

5  
28



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**"AISLAMIENTO DE MICOBACTERIAS A PARTIR DE  
LECHE DE BOVINOS SOSPECHOSOS A LA PRUEBA  
INTRADERMICA CON DERIVADO PROTEICO PURO  
(PPD)".**

**T E S I S**

**Que para obtener el Titulo de :**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A :**

**ANGELINA ANTUNEZ SOLIS**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**MEXICO, D. F.**

**1988.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

### INTRODUCCION

### OBJETIVOS

#### 1. GENERALIDADES

##### 1.1 ANTECEDENTES

##### 1.2 GENERO MYCOBACTERIUM

- a) Taxonomía
- b) Composición Química
- c) Acidorresistencia
- d) Características de cultivo y requerimientos nutricionales
- e) Clasificación
- f) Tuberculina y PPD o DPP

##### 1.3 TUBERCULOSIS - HUMANA Y ANIMAL

##### 1.4 INMUNOLOGIA

#### 2. PARTE EXPERIMENTAL

##### 2.1 MATERIAL

- a) Biológico
- b) Vidrio
- c) Equipo
- d) Medios

##### 2.2 METODOLOGIA

- a) Toma de muestra
- b) Aislamiento
- c) Identificación

#### 3. RESULTADOS

#### 4. DISCUSION

#### 5. CONCLUSIONES

### ANEXOS

#### 6. BIBLIOGRAFIA

## INTRODUCCION

La tuberculosis continúa siendo una enfermedad que afecta a la población de prácticamente todo el mundo, pese a los esfuerzos realizados para erradicarla. El problema ha decrecido o casi desaparecido en muchos países desarrollados, pero sigue presente en países donde las condiciones económicas y sociales son desfavorables, como es el caso de los países latinoamericanos.

Se estima que al menos 3 millones de personas mueren de tuberculosis cada año y que se presentan de 4 a 5 millones de casos nuevos de personas que son eliminadoras del bacilo tuberculoso.

En el ganado bovino de nuestro país, la tuberculosis es una enfermedad cuya magnitud se desconoce, debido a que los ganaderos se han mostrado reacios a practicar las pruebas de intradermorreacción en sus animales. Considerando que de los animales enfermos entre el 5 y 12% eliminan el bacilo tuberculoso a través de la leche, el riesgo de transmisión al humano, si esta leche no es pasteurizada o hervida, es elevado; por otra parte, se ha observado la eliminación de micobacterias denominadas "diferentes del bacilo tuberculoso" (MOTT), que día a día se asocian con mayor frecuencia a padecimientos en el hombre, como linfadenitis, lesiones granulomatosas en piel, lesiones pulmonares y óseas, entre otras. Por otra parte, como todas las micobacterias pueden producir reacciones cruzadas cuando se aplican las pruebas intradérmicas, se obtendrían resultados positivos tanto con

M. tuberculosis, como con las cepas de micobacterias diferentes del bacilo tuberculoso, confundiendo así la determinación de cuál es el agente etiológico.

## **OBJETIVOS**

- 1.- Determinar por medio del aislamiento e identificación, la frecuencia de micobacterias a partir de leche de bovinos sospechosos a la prueba intradérmica con derivado proteínico purificado de origen bovino (PPD).**

## 1. GENERALIDADES

### 1.1. Antecedentes

El bacilo tuberculoso y la tuberculosis producida en el hombre y los animales se han estudiado más que todos los demás microorganismos y enfermedades.

La tuberculosis es uno de los padecimientos más antiguos que se conocen, las referencias hacen mención de que las momias egipcias muestran lesiones de la infección (21). Al principio, la enfermedad se confundió con sífilis, pero en 1868 Willemin inoculó conejos con material tuberculoso humano y bovino y encontró que aquéllos desarrollaron la tuberculosis. El punto decisivo en la historia de la tuberculosis ocurrió en 1882 cuando Roberto Koch anunció públicamente que había observado y cultivado al bacilo responsable de esta enfermedad.

Al principio, Koch creyó que había un solo tipo de bacilo tuberculoso afectando al hombre y a otros animales, pero Smith (1898) demostró que hay diferencias pequeñas pero definitivas, entre la cepa humana y la bovina.

De 1901 a 1911, The Royal Comission on Tuberculosis recopiló cuatro reportes donde se encontraban resultados y desarrollaban técnicas experimentales, muchas de las cuales se usan actualmente con algunas modificaciones. Se mostró que había tres tipos de bacilo "tuberculoso" (humano, bovino y aviar) así como micobacterias de naturaleza saprofitica, el bacilo tuberculoso bovino presente en leche de vacas causaba tuberculosis no pulmonar en el hombre, especialmente en

nifos; y la infección pulmonar humana adquirida del ganado por inhalación fué un riesgo definitivo. La comisión también investigó el uso de las pruebas de tuberculina en animales, mismas que juegan un papel crucial en las campañas de erradicación (6, 21).

## 1.2 GENERO MYCOBACTERIUM.

### a) Taxonomía.

El orden de los Actinomycetales queda dentro del grupo de los Actinomycetes y microorganismos relacionados. Este orden está formado por ocho familias dentro de las cuales se encuentra la familia Mycobacteriaceae con un sólo género: Mycobacterium, que incluye muchas especies (3, 7).

### b) Composición química.

Una de las estructuras principales de la célula micobacteriana es su pared celular, con múltiples capas de ,aproximadamente 20 nm de espesor. Dentro de la pared se encuentran abundantes lípidos complejos.

La pared celular micobacteriana muestra una zona gruesa compuesta por tres capas que envuelven a una membrana plasmática. Químicamente, la pared es muy compleja y diferente de la de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Los lípidos corresponden aproximadamente al 60% del peso seco de la pared y confieren al microorganismo propiedades que les permiten resistir condiciones ambientales adversas (38).



La enorme cantidad de lípidos en la pared, explica el carácter hidrófobo de los microorganismos, contribuye a la lentitud del crecimiento, tanto por hacer difícil el paso de sustancias nutritivas al interior de las células, como al consumir gran parte de la capacidad biosintética de éstas; también es responsable de la resistencia a la acción letal de los ácidos y álcalis (7).

La pared celular micobacteriana consiste en una estructura glucopéptida basal, unida covalentemente a un arabinogalactano-micolato. Tres características distinguen a los glucopéptidos de las micobacterias: a) la presencia del ácido N-glucosilmurámico en lugar del derivado N-acetilo, b) la presencia de dos grupos amida en el glutamato y ácido meso-diamino pimélico (DAP) de los péptidos de la subunidad repetidora y c) la presencia de dos clases de uniones interpéptidos: D-ala-meso-DAP y meso-DAP-DAP-. Aproximadamente el 70% de la unión cruzada en el glucopéptido consiste de puentes interpéptidos entre residuos meso-DAP. Los puentes interpéptidos de este tipo parecen sólo encontrarse en las micobacterias (38).

El glucopéptido está unido al polímero de arabinogalactano por uniones fosfodiéster entre residuos del ácido murámico y una arabinosa del arabinogalactano.

Entre los lípidos encontrados en las micobacterias están los ácidos micólicos, ácidos grasos saturados con ramificaciones alfa y beta hidroxilados, que se encuentran tanto en las ceras como en los glucolípidos. Entre los

lípidos más superficiales se hallan las ceras (ésteres de ácidos grasos con alcoholes) y los glucolípidos denominados micósidos. Aparte de las micobacterias sólo las corinebacterias poseen ceras verdaderas y algunas de ellas son, en ocasiones, acidorresistentes.

Entre los micósidos se encuentra el factor cordón (6, 6'-dimicolato trealosa) y los sulfolípidos. El factor cordón se señala como responsable de la virulencia y del crecimiento formando cordones.

Otro micósido es el denominado Cera D, que no es una cera verdadera, pero contiene ácidos micólicos y un glucopéptido, esta cera es de especial interés debido a su capacidad para actuar como adyuvante, incrementando así la inmunogenicidad de un antígeno.

Los sulfolípidos, aunque no están covalentemente unidos a la pared, son importantes determinantes de superficie (7, 38).

#### c) Acidorresistencia.

La propiedad más distintiva de las micobacterias es que, cuando se tifen con colorantes adecuados, como la carbol fuchsin, no se decoloran por la acción de los ácidos; esta propiedad da lugar a la designación de ácido-resistentes.

La propiedad de acidorresistencia se atribuye a su contenido lipídico. La mejor explicación de la acidorresistencia se basa en un principio de barrera lipídica. De acuerdo a esta hipótesis, la hidrofobicidad de las capas superficiales aumenta luego de que el colorante se

une formando complejos con los residuos de ácido micólico presentes en la pared celular. Esto impide la salida de la carbol fuchsina que queda atrapada en el interior de la célula.

d) Características de cultivo y requerimientos nutricionales.

Desde hace mucho se sabía la diferencia entre la cepa humana y la bovina, esto es, diferencias en morfología celular, velocidad de crecimiento in vitro y patogenicidad para varios animales. Smith (1904) describió el conocimiento claro de la dependencia del glicerol en la prueba: el crecimiento de la cepa humana se aumenta con el glicerol mientras que el de la cepa bovina se suprime.

Se notó también que el crecimiento de la cepa humana tendía a ser amontonado y exuberante, mientras que la cepa bovina produjo colonias pequeñas y ordenadas. Calmette (1923), utilizando un medio consistente en una parte de papa remojada en glicerol, reportó que la cepa bovina crecía en presencia de bilis bovina pero no en bilis humana, mientras que el comportamiento de la cepa humana era al contrario. Ahora se sabe que hay otras diferencias bioquímicas entre estos dos microorganismos (5).

En la mayoría de las condiciones de cultivo, el tiempo de duplicación del microorganismo es de 16 a 24 horas. Si se agregado al medio de cultivo de un surfactante, como el tween 80, mejora la tasa de crecimiento de los microorganismos.

Las cepas humana y bovina difieren en el pH óptimo de crecimiento, la primera crece mejor a 7.4 - 8.0, mientras que

la segunda lo hace mejor a 5.8 - 6.9. La cepa aviar prefiere un medio ligeramente alcalino.

La temperatura óptima para el aislamiento de las especies humana y bovina es de 37 grados centigrados. El bacilo tuberculoso aviar crece bien a temperaturas entre 25 y 45 grados centigrados.

M. tuberculosis, M. bovis y M. avium requieren condiciones aeróbicas para el crecimiento artificial. Una atmósfera conteniendo el 5% de CO<sub>2</sub> ayuda al crecimiento (21).

Las micobacterias crecen en un medio conteniendo fuentes de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas. M. tuberculosis utiliza como fuente de carbono preferentemente al glicerol ya que acelera en forma apreciable el crecimiento de esta especie. M. bovis en cambio, puede utilizar como fuente de carbono al piruvato ya que el glicerol en ocasiones causa un efecto inhibitorio. Como fuente de nitrógeno se pueden utilizar sales de amonio y ciertos aminoácidos, como por ejemplo la asparagina.

Alguna deficiencia de sal inorgánica puede tener consecuencia, como en el caso de la falta de hierro. La naturaleza insoluble de éste a pH fisiológico ha dado como resultado la evolución de los sistemas para su transporte hacia la célula. Debido a la gruesa pared rica en lípidos de las micobacterias, el sistema consite en dos componentes que quelan al hierro: a) un compuesto extracelular soluble en agua, exoquelina, que puede sustraer hierro de la ferritina y

b) micobactina, una molécula lipofílica localizada en la superficie de la célula bacteriana. En el modelo propuesto, el ión férrico del medio extracelular es solubilizado por exoquelinas y luego, por contacto con la pared celular micobacteriana, es tomado por la micobactina y transportado a través de la pared. La micobactina originalmente aislada de M. phlei como un factor de crecimiento para M. paratuberculosis, está presente en todas las micobacterias y parece estar confinada a este género (38).

e) Clasificación.

Existe una clasificación de las micobacterias en cuanto a sus propiedades ecológicas relevantes:

A) Saprófitas. Ejemplos: M. gordonae  
M. flavescens  
M. necromogenicum  
M. vaccae  
M. triviale  
M. smegmatis  
M. terrae  
M. parafortuitum  
M. gastri  
M. aurum  
M. goodii  
M. duvalii  
M. chitae

B) Patógenos potenciales. Ejemplos: M. avium  
M. chelonae  
M. fortuitum  
M. intracellulare  
M. kansasii  
M. marinum  
M. scrofulaceum  
M. xenopi

C) Patógenos facultativos. Ejemplos: M. leprae  
M. paratuberculosis  
M. ulcerans

D) Patógenos obligados. Ejemplos: M. tuberculosis  
M. africanum  
M. asiaticum  
M. malmoense  
M. simiae  
M. szulgai  
M. haemophilum

Runyon en 1959, propuso un sistema para clasificar a las micobacterias diferentes del bacilo tuberculoso en cuatro grupos. Estos grupos se basan en la velocidad de crecimiento y la producción de pigmento.

GRUPO I. Fotocromógenos. Crecen lentamente y producen un pigmento amarillo solo cuando se exponen a la luz. Ejemplos:

M. ulcerans, M. kansasii,

M. marinum (balei).

GRUPO II. Escotocromógenos. Crecen lentamente, forman un pigmento anaranjado tanto en la luz como en la obscuridad.

Ejemplo: M. scrofulaceum

GRUPO III. No fotocromógenos. Crecen lentamente, no producen pigmento, o producen un color rosa pálido. Ejemplo:

M. avium-intracellulare

GRUPO IV. Crecimiento rápido. Ejemplos: M. phlei,  
M. smegmatis  
M. fortuitum

f) Tuberculina y PPD.

La tuberculina consiste en un cultivo de bacilos tuberculosos inactivos por calor. Los microorganismos se filtran y el filtrado se evapora hasta una décima parte de

su volumen original. El derivado proteico purificado (PPD) se obtiene de filtrados de cultivos de microorganismos que han crecido en un medio sintético, que se destruyen por calor, y luego se precipitan con sulfato de amonio.

El derivado proteico purificado de tuberculina contiene una mezcla de tuberculoproteínas con pesos moleculares de 2 000 y 9 000 (38).

La potencia del PPD o DPP se expresa en términos de unidades internacionales. Cada unidad equivale a 0.00002 mg de derivado proteico puro.

El mejor sitio para realizar la prueba de tuberculina en el humano es la cara anterior y superior del brazo, por vía estrictamente intradérmica y debe leerse entre 48 y 72 horas después de aplicarse.

Para el diagnóstico de tuberculosis bovina hay 3 diferentes pruebas a realizar:

- a) Subcutánea.
- b) Intradérmica.
- c) Oftálmica.

En la prueba subcutánea se inyecta subcutáneamente una dosis de 2 ml de tuberculina. Previo a la inyección se toma la temperatura del animal 3 veces con intervalos de dos horas, si ésta es normal, se inyecta la tuberculina; 8 horas después de la inyección, se toman de nuevo las temperaturas con intervalos de dos horas y durante 18 horas. Se obtiene una reacción positiva cuando existe incremento en la temperatura de al menos 2 grados F durante el intervalo entre las 8 y 18 horas después de la inyección.

En la prueba intradérmica, se inyectan no menos de 0.1 ml y no más de 0.2 ml de tuberculina dentro de la capa dérmica. En el ganado se usa el pliegue caudal o la vulva. En la piel del área cervical se ha encontrado que se presenta una reacción más pronunciada, pero no se usa en la prueba de rutina, excepto para checar a reactores sospechosos. Se hace aparente la reacción positiva por un hinchamiento pequeño o grande en el punto de inoculación dentro de las 72 horas.

En la prueba oftálmica, la tuberculina se pone dentro del saco conjuntival por medio de un gotero. La tuberculina concentrada puede mezclarse con lactosa y moldearse en pequeños discos por la facilidad de disolverse en los ojos. En la prueba oftálmica, se requieren dos aplicaciones de tuberculina. La primera con el propósito de sensibilización y en la que se ha visto una reacción más marcada. La segunda aplicación dos o tres días después, para propósitos de diagnóstico. El animal se somete a una observación durante 3 horas. Una reacción positiva está caracterizada por inflamación profusa y un exudado mucopurulento (21).

### 1.3 TUBERCULOSIS. Humana y animal.

M. tuberculosis es el principal agente etiológico en el hombre y la forma más frecuente de presentación es la tuberculosis pulmonar -enfermedad consutiva crónica que al principio se confunde con bronquitis crónica- aunque hay otras formas de presentación (menígea, renal, ósea, digestiva, etc.). Se ha informado que M. tuberculosis es el agente



etiológico más frecuente, algunos autores han informado hasta el 95% de los casos; sin embargo, no es el único, le sigue en importancia M. bovis y más recientemente se han aislado otras micobacterias ácido alcohol resistentes, a las cuales se les conoce como micobacterias diferentes del bacilo tuberculoso MDBT o MOTT (siglas en inglés) (11).

M. bovis es el principal agente etiológico de la tuberculosis bovina, la infección se parece a la del humano y también la forma más frecuente es la pulmonar, aunque existen otros tipos de presentación. La naturaleza exacta de la tuberculosis bovina y su relación con tisis o consunción en el hombre, no se conoció por mucho tiempo, pero en 1846 Kluncke observó que la linfadenitis tuberculosa era más común en infantes alimentados con leche cruda, de aquí que se incriminó a ésta como fuente de la enfermedad.

Por los años de 1930, se vió que cerca del 40% de todos los animales sacrificados en mataderos públicos tuvieron lesiones tuberculosas obvias y cerca del 0.5% de todas las vacas lecheras producían leche contaminada con bacilo tuberculoso.

M. bovis no solo produce lesión pulmonar en el hombre, sino que más frecuentemente da lesiones extrapulmonares como las renales, meníngeas, digestivas, cutáneas y óseas sobre todo en niños. Neissner (1959) encontró que las cepas bovinas de Mycobacterium eran responsables del 5% de enfermedad pulmonar y 14% de lesiones extrapulmonares en adultos (6).

Se calcula que existe un billón de bovinos en el mundo, de los cuales, un tercio vive en países donde la tuberculosis bovina está bajo control; otro tercio vive en áreas donde la enfermedad está diseminada, pero se desconoce la incidencia y, el resto, donde la prevalencia de la tuberculosis bovina es alta. El porcentaje de reactores en estos tres grupos fluctúa, desde menos de 1% en Norteamérica y Europa a 10 y 20% o más, en regiones enzoóticas de América Latina, Africa y Asia.

La repercusión económica que tiene la tuberculosis bovina se traduce en menor tiempo de vida del ganado, disminución de la producción de leche, menor capacidad de producción y menor calidad en el ganado de carne (23).

En México se desconocen las pérdidas por la baja de producción del ganado, debido a que no hay información disponible. Los estudios se han hecho en ganado lechero, estabulado y en explotación extensiva en diferentes zonas geográficas del país. En el periodo de 1955 a 1957 la Secretaría de Salubridad y Asistencia realizó un estudio utilizando derivado proteico puro (PPD y tuberculina de Koch) encontrándose lo siguiente:

Lugar	Bovinos estudiados	Reactores	%
D.F.	141 973	2 679	1.9
Jiquilpan Mich.	263	68	25.8
Morelia Mich.	178	86	48.3
Acapulco Gro.	958	102	10.6

En 1966 se aplicó PPD y tuberculina antigua a 1 083 bovinos lecheros procedentes de varios establos del D.F. y 486 fueron reactivos positivos (44.7%). De éstos, solo se sacrificaron 42 y en todos se encontraron lesiones macroscópicas en los ganglios mediastinales compatibles con tuberculosis; en menor número de casos se observaron lesiones en otros grupos ganglionares, (23).

Aún cuando aparentemente la incidencia de tuberculosis decrece, la incidencia relativa de la enfermedad causada por micobacterias diferentes del bacilo tuberculoso (MDBT) o grupo MOTT, aumenta. El papel de la micobacterias antiguamente denominadas "atípicas", últimamente ha cobrado importancia como productoras de enfermedad, ya que se han encontrado con mayor incidencia en procesos infecciosos, tanto en el hombre como en los animales (11). En el primero, se han encontrado produciendo enfermedad pulmonar, lesiones en piel, en problemas genito-urinarios, bacteremias y linfadenitis cervical y las especies involucradas como agentes patógenos son principalmente: M. kansasii, M. avium-intracellulare, M. mageritense, M. marinum, M. scrofulaceum y M. szulgai entre otras (5, 18, 22, 33, 34, 37).

En los bovinos, las infecciones por micobacterias pueden ocurrir tanto por M. tuberculosis, M. bovis o por micobacterias diferentes del bacilo tuberculoso (10). Existen muchas evidencias que sugieren que la leche puede ser el medio a través del cual M. kansasii llega al humano, si éste no fuera el caso, existe la posibilidad de que la leche sirva como vehículo para las MDBT y así explicar tanto la

linfadenitis como otros padecimientos (5, 8). En México este riesgo de transmisión aumenta, debido a que se desconoce la magnitud tanto de la tuberculosis bovina como de la infección por MDTB y a que los ganaderos no permiten que se apliquen las pruebas intradérmicas en sus animales. Se considera que el índice de reactores positivos podría alcanzar hasta el 90% en algunas zonas del Estado de Veracruz, 50% en algunas explotaciones del Estado de México y que en el Estado de Hidalgo no es superior al 20% (30). Si se considera que de los animales enfermos de tuberculosis, entre el 5 y 12% eliminan el bacilo tuberculoso a través de la leche, el riesgo de transmisión al humano, si esta leche no se pasteuriza o se hierva, es elevado; además de que puede presentarse eliminación de micobacterias diferentes del bacilo tuberculoso a través de este alimento (5, 8, 18, 22).

La manera en que puede realizarse un programa de erradicación de la tuberculosis bovina es por medio de las pruebas intradérmicas con Derivado Protefco Puro (DPP o PPD). La intradermorreacción con DPP es una prueba que nos ayuda a diagnosticar la tuberculosis en animales, por lo tanto, juega un papel importante en programas de erradicación (23). Asimismo, mediante estas pruebas se pueden hacer estudios epidemiológicos para conocer la distribución geográfica de la enfermedad. El Comité de Zoonosis de la FAO/WHO en su tercer informe en Génova (1967), plantea como base de la erradicación de la tuberculosis bovina, la aplicación sistemática de la tuberculina (DPP) y la eliminación de los bovinos reactores.

Recomiendan también hacer estudios específicos con el objeto de descubrir si las reacciones dudosas al DPP se deben a la infección por MDT (23).

En México es difícil aplicar un programa de erradicación, debido a la crisis económica por la que atraviesa el país; sin embargo, en la Cuenca Lechera de Tizayuca Hgo., se realiza un programa estricto de eliminación de animales reactivos positivos, pero frecuentemente se presentan reacciones dudosas que hacen pensar en la posible infección por micobacterias diferentes del bacilo tuberculoso (30).

#### 1.4 INMUNOLOGIA

La respuesta inmune a la tuberculosis se presenta cuando un individuo se infecta con el bacilo tuberculoso y desarrolla lentamente una lesión en el sitio de inoculación. Este fenómeno se divide en tres componentes: una reacción inflamatoria acelerada coincidente con la presencia de la pápulo-úlceras y la falla para que el bacilo se disemine a los nódulos linfáticos u otras partes del cuerpo.

La tuberculosis es el prototipo de las enfermedades que inducen inmunidad mediada por células, en donde los anticuerpos no tienen un papel determinante en la patogenia de la enfermedad.

Se piensa que por lo menos dos constituyentes de la pared micobacteriana intervienen en la virulencia del patógeno, los ácidos grasos y el "factor cordón" (dimicolato de trealosa), sustancia que inhibe la migración de leucocitos y estimula la formación inicial de los granulomas.

La estructura y constituyentes de la pared de las micobacterias les permite ser fagocitadas, caer dentro de los fagosomas y eludir la acción en su contra por medio de una sustancia clara, que rodea a las bacterias y que sólo la producen los bacilos vivos. La sustancia clara se extiende hasta la membrana del fagosoma e impide la formación del fagolisosoma, que a su vez facilita la multiplicación del bacilo sin la presencia de sustancias microbicidas.

Se han establecido dos mecanismos que inhiben la fusión lisosoma-fagosoma; una es la secreción por parte del bacilo ingerido, de AMP cíclico que estabiliza la membrana del lisosoma; el otro mecanismo corresponde a los sulfátidos, que inhiben la formación de fagolisosomas. La replicación irrestricta de bacilos intracelulares eventualmente causará la muerte celular posiblemente por la liberación de metabolitos que dañan la membrana del fagolisosoma, permitiendo el escape de material proteolítico al citoplasma de la célula huésped y de bacilos en espacios alveolares.

La patogenia de la enfermedad empieza cuando una microgota con bacilos, evade los mecanismos de remoción y se instala en el alvéolo de un individuo que no ha tenido contacto con el bacilo. Esta primo infección por vía aérea no encuentra obstáculos por parte del huésped, ya que los mecanismos de defensa inespecíficos tienen poca acción, y la inmunidad humoral no participa efectivamente.

Al hacer contacto con las estructuras del alvéolo, el bacilo es rápidamente fagocitado por monocitos macrófagos,

sin embargo, éstos no son capaces de destruirlos, de tal manera, que dentro de estas células se inicia la multiplicación de los bacilos, hasta que finalmente, la célula estalla y libera bacilos al espacio alveolar, además de productos de degradación, que atraen macrófagos alveolares y de la circulación. A estas alturas del proceso ya pueden observarse algunas características de la lesión; se inicia la formación microscópica de un granuloma tuberculoide, donde la lesión se encuentra infiltrada por macrófagos sanguíneos y alveolares, quedando en el centro los bacilos tuberculosos y detritus celulares de fagocitos. Los macrófagos periféricos se organizan en células gigantes multinucleadas denominadas de Langhans; así, algunos bacilos viajan en fagocitos hacia los nodulos linfáticos regionales, donde se desarrolla una respuesta linfoproliferativa de la zona paracortical que comprende a los linfocitos T. Este proceso depende de la magnitud del nódulo y, en general, se presenta de 20 a 40 días después de la implantación del bacilo. La formación granulomatosa local y la reacción ganglionar regional se denomina complejo primario de Ranke, que puede resolverse y llegar con el tiempo a la calcificación, o bien diseminarse, y dar localizaciones en cualquier órgano o tejido en un porcentaje variable (1 a 5%) de los individuos con primoinfección, en quienes la lesión pulmonar progresa haciéndose evidente a la clínica y al estudio radiológico de tórax. En niños y en algunos adultos esta lesión puede ser el punto de partida de diseminación linfohematógena, con

manifestaciones extrapulmonares tan graves, como el caso de meningitis tuberculosa.

Algunos de los linfocitos T, productos de la respuesta linfoproliferativa, con receptores para algún antígeno determinado, en este caso el bacilo tuberculoso, al entrar en contacto con éste desencadenan cambios morfológicos y bioquímicos que finalizan con la división celular de inmunoblastos.

Algunas de estas células dejan al nódulo linfático y van hacia el conducto torácico y de ahí a la circulación, son relativamente radiorresistentes y sensibles a los agentes micóticos, pero no recirculan hacia los ganglios linfáticos porque son de vida corta y desaparecen en pocos días. Lo importante de estas células es que continuamente son estimuladas por el antígeno y en ellos radica la acción efectora de la inmunidad mediada por células, ya que éstas tienen la capacidad de producir las linfocinas. Otra subpoblación de células de vida más prolongada, que no se dividen, recirculan constantemente y se comportan como una población de linfocitos pequeños; además se encuentran en múltiples partes del organismo y permanecen por lapso indefinido, incluso después de que los bacilos viables han sido totalmente eliminados. Estas células de "memoria" son responsables de montar la respuesta inmune secundaria. A estas alturas de la infección, se han establecido la hipersensibilidad mediada por células, que puede hacerse patente por medio del PPD en una prueba de Mantoux. Su



positividad indica contacto previo con el bacilo tuberculoso (4, 11).

### 1.5 EPIDEMIOLOGÍA

La tuberculosis no está uniformemente distribuida, se ha llegado a reducir en muchos países desarrollados, pero resulta ser de gran importancia en países en desarrollo.

La morbilidad en Estados Unidos en 1830, era de aproximadamente 400 por 100 000 habitantes, en 1925 descendió a 80 por 100 000. Esto se atribuye a la mejoría de las condiciones higiénicas personales y generales, así como a la mejoría en la dieta y recursos económicos. Dicho proceso se aceleró a partir de 1944 con el descubrimiento de la estreptomycin y otros tuberculostáticos, de tal manera que para 1974, la mortalidad general no superaba la cifra de 1.8 por 100 000 habitantes.

En México, la tuberculosis continúa siendo un problema de salud pública. Ocupa el tercer lugar entre los de mayor mortalidad para América Latina.

Para 1975 aún fueron notificadas 10 964 muertes por tuberculosis, con una tasa de 18.2 por 100 000 habitantes, y se situó entre las 10 principales causas de defunción. Las tasas más altas se encuentran en los estados de Baja California Norte y Sur, Coahuila, Colima, Chihuahua, Hidalgo, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas y Veracruz (11).

En función de morbilidad, para 1971 se informa una tasa de 32 por 100 000 aunque por la falta de notificación se

considera que la existencia real de la enfermedad es aproximadamente tres veces superior a la conocida.

Se obtienen datos más reales si se analizan los diagnósticos histopatológicos realizados en las diferentes series de autopsias, por lo menos en hospitales de la Ciudad de México. De un análisis de 2 238 diagnósticos anatómicos en 2 202 autopsias que cubren el curso de 5 años del Hospital General de México, el de tuberculosis es el que ocupa el segundo lugar con 304 diagnósticos (13.1%), sólo superado por tumores malignos (680 casos con 29.1%). Y ocupando lugares inferiores: cirrosis hepática, fiebre reumática, amibiasis, arterioesclerosis, etc. (26).

De la misma fuente se obtienen como causas de muerte no diagnosticadas clínicamente, la tuberculosis del SNC, con un porcentaje tan alto como el 37%, y como hallazgos de autopsia sin expresión clínica, a la tuberculosis intestinal, en un 36%.

L. Corella y R. Sanz recabaron información del mismo hospital correspondiente a un período de 11 años (1954-1966), y de 6 588 estudios post mortem en los que aparecen 722 diagnósticos de tuberculosis, con un porcentaje de 11% (28).

Para un período más grande, de 1953 a 1970, que incluye 9 412 autopsias, se diagnosticaron 945 casos, con un porcentaje del 9%.

Respecto a la población infantil, las autopsias del Hospital General de México revelan cifras de mortalidad aún más elevadas, del orden del 15% (11).

## 2. PARTE EXPERIMENTAL.

Para la realización del presente trabajo, se escogió la Cuenca Lechera de Tizayuca Hgo., la cual lleva un programa bien establecido para el control de la tuberculosis; allí se seleccionó a una ruta de establos en la cual se presentaban vacas que dieron reacción sospechosa al derivado proteínico purificado bovino (PPD).

Dicho trabajo se dividió en dos partes: (1) recolección de las muestras de leche en la cuenca mencionada y (2) procesamiento de las muestras efectuado en el Laboratorio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM).

### 2.1 MATERIAL.

#### a) Material biológico.

Leche de vacas con reacción sospechosa al derivado proteínico purificado bovino (PPD).

#### b) Material de Vidrio.

- Matraces erlenmeyer de 1000, 500 y 250 ml
- Pipetas graduadas de 10, 5 y 1 ml
- Tubos con tapón de rosca de 13 X 150 y 13 X 100 mm
- Embudos de vidrio grandes
- Cajas Petri
- Portaobjetos
- Pipetas Pasteur
- Vasos de precipitados de 250 ml
- Frascos con tapón de rosca

c) Equipo

- Agitador mecánico
- Centrifuga con cabezal giratorio
- Microscopio de fluorescencia
- Ollas de presión ,
- Incubadora
- Licuadora con vaso de metal
- Balanza granataria y analítica
- Mecheros de Bunsen
- Membranas Millipore de 0.45 y 0.25  $\mu$ m
- Gradillas

d) Medios de cultivo

- Medio de Löwenstein-Jensen
- Medio de Stonebrink
- Medio de Stonebrink-Lesslie
- MacConkey sin cristal violeta
- Caldo Dubos
- Base de agar-urea

## 2.2. Metodología

a) Toma de muestra

El número de vacas estudiadas fué de 47, las cuales dieron sospechosa la prueba al derivado proteico puro bovino (PPD). Inicialmente se tenía programado tomar 3 muestras de leche por animal en días alternados; sin embargo, no fué

posible y sólo en 34 animales se obtuvieron las tres muestras, en 8 se obtuvieron dos y en 5 únicamente se obtuvo una. El total de muestras analizadas fué de 123.

La forma en que se procedió a hacer la toma de muestra fué: (1) se lavó con agua la ubre y después se desinfectó con yodo y/o alcohol etílico al 70% y (2) se colectaron los primeros chorros de leche a partir de los cuatro cuartos para reunir un volumen aproximado de 50 ml por animal. Mientras se hacía esta colección—ya que las vacas se encontraban en diferentes establos de la cuenca— los frascos de leche se marcaron para su identificación y se mantuvieron en hielo para evitar el desarrollo de bacterias. Posteriormente se trasladaron al laboratorio y allí se mantuvieron a -70 grados centígrados hasta que se procesaron.

#### b) Aislamiento

Los frascos se etiquetaron de la siguiente manera: con un número en orden progresivo del 1 al 47, especificando si era primera, segunda o tercera muestra.

La técnica para el procesamiento de muestras fué el descrito por Chapman y col (5) y consistió en lo siguiente: a 100 ml de leche se le adicionó un volumen igual de fosfato trisódico al 10% y 5 ml de cloruro de benzalconio 1:1,000. Esta mezcla se agitó mecánicamente durante una hora y posteriormente se centrifugó a 3 000 g durante 30 min. Con el sobrenadante se sembró en los medios de Löwenstein-Jensen, Stone-Brink y Stonebrink-Lesslie, el sedimento se lavó con solución salina estéril centrifugando nuevamente a 3 000 g/30 min, y una vez hecho esto se sembró el sedimento en tubos con

los medios mencionados antes. Todos los tubos se incubaron a 37 grados centígrados en una estufa con atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>, dejándolos acostados las primeras 24 horas. Se hicieron observaciones macroscópicas semanales con el fin de detectar el desarrollo de colonias, hasta completar el período de 12 semanas de incubación.

En cuanto apareció crecimiento se realizaron frotis que se tifieron por las técnicas de Ziehl-Neelsen y fluorescencia, las colonias que resultaron positivas en las tinciones se resembraron en el medio de donde originalmente se habían aislado con el fin de tener colonias recientes, puesto que existe deshidratación; una vez hecha la resiembra se llevó a cabo la identificación bioquímica.

#### c) Identificación.

La identificación de las micobacterias se efectuó con base en las siguientes propiedades: (1) tiempo de crecimiento, (2) producción de pigmento y morfología de las colonias [ las colonias blancas, cremas o color ante se consideran no cromógenas -NC- y las colonias amarillo limón, naranjas o rojas se describen como pigmentadas o cromógenas -C-; la coloración intermedia de las colonias tal como rosa o amarillo pálido se consideran como no cromógenas. Las colonias se describen usualmente como rugosas (R), Lisas (L), convexas (Cx). Con ayuda de un microscopio estereoscópico se puede observar el borde de las colonias, borde liso (Bl) o borde irregular (Bi) ] y (3) propiedades bioquímicas; para

cuya realización se empleó el método descrito por Vestal y Tsukamura (35, 36).

Las pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de las micobacterias fueron las siguientes: Reducción de nitratos, catalasa (temperatura ambiente, semicuantitativa), hidrólisis del tween 80, reducción de telurito, crecimiento en NaCl 5%, aril sulfatasa (a los 3 y 5 días), crecimiento en agar MacConkey, detección de ureasa, pirazinamidasa y asimilación de hierro.

Especie	Ureasa	Asimilación hierro	Reducción nitrato	Catalasa		Hidrólisis tween	Reducción telurito	Crecimiento NaCl 5%	Aril Sulfatasa		Crecimiento Agar MacConkey	Pirazinamida
				Temperatura ambiente	Semicuanti- tativa				3d	2s		
<i>M. flavescens</i>	+		+	+	45	(A/G) 5-10	-	+	-	-/4+	-	+
<i>M. chelonae</i>	+	-	-	+	45	-	v	v	+	+	+	-
<i>M. smegmatis</i>	+	+	+	+	45	5	+	+	-	+	-	+
<i>M. phlei</i>	+	+	+	+	45	5	+	+	-	-/3+	-	+
<i>M. vaccae</i>	+	+	+	+	45	5	v	+	-	3+	-	+
<i>M. parafortuitum</i>	+		+	+		7			+	+		+

v = variable

/ = variabilidad que presenta la cepa (-/4+) de negativa a positiva, por ejemplo.

Cuadro de las pruebas características de micobacterias de crecimiento rápido.



### 3. RESULTADOS

De las muestras de leche de 47 vacas estudiadas 18 resultaron positivas para micobacterias, lo que corresponde a un 38.3%.

De las 123 muestras de leche estudiadas, 23 fueron positivas para micobacterias, que corresponden al 18.7% (Gráfica 1 y 2).

En todos los casos las micobacterias aisladas correspondieron al grupo de micobacterias diferentes del bacilo tuberculoso (MDBT), esto se estableció en base a que todas fueron de crecimiento rápido y con producción variable de pigmento (cuadro 1).

Las cepas aisladas e identificadas fueron: M. smegmatis, M. parafortuitum, M. flavescens, M. chelonae, M. phlei y M. vacae (cuadro 2), observándose además que la especie identificada más frecuentemente fué el complejo M. parafortuitum, y las menos frecuentes M. vacae, M. phlei, y M. chelonae (gráfica 3).

Se obtuvo un solo caso (29/1, 2, 3) en que se aisló el mismo microorganismo (M. parafortuitum) de las 3 muestras estudiadas. En dos casos (14/2, 14/3, y 30/2, 30/3) se aislaron dos especies distintas a partir de 2 muestras de leche diferentes de la misma vaca, que fueron M. smegmatis y M. parafortuitum en 1 caso y en el otro M. vacae y M. parafortuitum respectivamente. En los demás se aisló sólo una especie (cuadro 3).

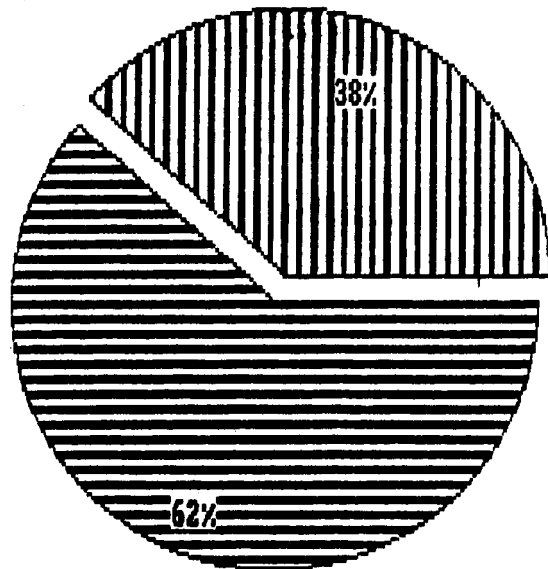
De acuerdo a los medios de cultivo empleados, se observó que el mejor para el aislamiento primario de las

micohacterias fué el Stonebrink-Lesslie, dado que en los otros dos medios utilizados se presentó una alta contaminación por hongos filamentosos principalmente.

No se reportan los resultados de la prueba con DPP de las vacas porque no se realizó específicamente en este trabajo, sino dentro del Programa del Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca Hgo., en éste se señala hacer la prueba intradérmica con DPP para el diagnóstico de la tuberculosis cada tres meses.

GRAFICA 1.

AISLAMIENTO DE MICOBACTERIAS EN 47. VAGAS



% AISLAMIENTO

 AISLAMIENTOS (+) 38%

 AISLAMIENTOS (-) 62%

GRAFICA 2.

AISLAMIENTO EN 123 MUESTRAS DE MICOBACTERIAS.

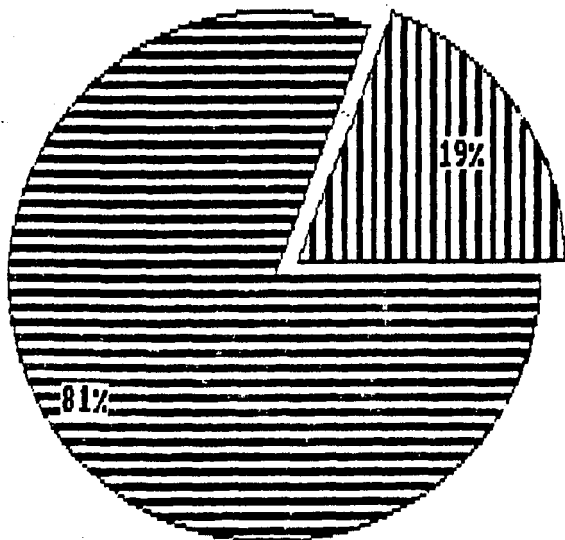
% AISLAMIENTO



AISLAMIENTO (+) 19%



AISLAMIENTO (-) 81%



MUESTRA	TIEMPO DE CRECIMIENTO (días)	CARACTERISTICAS DE LA COLONIA
2/2	3 - 5	NC R Bi
3/1	3 - 5	C L Cx
10/1	3 - 5	NC L y muy densa
14/3	3 - 5	C Cx Bl
14/3	3 - 5	NC R Bi
15/1	3 - 5	NC R Bi
16/2	3 - 5	NC R Bi
17/2	3 - 5	C L Cx
23/3	3 - 5	C Cx Bl
24/1	3 - 5	C L Cx
29/1	3 - 5	C L Cx
29/2	3 - 5	C Cx Bl
29/3	3 - 5	C L Cx crec. abundante
29/4	3 - 5	C L Cx
30/2	3 - 5	C L exagerada produc. pigmento
30/3	3 - 5	C Cx Bl
31/3	3 - 5	C L Cx
33/2	3 - 5	C R
36/2	3 - 5	NC R Cx
40/3	3 - 5	C L Cx
41/1	3 - 5	C L Cx
45/3	3 - 5	C L Cx
47/2	3 - 5	C L Cx

1er. núm = No. de cepa  
 2do. núm = No. de muestra  
 (primera  
 segunda o  
 tercera).


C = Cromógena  
 NC = No cromógena  
 L = Lisa  
 R = Rugosa  
 Cx = Convexa.  
 Bl = Borde liso  
 Bi = Borde regular

CUADRO 1. Cepas de Mycobacteria aisladas de las muestras de leche.

ESPECIE IDENTIFICADA	NUMERO DE AISLAMIENTOS	PORCENTAJE
<u>M. parafortuitum</u>	13	56.5%
<u>M. smegmatis</u>	5	21.7%
<u>M. flavescens</u>	2	8.7%
<u>M. chelonae</u>	1	4.3%
<u>M. vaccae</u>	1	4.3%
<u>M. phlei</u>	1	4.3%
	23	99.8%

CUADRO 2. Especies de micobacterias identificadas.

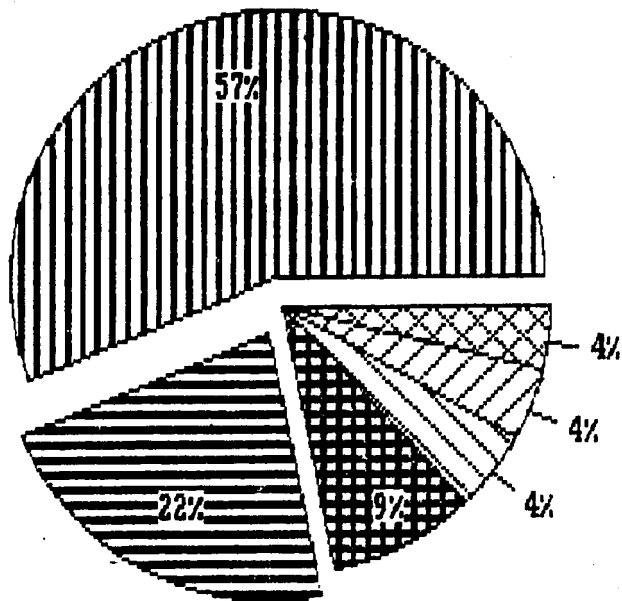
	Aril-Sulfatasa		Crecimiento NaCl 5%	Reducción nitratos	Crecimiento agar McConkey	Asimilación hierro	Pirasinamida	Hidrólisis tween 80	Reducción telurito	Ureasa	Catalasa		
	3d.	2s.									temperat. ambiente	Semicuant.	
2/2	-	+	+	3+	-	+					+		M. <u>smegmatis</u>
3/1	-	-	+	+	+	-					+		M. <u>flavescens</u>
10/1	-	-	+	-	-	-					+		M. <u>chelonae</u>
14/3	-	-	+	+	-	-			+		+		M. <u>parafortuitum</u>
14/3*	-	+	+	+	-	+					+		M. <u>smegmatis</u>
15/1	-	-	+	+	-	+					+		M. <u>smegmatis</u>
16/2	-	+	+	+	-	+					+		M. <u>smegmatis</u>
17/2	-	-	+	+	-	-		+ 6d	-		+	45 mm	M. <u>flavescens</u>
23/3	-	-	+	-	-	-		+ 6d	-		+	45 mm	M. <u>parafortuitum</u>
24/1	-	-	+	-	-	-		+ 6d	-		+	45 mm	M. <u>parafortuitum</u>
29/1	-	-	+	-	-	-			+		+		M. <u>parafortuitum</u>
29/2	-	-	+	+	-	-			+		+		M. <u>parafortuitum</u>
29/3	-	-	+	-	-	-					+		M. <u>parafortuitum</u>
29/4	-	-	+	-	-	-					+		M. <u>parafortuitum</u>
30/2	-	+	+	+	-	+	+ 4d	+ 5d	-	-	+	45 mm	M. <u>vaccae</u>
30/3	-	-	+	-	-	-	+ 6d	-	-		+	45 mm	M. <u>parafortuitum</u>
31/3	-	-	+	+	-	-			-		+		M. <u>parafortuitum</u>
33/2	-	+	+	+	-	-		+ 6d	+		+	45 mm	M. <u>phlei</u>
36/2	-	+	+	+	-	+					+		M. <u>smegmatis</u>
40/3	-	-	+	+	-	-		+ 6d	-		+	45 mm	M. <u>parafortuitum</u>
41/1	-	+	+	-	+	-		+		-	+	45 mm	M. <u>parafortuitum</u>
45/3	-	-	+	+	-	-		+ 14d			+	45 mm	M. <u>parafortuitum</u>
47/2	-	-	+	+	-	-		+ 6d	-		+	45 mm	M. <u>parafortuitum</u>


 No. de muestra (primera, segunda o tercera).  
 No. de cepa.

CUADRO 3. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de las micobacterias.

GRAFICA 3.

ESPECIES DE MICOBACTERIAS IDENTIFICADAS



LEYENDA DE AISLAMIENTO



*M. parafortuitum*



*M. smegmatis*



*M. flavescens*



*M. chelonae*



*M. vaccae*



*M. phlei*



#### 4. DISCUSION.

Tomando en cuenta que de 123 muestras 23 resultan positivas para micobacterias (18.7%), se puede decir que el porcentaje de muestras contaminado con el microorganismo mencionado es elevado, comparado con lo descrito por otros autores (5, 8). Más aún si se considera el número de vacas estudiado, pues resulta preocupante que 18 de las 47 muestras de leche de las vacas estudiadas hayan resultado positivas.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede observar que no en todas las muestras seriadas colectadas de una sola vaca se aisló la misma especie de micobacterias, lo que sugiere que las identificadas pudieran formar parte de la flora transitoria de la ubre o bien ser flora del medio ambiente que contaminó la muestra al momento de colectarla. Esto puede apoyarse por el hecho de que en dos casos, en muestras diferentes de la misma vaca, se aislaron distintas especies de micobacterias. De haberse podido tomar las 3 muestras por animal, se podrían aclarar mejor las sospechas de que los animales estuvieran o no infectados por las micobacterias y, por tanto, sensibilizados.

Respecto a la contaminación de la muestra en el momento de colectarla sí es de consideración, ya que dicha toma no siempre fué posible que la realizara una persona entrenada, sino que muchas veces fueron tomadas por los ordeñadores, que probablemente no tomaron en cuenta las medidas de desinfección a pesar de que se les indicó, reflejándose esto en el crecimiento de hongos filamentosos, levaduras y

bacterias en los medios menos selectivos como son el Löwenstein-Jensen y Stonebrink. Las cepas aisladas se obtuvieron en el medio de Stonebrink-Lesslie que además de tener cicloheximida y verde de malaquita como inhibidores, contiene cristal violeta. Aquí se observa la ventaja de haber sembrado en los tres medios cada muestra. Aunque es posible que esta contaminación pudo haber enmascarado el crecimiento de M. bovis, M. tuberculosis u otras micobacterias. Porque de hecho, estas micobacterias sí crecen en los otros medios, como se comprobó cuando se practicaron las pruebas bioquímicas, ya que algunas se realizaron en medio de Löwenstein y se observó crecimiento.

Para la identificación de las micobacterias, después de hacer la observación macroscópica de las colonias, se realizaron dos frotis: uno para tinción de Ziehl-Neelsen y otro para fluorescencia; esto tuvo dos ventajas, la fluorescencia para saber que en realidad se trataba de una micobacteria y la tinción de Ziehl-Neelsen para ver al bacilo ácido alcohol resistente y si se encontraba pura la cepa. Si se realizara sólo la tinción de Ziehl-Neelsen se podría confundir una micobacteria con una corinebacteria o con Nocardia.

Además, cabe hacer notar que Francisco Soto (30) aisló únicamente M. vaccae y M. phlei a partir de leche de animales PPD negativos de la misma cuenca; lo que sugiere que algunas de estas especies aisladas en el presente trabajo pudieran interferir con las pruebas intradérmicas aún cuando sean contaminación del medio ambiente y fueran flora transitoria

de la glándula mamaria. Lo anterior se confirma por el aislamiento de M. parafortuitum y M. flavescens a partir de diferentes ganglios linfáticos de bovinos PPD sospechosos en la misma cuenca (16).

Se podrá ver en la tabla de los resultados de las pruebas bioquímicas para el microorganismo identificado como M. parafortuitum, que no se presenta el mismo comportamiento bioquímico que los demás. Para este caso se tomó el criterio según Tsukamura (31) todas las micobacterias de crecimiento rápido y cromógenas, agruparlas en el complejo M. parafortuitum.

Por último, se mencionará que el bloque de pruebas bioquímicas usado para la identificación de las micobacterias aisladas sí facilitó su identificación, sólo en el caso de la identificación de M. parafortuitum no fué así. Estas pruebas, además, ofrecen la ventaja de que proporcionan suficiente precisión de los resultados, aunque sí son laboriosas de realizar.

## 5. CONCLUSIONES

- Algunas de las especies de micobacterias diferentes del bacilo tuberculoso tienen amplia distribución en la cuenca lechera de Tizayuca, Hgo., (38.3%).
- Las micobacterias diferentes del bacilo tuberculoso tienen una amplia distribución en el medio ambiente, lo cual favorece la infección de los animales (38.3%) y el hombre.
- El medio de Stonebrink-Lesslie, comparado con los de Lodenstein-Jensen y Stonebrink fué el mejor para el aislamiento de las micobacterias.
- Algunas micobacterias diferentes del bacilo tuberculoso es probable que estén interfiriendo en las pruebas intradérmicas para el diagnóstico de la tuberculosis.
- Tomando en cuenta los resultados, obtenidos se podría decir que no es recomendable la ingestión de la leche sin pasteurizar o hervir, debido al tipo de microorganismo que se transmite a través de ella.

ANEXO 1

MEDIO DE LOWENSTEIN-JENSEN

Ingredientes

Fosfato Monopotásico anh. (PO H K)	2.4 g
Sulfato de Magnesio (SO <sup>4</sup> Mg.7H <sup>2</sup> O)	0.24 g
Citrato de Magnesio	0.6 g
L-asparagina	3.6 g
Glicerina	12.0 ml
Agua destilada	600.0 ml
Huevos enteros	1000.0 ml
Verde de Malaquita al 2%	20.0 ml

Equipo necesario

Preparar y esterilizar:

- Un frasco fraccionador de 2 litros, provisto de caño de goma o látex, pinza de Mohr y accesorio en forma de campana para verter. De ser posible debe contener también una barra magnética para mezclar.
- Un embudo grande con dos capas de gasa. Sujete la gasa con tela adhesiva al borde del embudo para que no se mueva. Doble un trozo de tela de algodón o lino sobre el embudo forrado con la gasa para protegerlo de la contaminación ambiental. Envuelva en papel para esterilización.
- Probeta graduada de 1 litro.
- Frasco de licuadora o mezcladora, con tapa. De no poseerla, se preparará en su lugar un matraz de 2 litros de

capacidad con trozos de vidrio en su interior a fin de homogenizar los huevos con agitación manual.

- Tubos con tapón de rosca, en cantidad suficiente.

#### Metodología.

Disolver las tres primeras sales y la asparagina en 200 ml de agua destilada. Calentar en baño María hasta disolución de la asparagina.

Pasar a un frasco de 2 litros de capacidad, agregar el agua destilada hasta completar 600 ml y 12 ml de glicerina.

Esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 121 grados centígrados, enfriar a temperatura ambiente.

Los huevos deben de ser frescos, se limpian con agua tibia y detergente, se enjuagan con agua corriente y se dejan secar. Luego se sumergen en alcohol etílico 70 % durante 15 minutos. Se van rompiendo los huevos, uno a uno, en el borde de la probeta estéril de un litro, y vaciando en ella su contenido, de allí se trasvasan al frasco de la licuadora, donde se mezclan cuidando de causar exceso de burbujas. Los huevos ya homogeneizados se vacían en el matraz donde ya está la solución de sales, asparagina y glicerol, y se agrega la solución de verde de malaquita.

Se filtra en el embudo estéril forrado con gasa y se recibe el filtrado en el frasco fraccionador, cuidando de cerrar con pinza de Mohr el caño de goma de salida.

Distribuir el medio utilizando la campana y la pinza de Mohr, trabajar en forma estéril. Distribuir el medio en cantidades de 9 ml en tubos estériles de 20 X 125 mm con

tapón de rosca o 7 ml en tubos de 17 X 170 o 18 x 180. Coagular, dejando los tubos inclinados durante 40 minutos a 80 grados centigrados.

Terminada la coagulación los tubos se dejan enfriar y luego se incuban a 37 grados centigrados durante 24-48 horas para controlar su esterilidad y eliminar el agua de condensación.

#### MEDIO DE STONEBRINK-LESSLIE

Ingredientes (mezcla salina)

Fosfato monopotásico (PO H K) 4 2	2.5 g
Piruvato de sodio	6.25 g
Agua destilada	375.0 ml
Fosfato disódico (PO HNa 2H O) cbp 4 2 2	pH6.5
Mezcla de huevo-huevo total	1000.0 ml
Mezcla para la coloración	
Cristal violeta	125 mg
Verde malaquita	1000 mg
Agua destilada	125 ml
Ciclo heximida	0.75 g

Las mezclas salinas y de coloración se esterilizan en autoclave durante 20 minutos a 120 grados centigrados.

Las tres mezclas se agitan y se filtran a través de gasa estéril. La mezcla final se distribuye en cantidad de 4-6 ml en tubos con tapón de rosca de 26 X 125 mm, el medio se coagula en posición inclinada a 80 grados centigrados durante 30 minutos. El color del medio es azul intenso.

## MEDIO DE STONEBRINK

Es igual que el medio de StoneBrink-Lesslie solo que éste no lleva cristal violeta.

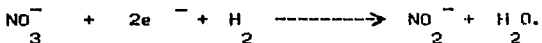


## ANEXO 2

### Pruebas bioquímicas.

#### Reducción de nitratos.

Las micobacterias que contienen nitrato-reductasa, tienen la capacidad de reducir el nitrato en nitritos o en nitrógeno libre. La reacción química es:



La presencia de nitrito en el medio se detecta añadiendo sulfanilamina y alfa-naftiletilendiamina en un pH ácido. Si hay nitritos se forma un colorante rojo de diazonio.

Se prueban los cultivos micobacterianos 3 o 4 semanas después de que aparecen colonias visibles. Entre las micobacterias de significado clínico, M. tuberculosis, M. kansasii y M. azulgai son nitrato positivas. Otras que son positivas incluyen a M. flavescens, a especies comunmente saprofiticas no fotocromógenas y especies de crecimiento rápido.

#### Reactivos

Se preparan 3 soluciones

- No. 1. Una solución de HCl concentrado diluido 1:2 con agua destilada.
- No. 2. Disolver 0.2 g de sulfanilamina en 100 ml de agua destilada.
- No. 3. Disolver 0.1 g de n-naftiletilendiamina dihidroclórica en 100 ml de agua destilada.

Proteger estos reactivos de la luz y mantenerlos en refrigeración.

**Controles:**

**Negativo:** sustrato no inoculado.

**Positivo:** sustrato inoculado con M. tuberculosis

**Procedimiento.**

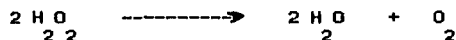
- Se toma una asada del cultivo a investigar y se suspende en 3 o 4 gotas de agua destilada estéril.
- Se agregan 2 ml de NaNO<sub>3</sub>.
- Se agita e incuba a 37 grados centígrados durante 2 horas.
- Agregar a cada tubo una gota del reactivo No.1, agitar.
- Adicionar a cada tubo 2 gotas del reactivo No. 2.
- Adicionar a cada tubo 2 gotas del reactivo No. 3.

**Resultados**

- Si hay desarrollo de color, la prueba es positiva. Este desarrollo de color puede variar de rosa a rojo intenso.
- Si no ocurre cambio de color, confirmar resultados agregando una pequeña cantidad de polvo de zinc.
- Si hay desarrollo de color después de agregar el zinc, se confirma que hay un cambio de color y el resultado fué negativo.
- Si no ocurre cambio de color después de agregar zinc, la reacción fué positiva.

## Catalasa.

Los microorganismos que producen la enzima catalasa, tienen la capacidad de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre.



Virtualmente todas las micobacterias, excepto ciertas mutantes isoniazida-resistentes de M. tuberculosis y M. gastri, poseen enzima catalasa.

Ciertas especies de micobacterias pierden la actividad catalásica cuando se suspenden en amortiguador a pH 7 y se calientan a 68 grados centígrados; éstas incluyen a M. tuberculosis, M. bovis, M. gastri, algunas cepas de M. marinum y el complejo M. avium.

## Reactivos.

- Peróxido de hidrógeno al 30%, mantener en refrigeración.
- Tween 80 al 10% preparado como sigue: mezclar 10 ml de tween 80 con 90 ml de agua destilada. Esterilizar en autoclave durante 10 minutos a 121 grados centígrados. Mantener en refrigeración.
- Inmediatamente antes de realizar la prueba, mezclar iguales partes de tween y peróxido (se emplean aproximadamente de 0.5 a 1.0 ml de la mezcla para cada cultivo a probar).

## Controles.

Negativo = medio no inoculado

Positivo = medio inoculado con M. fortuitum.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

#### Procedimiento.

A temperatura ambiente, agregar 1 o 2 gotas de la mezcla peróxido-tween a los cultivos sobre una placa. Observar la formación de burbujas. Esto puede requerir 5 minutos.

#### Resultados.

Positivo (rápido) = inmediatamente se forman burbujas.

Positivo (lento) = lentamente se forman las burbujas.

Negativo = No hay formación de burbujas.

#### Procedimiento de la prueba de catalasa semicuantitativa.

- Preparar tubos especiales para colocar 5 ml de medio de Löwenstein, con tapón de rosca y estériles.
- Inclinarlos en un baño a 85 grados centigrados por 50 minutos para solidificar el medio.
- Inocular la superficie del medio con 0.1 ml de una suspensión de microorganismos o estriar una pequeña asada del cultivo a probar.
- Incubar a 37 grados centigrados con el tapón del tubo no muy apretado, por dos semanas.
- Después de las dos semanas de incubación, agregar 1.0 ml de la mezcla tween-peróxido.
- Medir en mm el nivel de la columna de burbujas que se alcanza sobre la superficie del medio.

#### Resultados.

Positivo débil (<45) = la columna de burbujas es menor de 45

mm.

Positivo fuerte (>45) = la columna de burbujas es mayor de 45 mm.

Negativo = no hay formación de burbujas.

#### Hidrólisis del tween 80.

Ciertas micobacterias poseen una lipasa que desdobra el tween 80 (monooleato de polioxietilén sorbitol) en ácido oleico y sorbitol polioxietilado, con modificación en las características ópticas de la solución que pasa del color amarillo pajizo (producido cuando la luz atraviesa la solución de tween 80 intacta) al rosado. El cambio de color en el indicador no se debe a un cambio en el pH, ya que al ácido formado lo neutraliza la solución amortiguadora utilizada. El cambio de color indica la hidrólisis o degradación del tween 80.

Esta prueba separa las escotocromógenas y no fotocromógenas, de significado clínico, de las saprofiticas, comunmente representativas de este grupo. También es una excelente prueba confirmativa para M. kansasii.

#### Sustrato.

- Combinar: 100 ml de amortiguador de fosfatos M/15.

0.5 ml de tween 80

2.0 ml de solución acuosa patrón de rojo neutro al 0.1 %

- Vaciar en tubos de 16 X 125 mm cantidades de 2 ml.

- Esterilizar en autoclave 10 minutos a 121 grados centígrados. Esto puede dar un líquido color ámbar después

de la esterilizada.

Este sustrato puede guardarse en la oscuridad y en refrigeración por 2 semanas.

#### