect-contagious illness of progressive chronic course, that affects a great quantity of animal species including man, this disease is caused by *Mycobacterium bovis*; the main cause of death is considered due to a single infectious agent. In addition causes economic losses in the livestock industry, in both dairy and beef cattle. The objective was to determine the presence of the complex of *Mycobacterium tuberculosis* in having perspired nasal by means of the stain of Ziehl-Neelsen and cultivation in Middlebrook 7H10. Eighty five cows from three stables were analyzed. From these 70 have tested positive and 15 have tested, negative, which were used as control group. Nasal simples were taken with sterile hyssops of 15 cm and transferred to tubes with a saline solution 0.85 % these were decontaminated by the method of Pertroff and they prepared smear and put in cultivation tubes. Out of 8 samples analyzed by cultivation were positive presumptively (15 weeks of incubation) at the cultivation and out of 9 positive for Ziehl-Neelsen with a 88.9% sensibility, 18.4 % specificity for cultivation and 71.4 % sensibility with 16.7 % of specificity. It is concludes that the means of Middlebrook 7H10 are inadequate for the growth of *Mycobacterium bovis*.

**Key words:** *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, Ziehl-Neelsen, Resistant Bacillus Acid Alcohol, Middlebrook 7H10.

### Resumen

La tuberculosis bovina es una enfermedad infecto-contagiosa, de curso crónico progresivo que afecta una gran cantidad de especies animales, incluyendo al hombre. Esta enfermedad la genera el *Mycobacterium bovis*. Se considera la causa principal de muerte debido a un solo agente infeccioso, que provoca grandes pérdidas económicas en el sector ganadero, tanto de carne como de leche. El objetivo fue determinar la presencia del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* en exudado nasal mediante la

tinción de Ziehl-Neelsen y cultivo en Middlebrook 7H10. Se analizaron 85 bovinos lecheros provenientes de tres establos, 70 positivos según la campaña nacional contra la tuberculosis, y 15 negativos que se utilizaron como control. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* en exudado nasal, mediante la tinción de Ziehl-Neelsen y cultivo en Middlebrook 7H10. Las muestras se tomaron del exudado nasal con hisopos estériles de 15 cm, que se transfirieron a tubos con solución salina a 0.85 %, se descontaminaron por el método de Pertroff y se prepararon frotis y siembra en tubos de cultivo. Del total de muestras analizadas, siete cultivos fueron presuntamente positivos (15 semanas de incubación) al cultivo, con 71.4 % de sensibilidad y 16.7 % de especificidad, y nueve positivos al Ziehl-Neelsen, con una sensibilidad de 88.9 % y 18.4 % de especificidad. Se concluyó que el medio de Middlebrook 7H10 es inadecuado para el crecimiento de *Mycobacterium bovis*.

**Palabras clave:** *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, Ziehl-Neelsen, Bacilos Acido Alcohol Resistentes, Middlebrook 7H10.

## Introducción

La producción de leche de bovino, es una rama de la ganadería de mayor relevancia a nivel nacional, ya que no sólo se le confiere un alto valor por el tipo de alimento que aporta, sino que juega un papel fundamental dentro de la economía del sector primario e industrial, además de presentar el mayor potencial de expansión a fin de sustituir el importante componente de abasto procedente del exterior (Gallardo-Nieto *et al.*, 2004).

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa granulomatosa crónica, que se desarrolla en un determinado contexto de riesgo ambiental, social, sanitario e individual. Es previsible, curable y su preponderancia tiende a disminuir naturalmente; sin embargo, en las últimas décadas hubo un aumento, tanto en incidencia como en su severidad (Broglia *et al.*, 2002).

La tuberculosis bovina constituye un grave problema de salud animal y un riesgo en la salud pública. El agente causal es el *Mycobacterium bovis*, y esta ampliamente distribuido en México (Estrada-Chávez *et al.*, 2004).

Los métodos que más se usan para el diagnóstico de la tuberculosis se basan, fundamentalmente, en: la identificación del bacilo tuberculoso, la aplicación de la tuberculina, y, con menor frecuencia, en el examen histológico, sin olvidar la baciloscopia mediante la tinción Ziehl-Neelsen, que es una de las herramientas importantes para su detección, la cual tiene gran sensibilidad. (Soto-Ospina, 2002).

La identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* se ha hecho mediante técnicas como PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), cultivo líquido (Sistema BACTEC), pruebas serológicas, entre otras (Badillo-Rosales, 2004).

