

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

V284

AI SLAM I EN TO, TI PI FI CA CI ON Y RE AC CI ON ES DE MI
CO BAC TE RI AS EN BO VI NOS PRO DUC TO RES DE LE CHE.



OFICINA DE
DIFUSION CIENTIFICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

J. JESUS QUINTERO CEDENO

A MI MADRE

SRA. MARIA GUADALUPE CEDEÑO

POR SU ESFUERZO Y APOYO
FACTORES INDISPENSABLES
EN LA CULMINACION DE MI CARRERA.

A LA MEMORIA DE

CUQUITA GARCIA DE CEDEÑO (r)

DANIEL CEDEÑO (r)

A MIS TIOS

MARIA LUISA CEDEÑO GARCIA

LEOBARDO VELASCO DIAZ (f)
CONSUELO CEDEÑO VDA. DE VELASCO

SALVADOR MAGALLANES CEPEDA
ESPERANZA CEDEÑO DE MAGALLANES

JESUS CEDEÑO GARCIA
SANTA TORRES DE CEDEÑO

DANIEL CEDEÑO GARCIA
CARLOTA CRUZ DE CEDEÑO

A MIS PRIMOS

POR SUS CONSEJOS

AL PADRE JORGE VELASCO OLAGUE

A FRAY LEON

CON AGRADECIMIENTO

AL LIC. ISIDRO URZUA URIBE

A CUQUIS

POR SU VALIOSA AYUDA
A LA REALIZACION DE
ESTE TRABAJO.

A MIS COMPAÑEROS DE TRABAJO
DEL LABORATORIO DE PATOLOGIA ANIMAL
DE GOMEZ PALACIO, DGO.

A MIS ASESORES Y AMIGOS

POR SU AYUDA Y COLABORACION.

M.V.Z. JESUS A. MESTAS SANCHEZ

M.V.Z. GUSTAVO LASTRA DURAN

A MIS AMIGOS

C O N T E N I D O

	<u>PAG.</u>
INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	3
RESULTADOS	10
DISCUSION	12
CONCLUSIONES	13
SUMARIO	15
BIBLIOGRAFIA	16



INTRODUCCION

OFICINA DE DIFUSION CIENTIFICA

La Tuberculosis Bovina es una de las enfermedades mas importantes en el mundo, ocupa el décimo lugar entre las causas de muerte y el primero como enfermedad infecciosa. (3)

Esta enfermedad debe ser considerada como un problema socio-económico y de salud pública, que mas tarde o mas temprano tendrán que ser solucionados en todos los países. (8)

Si relacionamos esta enfermedad con la población mundial de ganado encontramos la siguiente distribución:

- 1/3 En países donde la Tuberculosis Bovina está controlada o erradicada. (Prevalencia menor del 0.5%)
E. U., Canadá, Finlandia, Holanda, Gran Bretaña, Países Escandinavos.
Prevalencia del 0.5% al 3%. - América Central y Antillas.
- 1/3 En países donde la prevalencia es alta. - Alemania, Italia, Sud-América y otros países.
- 1/3 En países donde la prevalencia es desconocida.
Es difícil obtener información sobre la verdadera prevalencia en el resto de los países. (9)

En México la población de ganado lechero en producción se estima en 5'800,000 cabezas, que tienen una producción anual-promedio por vaca de 1,815 Lts.

La prevalencia de Tuberculosis Bovina se ha estimado en un

...

...
20% y la pérdida de producción lactea se valúa en 210'540,000 Lts. anuales. (3)

Las pérdidas estimadas por decomisos en los 3'031,000 de cabezas de ganado productor de carne sacrificado en rastros anualmente y a nivel nacional es de 72,744 canales con un total de 11'493,552 Kgs. de carne decomisada de 606,200 animales infectados. (3)

Considerando la importancia social y económica de esta enfermedad debe ser controlada y posteriormente erradicada. (3)

Existen 3 criterios en la eliminación de reactores Tuberculino-positivos:

- 1 Detección y Segregación
- 2 Detección y Tratamiento
- 3 Detección y Sacrificio

Siendo este último el mas adecuado. (6)

Es indudable la importancia de una diagnóstico correcta en los -- programas de control de cualquier enfermedad; en una Campaña de Tuberculosis Bovina, el Laboratorio de Diagnóstico es de gran ayuda para la confirmación del Diagnóstico hecho en el campo ó en el rastro y para controlar la eficacia de la Prueba Tuberculínica, bajo las condiciones continuamente cambiantes durante el periodo de erradicación.

La Clasificación de las Micobacterias aisladas de diferentes -- fuentes puede contribuir en la determinación de las causas de las reacciones específicas a la tuberculina y en la investigación del origen de infecciones tuberculosas en los animales y en el hombre. (5)

Además de los tipos clínicos tuberculosos hay otros muchos mienbros del género que se entremezclan con ellos, bien produciendo lesiones de tipo tuberculoso no progresivas o bien provocando sensibilización cruzada que confunden la interpretación de las pruebas diagnósticas basadas en la reacción alérgica.

...

MATERIAL Y METODOS.-

BIOLOGICOS:

- 50 (cincuenta) Bovinos hembras tuberculino positivos en producción.
- Tuberculina Bovina, Cepa Valle libre de Albumosa 50,000 U.T. X ml.

CRISTALERIA:

- a) Tubos pyrex tapón rosca baquelita para cultivo.
- b) Pipetas (1, 5, 10 ml.) y un succionador de goma con llave de paso.
- c) Porta objetos y cubre objetos.
- d) Vasos de precipitado 50, 100 y 500 ml.
- e) Probetas de 50, 100 y 1,000 ml.
- f) Matraz de Erlen Meyer de 1,000 ml. para distribución de medios.
- g) Balones volumétricos fondo plano aforado de 10, 50, 100 y 1,000 ml.

INSTRUMENTOS:

- a) Coagulador de medios
- b) Homogenizador de medios
- c) Campana para cultivo con presión negativa
- d) Bomba de vacío
- e) Caja metálica para material contaminado
- f) Centrífuga de 500 a 5,000 r.p.m.
- g) Estufa de cultivo
- h) Microscopio compuesto
Coloración Ziehl-Neelsen

...

...

MEDIOS DE CULTIVO

LOWENSTEIN JENSEN (con glicerina) (2)

Fosfato Monopotásico Anhidro	-----	2.4 g.
Sulfato de Magnesio	-----	0.24 mg.
Citrato de Magnesio	-----	0.6 mg.
Asparagina	-----	3.6 g.
Glicerina	-----	12 ml.
Agua destilada	-----	600 ml.
Verde malaquita 2%	-----	20 ml.
Huevos enteros	-----	1,000 ml.

PREPARACION PREVIA DE SOLUCIONES:

Mezcla de coloración:

Solución Acuosa de verde de malaquita

Forma oxálica 2%

Verde malaquita 2 g.

Agua destilada 100 ml.

Disolver por calentamiento, Esterilizar por Autoclave 121° C.-
15 min.

Dejar enfriar al medio ambiente

PREPARACION DE SALES:

Mezcla Salina:

Fosfato Monopotásico anhidro 2.4 g.

Sulfato de Magnesio 0.24 mg.

Citrato de Magnesio 0.6 mg.

Asparagina 3.6 g.

Disolver en 200 ml. de agua destilada

Baño maría hasta la disolución de la Asparagina.

...

...

pasar a un matraz de 2,000 ml. de capacidad, agregar agua destilada hasta completar 600 ml. y 12 ml. de glicerina.- Esterilizar en autoclave por 20 min. 15 libras de presión. Dejar enfriar a temperatura ambiente.

LAVADO Y DESINFECCION DE LOS HUEVOS:

- Lavar con agua y detergente usando un cepillo, procurando no agitarlos demasiado.
- La desinfección se hace con alcohol etílico durante 15 min. reposándolos en una charola.

TECNICA:

Se van rompiendo los huevos uno a uno en el borde de la probeta estéril de 1,000 ml. y vaciando en ella el contenido, de ahí se traspasan al frasco del homogenizador donde se mezclan cuidando de no causar exceso de burbujas.

Los huevos ya homogenizados se pasan a un matraz de 2,000 ml.- donde ya está la solución de sales, L. Asparagina y Glicerol adaptando a la boca del matraz un embudo con un filtro de gasa y algodón y se agrega a la solución de verde de malaquita.- Posteriormente se llena el fraccionador de medios, para la distribución del mismo, cuidando de cerrar con pinza de Mohor el cañón de goma de salida.

Distribuir el medio utilizando la campana y pinza de Mohor trabajando en forma estéril y evitando la formación de burbujas.

Distribuir el medio en cantidades de 9 ml. en tubos estériles de 20 X 125 mm. con tapa de rosca.

Poner a coagular dejando los tubos inclinados por 40 min. por 80° C.

Terminando la coagulación se dejan enfriar los tubos 30 min. y luego incubar. (estufa bacteriológica por 24-48 hrs.), para con-

...

...

trolar su esterilidad y eliminar la agua de condensación excesiva.

Nota.- El color del medio es verde pistache.

MEDIO DE STONEBINK-LESSLIE (4)

MEZCLA SALINA.-

Piruvato de Sodio	6.25 g.
Fosfato de Potasio Dihidrogenado	2.5 g.
Agua Destilada	375 ml.
Huevos enteros	1,000 ml.

MEZCLA PARA LA COLORACION.-

Cristal violeta	125 mg.
Solución acuosa de verde de malaquita 2% (forma oxálica)	1,000 mg.
Agua Destilada	125 ml.
Ciclohexamida (actidione)	0.75 g.

EQUIPO NECESARIO.-

Es el mismo descrito para la preparación de Lowenstein Jensen.

METODO DE PREPARACION.-

Agregar a 500 ml. de agua destilada en un matraz de 2,000 ml. de capacidad los fosfatos y el piruvato de sodio.

Mezcle hasta obtener completa disolución.

Esterilice en autoclave 20 min. a 15 libras de presión. Deje enfriar a temperatura ambiente.

Los siguientes pasos en la preparación del medio y su fraccionamiento se efectúan en la forma descrita para el Lowenstein-Jensen.- El color del medio es azul intenso.

...

...

RECOLECCION Y PROCESO DE ESPECIMENES

MATERIAL.-

- Tubos con isopos estériles
- Termo con refrigerantes
- Iodo al 5 %
- Nariguero

TECNICA.-

- Entrampar al animal
- Desinfección del nariguero con Iodo al 5 %
- Inmovilización de la cabeza
- Toma del espécimen mediante un isopo, tomando de los orificios nasales y faringeos
- Registro del número del animal en el tubo
- Envío de la muestra al Laboratorio en un termo con refrigerantes
- Registro de la muestra en el Laboratorio

CULTIVO DE LA MUESTRA:

- Decontaminación del isopo en un tubo con tapa de baquelita -- que contiene 2 ml. de ácido oxálico.
- Incubación del mismo durante 10 min. a 37° C.
- Remoción del isopo previo escurrimiento del mismo presionándolo sobre la pared del tubo y centrifugar a 1,600 r.p.m. durante 5 min.
- Eliminación del sobrenadante en la caja de material contaminado.
- Agregar 2 ml. de una solución de cloruro de sodio al 0.85%.
- Centrifugar a 1,600 r.p.m. durante 5 min.
- Eliminación del sobrenadante en la caja de material contaminado.
- Agregar 1 ml. de agua destilada.

...

...

- Centrifugar a 1,600 r.p.m. durante 5 min.
- Eliminación del sobrenadante en la caja de material contaminado.
- Suspender en 2 ml. de agua destilada
- Hacer frotis y teñir con Ziehl-Neelsen
- Cultivar en 4 medios de Lowenstein-Jensen; 2 con glicerina y 2 sin glicerina.- 2 medios de Stonebrink para cada espécimen utilizando una pipeta Pasteur por espécimen.

REACTIVOS PARA LA COLORACION DE ZIEHL-NEELENSEN (7)

Solución concentrada de fucsina básica saturada en alcohol

Alcohol etílico al 95%	100.0 ml.
Fucsina básica	3.0 g.

Solución funcional de fucsina básica

Fucsina básica solución saturada en alcohol	10.0 ml.
Penol al 5% (grado analítico)	90.0 ml.

Alcohol ácido

Acido clorhídrico (concentrado)	3.2 ml.
Alcohol etílico al 95%	97.0 ml.

Contracoloración verde brillante

Verde brillante	1.0 g.
Solución de HONa al 0.1%	100.0 ml.

PROCEDIMIENTO PARA EJECUTAR LA COLORACION DE ZIEHL-NEELENSEN

- Hacer un frotis y fijar al calor "cortando" la llama del mechero 2 a 3 veces con el portaobjetos.
- Agregar al frotis ya fijado fucsina de Ziehl, calentar hasta el desprendimiento de vapores durante 3 min.
- Enjuagar con agua destilada
- Decolorar con alcohol ácido por 15 seg.
- Enjuagar con agua destilada
- Contracoloración con verde brillante alcalino por 3 min.
- Lavar con agua destilada y secar; observar al microscopio bajo objetivo de inmersión bacilos alcohol ácido resistentes de color rojo.

...



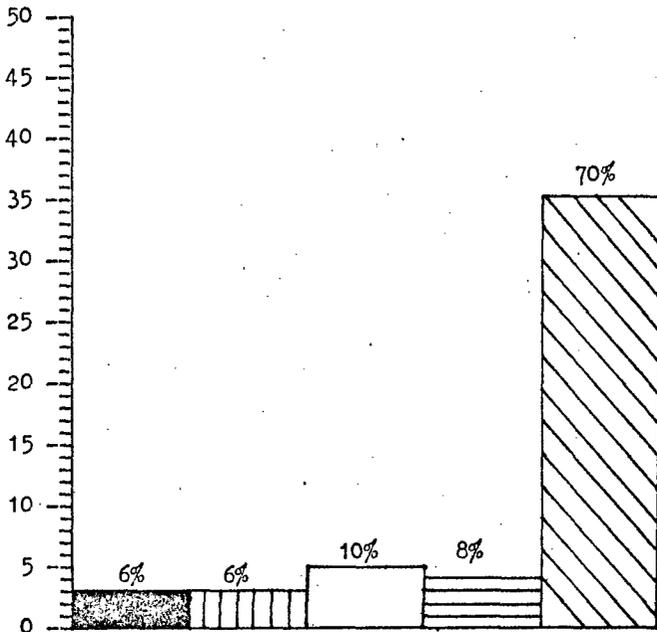
COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

CARACTERÍSTICAS CORRESPONDIENTES A 3 ESPECIES Y A 4 GRUPOS NO CLASIFICADOS DE MICOBACTERIAS (7)

C A R A C T E R E S	E S P E C I E S			G R U P O S D E R U N Y O N			
	M. Bovis	M. Avium.	M. Tuberculosis	I	II	III	IV
Tiempo de a 37° C Aparición (días) a 45° C	13-20 No crecen	13-20 6-13	13-20 No crecen	13-20 No crecen	13-20 No crecen	13-20 +	6 ó menos Variable
Producción de (con luz) Pigmento (sin luz)	- -	- -	- -	+ -	+ +	- -	Variable Variable
Acordonamiento	+	-	+	-	-	-	Variable
Morfología de Colonias (en medio L.Jensen)	Mamilada Irregular	Lisa Convexa Húmeda Entera	Seca Aspera Amontonada Irregular	Lisa Aspera Convexa Húmeda	Lisa Aspera Convexa Húmeda Entera	Lisa Convexa Húmeda Entera	Variable
Patogenicidad							
Animal: Cobayo	+++	-	+++	-	-	-	-
Conejo	+++	yersin	-	-	-	-	-
Pollo	-	+++	-	-	-	-	-

RESULTADOS: -

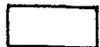
DE LOS 50 CASOS SE OBTUVIERON LOS SIGUIENTES RESULTADOS:



M. Bovis 10-18-19



M. Tuberculosis Hominis 12-40-49



Grupo III Runyon 2-21-23-28-33



Contaminados 4-8-14-45



Negativos los números restantes

NOTA.- Estos números corresponden al registro del laboratorio.
Ver tabla No. 1

DISCUSION

De los 50 casos que se trabajaron en el Laboratorio se observó que el 78% resultó negativo a cultivo por lo cual se considera que no existe una correlación entre la positividad a la prueba tuberculínica y la eliminación del bacilo en el animal enfermo.

El 22% de los animales reactivos positivos a la prueba de tuberculina resultaron positivos a cultivo, no pudiéndose diferenciar desde un punto de vista clínico las reacciones provocadas por la tuberculina y las variedades de mico bacterias. ,

CONCLUSIONES

La prueba de tuberculina detecta animales que estuvieron en contacto con micobacterias, pero no nos indica el grado de evolución de la misma por lo cual es necesario complementar el diagnóstico de campo con exámenes de laboratorio.

El diagnóstico de laboratorio por medio de cultivo se considera como el método más exacto para detectar los casos abiertos y diferenciar micobacterias, en base a su velocidad de crecimiento, pigmentación, acordonamiento, morfología de las colonias y patogenicidad a animales susceptibles.

Se observaron contaminantes en medios de Lowenstein-Jensen pudiendo ser la causa de que es rico en lípidos y aminoácidos, para evitarlo se sugiere el uso de penicilina a razón de 10 - U.I. por ml. para reducir la contaminación. (1)

Cabe señalar que *M. Tuberculosis* únicamente creció en medios con glicerina, cualidad que lo diferencia de *M. Bovis*. Con esto se corrobora lo dicho por Lesslie. (2)

En el caso de Stonebrink no se observó ninguna contaminación debido a que este medio lleva un antibiótico como lo es el actidione (10) el cual actúa como un bactericida en el medio.- Inhibiendo bacterias como *Aerobacter*, *Bacillus Mycoides*, *Subtilis*, *E. Coli*, *Proteus Vulgaris*, *Pseudomonas Aeruginosa*,-

...

...

Salmonella, Staphylococcus Aureus, Streptococcus Faecalis, --
Pyogenes.

Baciloscofia.- Se procedió a elaborar una laminilla del -
Sedimento problema y se tiñó con colorantes para bacterias-
ácido resiatentes. El valor de este procedimiento es relati-
vo, dependiendo siempre de la concentración de micobacterias
que deberá ser elevado para un resultado positivo, dato que-
se puede corroborar en la tabla No. 1.-

S U M A R I O

El objetivo de este trabajo se generó del problema de saber si un animal reactor positivo a la prueba de tuberculina se encuentra eliminando el bacilo.

En el caso de los 4 bovinos de los cuales se aisló M. Bovis fueron eliminados del establo y se sacrificaron, en contrándose lesiones incipientes de tuberculosis y gan---glicos mediastinicos, características de esta enfermedad.

Respecto a la toma de las muestras (isopos) se observó que para tomar muestras de faringe ofrece un grado de dificultad y resistencia en el animal provocando con esto -ruptura de isopos y mordeduras en el operador.

En este trabajo se tomaron muestras nasales y faríngeas en los 50 casos y observándose que en los casos positivos hubo crecimiento por lo que se sugiere tomar las muestras de las fosas nasales aproximadamente 10 cm. hacia adentro.

Se seleccionaron los medios de Lowenstein-Jensen con y sin glicerina y Stonebrink por ser los mas específicos pa ra M. Bovis y M. Tuberculosis.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ALLEN BAKER. "Micobacteria Aislamiento Identificación y Pruebas de Sensibilidad, P. 71, Editorial Manual Moderno 1976, México, D. F.
- 2.- "Diagnosis de Laboratorio de la Tuberculosis Animal" -- P.P. 5 y 11, Nota Técnica No. 16 C.P.Z., Nov. 1972, Buenos Aires, Rep. Argentina.
- 3.- GALINDO VILLA J.J. LLORET DE LA CERDA A. M.M. V.V. Z.Z. "Importancia de la Tuberculosis Bovina en México" S.A.G. D.G.S.A., Sep. 1973, México, D.F.
- 4.- LESSLIE I. W. 1959, J. COMP. PATH. 69, P. 9, Nota Técnica No. 16 C.P.Z., Nov. 1972, Buenos Aires, Rep. Argentina.
- 5.- LESSLIE I.W. "Cross Infections With Mycobacteria Between Animals And Man", Bull Int. Un Tuberc. 41-285-288, Ene. 1968.
- 6.- MARTINEZ CONDE J. MARTIN. "Epizootiología y Zoonosis", - P. 80, Editorial Aedos 1975, España.
- 7.- "Métodos de Laboratorio de Micobacteriología Veterinaria para el Aislamiento e Identificación de Micobacterias", P.P. 12, 45, 1973, Nota Técnica No. 6 C.P.Z., -- Buenos Aires, Rep. Argentina.
- 8.- RANNEY A.F. DR. "Campaña Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina", Animal Health, Division, Agricultural Research service, United States; Department of - Agriculture U.S.A.

...

...

- 9.- ROSWURM JAMES DR. "Situación en las Américas y Aspectos Epidemiológicos de la Tuberculosis Bovina" P. 2, C.P.Z. 1974, Buenos Aires, Rep. Argentina.
- 10.- THE UPJOHN COMPANY, Kalamazoo, Michigan 49001 U.S.A.