

Mycobacterias aisladas de fuentes hídricas en la Cuenca Lechera de Uruguay

Castro Ramos, M.¹; Errico, F.²; Trelles, A.³; Curbelo, R.⁴; Laborde, M.⁵

RESUMEN

En el período 1990-92 se recolectan muestras de fuentes hídricas de veinte establecimientos en la Cuenca Lechera de Uruguay. De 31 muestras de distinto origen: vertedero, bebederos, tajamares, cañadas y desagües de salas de ordeño, se aíslan 7 cepas de mycobacterias: 2 de *Mycobacterium bovis*, 3 de *M. vaccae*, 1 de *M. gastri* y 1 de Complejo *terrae-triviale*. Estos aislamientos demuestran la presencia de *M. bovis* en el agua de un establecimiento lechero. Cabe realizar un muestreo mayor para verificar la dispersión de la contaminación hídrica por *M. bovis* en predios lecheros.

Palabras claves: Tuberculosis bovina-mycobacterias-*M. bovis*

SUMMARY

Samples of water was collected from 31 dairy farms to know mycobacterias contamination. The samples were from drains, drinkables, cutwaters, dells, outlet of milk-pails. 7 strain of mycobacterias were isolated, two were *Mycobacterium bovis*, three were *M. vaccae* and two more not chromogenic (*M. gastri* and *terrae-triviale* complex). These isolations show the presence of *M. bovis* in the water of one dairy farm. A bigger sample must be taken to know the dispersion of the water contamination by *M. bovis* in dairy farms.

Keywords: Bovine tuberculosis-mycobacterias- *M. bovis*

INTRODUCCIÓN

En estudios anteriores a 1970 y las investigaciones realizadas en los años posteriores, se confirma el aislamiento, identificación y patogenicidad de mycobacterias que sobreviven en el agua. Esta puede ser estancada, de fuentes o cursos regulares (caso de cañadas, arroyos, o ríos). En estos estudios se identifican especies de mycobacterias de crecimiento rápido, intermedio y lento (7). En varios estudios en América Latina, (Remon)(11), (Vera)(14), se constata la presencia de mycobacterias en agua. Aseverando aún más estos hallazgos se investiga la sobrevivencia de *M. bovis* en agua en un estudio del año 1984(13). En el laboratorio de Tuberculosis de la D.L.A.V.E. «M. C. Rubino», en 1986, de un foco de tuberculosis bovina, aislamos, y tipificamos, entre otras mycobacterias «atípicas», el *M. bovis* de muestras de agua de un arroyo y tajarar ubicados

en la zona del brote(6).

El objetivo de este trabajo es aislar e identificar mycobacterias que viven en el medio acuático de establecimientos lecheros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de agua fueron recogidas de establecimientos lecheros en los departamentos de Colonia (10 en la zona de Tarariras, 1 en San Pedro y 1 en Artilleros), Florida (5 en la zona de Chamizo) y San José (14 en las zonas de Raigón y Carreta Quemada). El muestreo se cumplió al azar, en frascos estériles de 250 ml. Sólo en tres establecimientos (1 de Colonia y 2 de San José) fueron seriadas. Las tomas fueron realizadas en fondos de bebederos, tajamares, un vertedero, desagües de salas de ordeño y cañadas. Estas fueron remitidas al Laboratorio de Tuberculosis de la División de Laboratorios Veterinarios (D.L.A.V.E.)

«Miguel C. Rubino», para iniciar estudios de aislamiento y tipificación de mycobacterias.

La decontaminación se efectuó con cloruro de benzalconio, cloruro de cetyl piridonio y cloruro de hexadecyl piridonio, según los métodos descritos por el Centro Panamericano de Zoonosis, Nota Técnica N° 6(1), (du Moulin & Stottmeier)(9), (Whipple & Merkal)(15).

Los estudios de baciloscopía, aislamiento e identificación se desarrollaron según los métodos descritos por el Centro Panamericano de Zoonosis, Nota Técnica N° 11(2), Centro Panamericano de Zoonosis, Nota Técnica N° 28(3), (Nel)(10), (Meyer & David)(8), (Runyon)(12).

Las muestras luego de decontaminadas fueron inoculadas con 0.2 ml. por tubo en los medios de Stonebrink(2 tubos) y Lowenstein-Jensen (2 tubos) por triplicado y acondicionadas en estufa a 37°C y 42°C

¹ D.L.A.V.E. «Miguel C. Rubino», MGAR, C.C. 6577, Fax 2221157, E-mail dilave@adinet.com.uy, Montevideo, URUGUAY.

² Programa PENTA, MGAP.

³ D.L.A.V.E. «Miguel C. Rubino».

⁴ Ejercicio Liberal.

⁵ D.L.A.V.E. «Miguel C. Rubino».

Aprobado 13.11.00

respectivamente. La tinción se realizó por el método de Ziehl-Neelsen. Los inóculos se leyeron periódicamente hasta completar ocho semanas de incubación.

Se estudió las características culturales, morfológicas, y cromogénicas de las cepas aisladas. La identificación se complementó con las pruebas bioquímicas de: niacina, nitrato reducción, catalasa a 22°C y 68°C, hidrólisis

de tween a los 5 y 10 días, ureasa, y telurito de potasio.

RESULTADOS

En el gráfico 1, se puede observar el N° de muestras y su origen: 11 provenían de bebederos de tambos, 13 de desagües de salas de ordeño, 2 de tajamares, 4 de cañadas y 1 de vertedero. En el cuadro 1, se exponen los

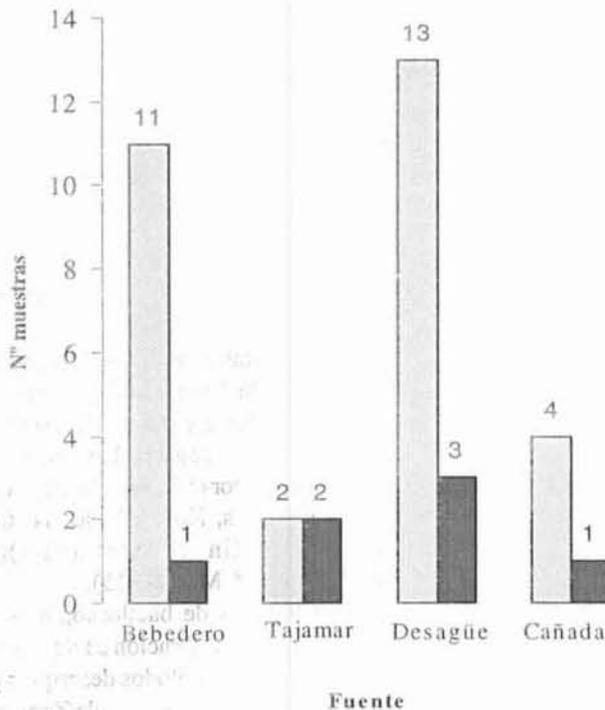
resultados, de acuerdo a la decontaminación, baciloscopía, medios de cultivos utilizados, pruebas de cromogenicidad, y pruebas bioquímicas.

En el total de 31 muestras, en doce (12) se observaban B.A.A.R (Bacilos-ácido-alcohol-resistentes), en diecinueve (19) baciloscopía negativa. La distribución por especie fue la siguiente: 2 cepas *M. bovis*, 1 cepa del *C. terrae-triviale*, 1 cepa *M. gastri* y 3 cepas *M. vaccae*. Los aislamientos se obtuvieron de las muestras tratadas con cloruro de hexadecyl piridonio al 0.75%; con los otros dos decontaminantes no hubo crecimiento de colonias.

DISCUSIÓN

La bibliografía sobre aislamientos de mycobacterias en agua se remonta a varias décadas, (Gosslee & Wolinsky)(7) aislaban de 321 muestras hídricas: 80 cepas *M. gordonae*, 47 cepas del Complejo *M. avium-intracellulare-scrofulaceum* (MAIS). En ese estudio la mayoría de las especies aisladas eran de crecimiento lento. *M. fortuitum* fue la cepa principal de las de crecimiento rápido. En 1978, (du Moulin & Stottmeir)(7), aislaban 25 cepas *M. chelonae*, y 9 *M. intracellulare*, comprobando la eficiencia como decontaminante del cloruro de cetyl piridonio para el aislamiento de mycobacterias en agua.

Gráfico 1: Relación Aislamientos / Fuente



Cuadro N° 1: EXPOSICION DE RESULTADOS

Referencia	H	C	Z	ZN	LJ	Stb	Pig	PRUEBAS BIOQUIMICAS							IDENTIFICACION
								N	NR	C22	C68	HT	U	TK	
104/1	+	-	-	+	+	-	Esc.	-	+	+	+	+		+	M. vaccae
104/2	+	-	-	+	+	-	Esc.	-	+	+	+	+		+	M. vaccae
0529	+	-	-	+	+	-	Esc.	-	+	+	+	+		+	M. vaccae
0503/1	+	-	-	+	+	-	N	-	-	-	-	+	+	-	M. vaccae
1515/1	+	-	-	+	+	-	N	-	+	+	+	+		-	C. terrae- triviale
11793/1	+	-	-	+	-	+	N	-	-	-	-	-		-	M. bovis
1793/2	+	-	-	+	-	+	N	-	-	-	-	-		-	M. bovis

Referencias:

H: Cloruro de hexadecylpiridonio al 0,75%
 C: Cloruro de cetylpiridonio al 0,04%
 Z: Zephiran al 0,1%
 ZN: Ziehl-Neelsen
 L.J. Lowenstein-Jensen
 Stc: Stonebrink

C22: Catalasa 22° C
 C68: Catalasa 68° C
 HT: Hidrolisis de tween
 U: Ureasa
 TK: Telurito de potasio

(Remon)(11) de 209 muestras de agua aislaban 21 cepas: 3 *M. aquae*, 7 no clasificadas, 3 *M. terrae*, 1 *M. scrofulaceum*, 2 *M. triviale*, 3 *M. fortuitum*, 2 *M. vaccae*; algunas de estas especies (*M. vaccae* y *M. triviale*) se aislaban en nuestro trabajo con un solo muestreo. Para el diagnóstico de tuberculosis bovina, (Corner & Trajstman)(4), utilizaron cloruro de hexadecyl piridonio con buenos resultados. En los primeros aislamientos de *M. paratuberculosis* en Uruguay, (Errico & Bermúdez)(5) utilizaron el ácido oxálico al 5% con excelente resultado. Nosotros no lo utilizábamos. Optábamos por el que aplicábamos en nuestro diagnóstico de rutina para el aislamiento de *M. paratuberculosis*, de materias fecales, cloruro de hexadecyl piridonio al 0.75%, por considerarlo de mayor eficiencia como decontaminante para aislar mycobacterias de agua(7). Con este decontaminante obtuvimos los resultados que presentamos en este estudio.

El hallazgo de 2 cepas de *M. bovis* de un muestreo seriado de un mismo establecimiento, coincidía con los estudios de (Vera) (13)(14) quien demostraba que en agua corriente limpia, a la sombra, *M. bovis* sobrevivía 203-237 días en verano y en invierno de 245-295 días en las condiciones ambientales del Caribe. De las primeras cepas de *M. bovis* aisladas en el laboratorio de Tuberculosis(6), pasaron algunos años. Hoy, volvimos a confirmar su presencia en el agua en convivencia con rodeos lecheros donde es posible que existan animales eliminadores de bacilos tuberculosos bovinos.

(Vera)(13) en su tesis doctoral, estudió el *M. bovis*, pudiendo alcanzar una sobrevivencia de 43 días con sol y de 86 días en el interior de un galpón. La contaminación de las aguas de establecimientos de lechería nos indica-

ba que en esos rodeos de ganado lechero habría animales excretores del *Mycobacterium bovis*. La metodología empleada por nuestro Laboratorio se podría aplicar para un muestreo mayor, y

de acuerdo a los resultados obtenidos, contribuir con evidencias epidemiológicas para la Campaña de Erradicación de la Tuberculosis bovina que se implantó recientemente en Uruguay.

Agradecimientos

*Al Dr. Pablo Menes (Ejercicio liberal), por la obtención de las muestras de agua de algunos establecimientos lecheros.

*Al Dr. Raúl Casas Olascoaga, por la revisión crítica de este trabajo.

REFERENCIAS

BIBLIOGRAFICAS

- (1) Centro Panamericano de Zoonosis.(1973). Métodos de laboratorio de microbiología veterinaria para el aislamiento e identificación de micobacterias. Serie de Monografías Científicas y Técnicas CPZ-6. Ramos Mejía, Buenos Aires, Argentina.
- (2) Centro Panamericano de Zoonosis.(1979) Bacteriología de la tuberculosis humana y animal. Serie de Monografías Científicas y Técnicas CPZ-11. Ramos Mejía, Buenos Aires, Argentina.
- (3) Centro Panamericano de Zoonosis.(1986). Parte III, La identificación de micobacterias, CPZ. Nota Técnica N° 28, Martínez, Buenos Aires, Argentina.
- (4) Corner, L. A. & Trajstman A. C.(1988) An evaluation of 1-hexadecylpyridinium chloride as a decontaminant in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesions. Vet. Microbiol., 18: 127-134.
- (5) Errico, F. & Bermúdez, J.(1983) Aislamiento de *Mycobacterium paratuberculosis* en bovinos en el Uruguay. Veterinaria. 19(83): 13-16.
- (6) Errico, F.; Castro Ramos, M. & Silvera, F.V.(1988) Identificación de cepas de micobacterias aisladas en el Centro de In-

vestigaciones Veterinarias»Miguel C. Rubino»(CIVET) entre 1981-1986. Veterinaria 24(99) Enero-Marzo.

(7) Goslee, S. & Wolinsky, E.(1976) Water as a Source of Potentially Pathogenic Mycobacteria. American Review of Respiratory Disease, Volume 113.

(8) Meyer, L. & David, H.(1979) Mycobacteriologie en Santé Publique. Centre National de Référence pour la tuberculose et les mycobactéries. Institut Pasteur, Paris.

(9) du Moulin, G. C. & Stottmeier, K. D.(1978) Use of Cetylpyridinium Chloride in the decontamination of Water for Culture of Mycobacteria. Applied and Environmental Microbiology, Nov. Vol. 36, N° 5 :771-773.

(10) Nel, E.E.(1971) Biochemical and serological methods in current use. Tuberculosis Research Unit, South Africa Medical Research Council, P.O., Onderstepoort.

(11) Remon, S.; Sánchez, I. & Rosell, R.(1983) Micobacterias aisladas de diferentes fuentes. Rev. Cub. Cienc. Vet. 14(3):183-186.

(12) Runyon, E.H.; Karlson, A.; Kubica, G. P. & Wayne, L. G (1980) *Mycobacterium*. In Lennette: Manual of Clinical Microbiology 3rd. Ed. Washington D. C., American Society for Microbiology, pp. 150-179.

(13) Vera, A.(1982) Supervivencia del *Mycobacterium bovis* en el ambiente y acción de algunos agentes físicos y químicos contra el *M. bovis* y las atípicas. Autorreferata del trabajo para optar por el grado de Candidato a Doctor en Ciencias Veterinarias. Ministerio de la Agricultura, Instituto de Medicina Veterinaria, La Habana, Cuba.

(14) Vera, A.(1984) Supervivencia de *Mycobacterium bovis* en agua. Rev. Cub. Cienc. Vet. 15 (3 y 4): 243-247.

(15) Whipple, D. L. & Merkal, R. S.(1983) Modifications in the techniques for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*. In: R. S. Merkal (Editor) Proceedings of the International Colloquium on Research in Paratuberculosis, 16-18 June 1983, National Animal Disease Center, Ames IA, pp. 82-92.