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* en exudado nasal, mediante la tinción de Ziehl-Neelsen y cultivo en Middlebrook 7H10.

## Metodología Experimental

El presente estudio se realizó en las instalaciones de la Clínica del Seguro Social número 71 y de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, en Torreón, Coah., México.

Se llevó a cabo en tres unidades productivas de la Comarca Lagunera. El presente estudio se realizó con el análisis de 85 animales considerados como positivos por la campaña nacional de tuberculosis. A los 85 animales seleccionados, se les tomó muestras de exudado nasal.

Los animales fueron atrapados para inmovilizarlos. La toma de la muestra se realizó introduciendo el hisopo, en su totalidad, en la nariz del animal, para recolectar el exudado nasal. Una vez tomada la muestra, el hisopo se depositó en un tubo de ensayo con tapón de rosca que contenía 1.5 ml de solución salina al 0.85 %. Para su análisis, cada muestra se mantuvo en hielo durante su transporte al laboratorio.

En las muestras se encontró flora asociada, la cual se eliminó para evitar su crecimiento no deseado en el cultivo, para lo cual se utilizó el método de Petroff, que es el que más se emplea en procedimientos de aislamiento de *M. tuberculosis* a partir de esputo (Cedrés *et al.*, s/f; Palomino and Portaels, 1998).

Las muestras se sembraron sobre agar Middlebrook 7H10 y se colocaron, por triplicado, con una pipeta Pasteur cerca del mechero (Bauer *et al.*, 1997). Se incubaron los tubos de forma inclinada, a 37° C, de 6 a 14 semanas.

La preparación de laminillas se hizo en los establos tomando la muestra de exudado, tanto para el cultivo como para la preparación de frotis, que se colocó inmediatamente en la laminilla ya identificada y se fijó con un mechero de alcohol.

Una vez fijadas, se colocaron los frotis sobre gradilla de acero inoxidable, donde se tiñeron por la técnica de Ziehl Neelsen; los resultados se determinaron de acuerdo con la información de resultados de la técnica de baciloscopia.

Para el análisis de datos, se aplicaron los cálculos para los coeficientes de Cohen's Kappa a fin de determinar especificidad y sensibilidad (Estrada-Chávez *et al.*, 2004).

## Resultados y Discusión

En 1908 Albert Calmette y Camille Guérin comenzaron el cultivo con una cepa virulenta de *Mycobacterium bovis* llamada Lait Nocard, proveniente de una vaca con mastitis tuberculosa, que utilizaron un medio de papa glicerizada. En 1921, después de

13 años y 230 pasajes, el bacilo perdió su virulencia y adquirió capacidad antigénica (Araujo and Waard, 2004). Desde entonces se han realizado una infinidad de trabajos en cultivo con esta bacteria, que han arrojado diferentes resultados.

En el presente estudio se encontraron los resultados siguientes: de las 85 muestras analizadas, siete mostraron presuntamente resultado positivo en el medio de cultivo Middlebrook 7H10. En la técnica de baciloscopia, nueve resultaron positivas. Al realizar comparaciones entre las diferentes técnicas, se encontró que en la prueba de tuberculina un 16.7 % de especificidad para cultivo, un 18.4 % para Ziehl Neelsen, y sensibilidad de 71.4 % y 88.9 %, respectivamente.

La tuberculosis bovina la causa, principalmente, el *Mycobacterium bovis*, aunque también la puede causar el *Mycobacterium tuberculosis*; ambos son capaces de infectar una amplia gama de especies animales incluyendo al hombre. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* en exudado nasal, mediante la tinción de Ziehl-Neelsen y cultivo en Middlebrook 7H10. Es una enfermedad infecciosa importante que ocasiona grandes pérdidas económicas en la industria pecuaria, sobre todo en el ganado bovino (Ramírez-Casillas *et al.*, 2004).

Los recursos financieros totales que se gastaron en 2004 y lo que va de 2005 para la lucha mundial contra la tuberculosis, fueron de 2,200 millones de dólares, con un déficit anual estimado de 800 millones de dólares (OMS., 2005).

Respecto a los resultados que se obtuvieron en el experimento, se deben tomar en cuenta los siguientes factores importantes para el cultivo: la neutralización del pH de las muestras al momento de la descontaminación, ya que los resultados que se obtuvieron pueden atribuirse a esto, debido a variaciones drásticas de pH, así como también a la posible contaminación al momento de determinarlo, lo que ocasionó que se obtuviera un pH de 6.9 hasta 7.5, que es el ideal para cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*, según el Manual de Técnicas y Procedimientos de Laboratorio en Tuberculosis de 1992, de la Secretaría de Salud.

Otro factor que pudo haber afectado es el tiempo que duraron algunas muestras en el hidróxido de sodio, ya que al momento de neutralizar el pH, en muchas ocasiones no se les podía establecer el nivel óptimo de éste, mientras que las muestras que proseguían a la que se estaba neutralizando, demoraban más tiempo en el hidróxido de sodio que las neutralizadas al inicio.

Otro factor que pudo afectar la tinción Ziehl – Neelsen fue la cantidad de muestra que se manejó para la laminilla, ya que no siempre fue posible recolectar 1ml de exudado, y según reportes de la literatura, se necesitan como mínimo 10 000 bacterias por mililitro de muestra para poder identificar el bacilo, mientras que el cultivo requiere de unos pocos cientos de bacilos para su crecimiento en medios sintéticos (Blancarte *et al.*, 1992).

Como se puede observar en este caso, el cultivo presentó menor sensibilidad que la prueba de tuberculina, lo cual demuestra que este medio de cultivo no es muy apropiado para el crecimiento del complejo *Mycobacterium*, así como tampoco lo es la tinción Ziehl Neelsen para el tipo de muestras manejadas bajo estas condiciones.

Las micobacterias son microorganismos de características muy específicas y de crecimiento lento, a pesar de haberles proveído de un medio comercial ya preparado y enriquecido, con el objeto de ofrecerles las mejores condiciones para su crecimiento.

## Conclusiones

El aislamiento del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en el medio de cultivo Middlebrook 7H10 es difícil, por el bajo crecimiento que presenta.

La identificación de bacilos ácido alcohol resistentes, por medio de la baciloscopia con la tinción Ziehl Neelsen, no es apta para el tipo de muestras que se manejó.

La prueba de la tuberculina sigue siendo un método de diagnóstico de amplia sensibilidad y especificidad, con la ventaja de poderla realizar en el campo.

## Literatura Citada

- Araujo, Z., and J. H. Waard. 2004. Curso latinoamericano sobre enfermedades infecciosas. Instituto de Biomedicina, Caracas, Venezuela.
- Badillo-Rosales, O. 2004. Obtención de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de tejidos sospechosos a tuberculosis bovina, en medio de cultivo Lowenstein - Jensen. Tesis de Licenciatura., Univesidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna., Torreón, Coahuila, México.
- Bauer, J., V. O. Thomsen, S. Poulsen, and B. A. Andersen. 1997. False-positive results from cultures of *mycobacterium tuberculosis* due to laboratory cross-contamination confirmed by restriction fragment length polymorphism. J. Clinic. Microbiol. 35: 988-991.
- Blancarte, M., L., J. G. Anzaldo, and S. Balandrano, S. 1992. Manual de técnicas y procedimientos de laboratorio en tuberculosis. Secretaria de Salud. México, D.F.
- Brogliá, B. 2002. Criterios de diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis infantil. Arch. Arg. Pediatr. 2: 159-178.
- Cedrés, J., F. Tuberculosis y leucosis bovina: Confirmación diagnóstica en decomisos de frigorífico (resultados preliminares). Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE. s/n: 1-3.
- Estrada-Chávez, C. et al. 2004. Agreement between PCR and conventional methods for diagnosis of bovine tuberculosis. Vet. Mex. 35: 225-226.
- Gallardo-Nieto, J., L. Villamar-Angulo, H. Pérez-Frías, y E. Olivera-Cázares. 2004. Situación actual de la producción de leche de bovino en México 2004. SAGARPA, México D.F.
- OMS. 2005. Financiación sostenible de la prevención y el control de la tuberculosis. Asamblea Mundial de la Salud. 58: 2-4.
- Palomino, J. C., and F. Portaels. 1998. Effects of decontamination methods and culture conditions on viability of *mycobacterium ulcerans* in the bactec system. J. Clinic. Microbiol. 36: 402-408.
- Ramírez-Casillas, I. C., M. A. Santillán-Flores, C. Arriaga-Díaz., B. Arellano-Reynoso, and F. Morales-Álvarez. 2004. Using a multiplex pcr to differentiate between *m. Bovis* bcg-vaccinated and pathogenic *m. Bovis*-infected goats. Tec. Pec. Mex. 42: 419-428.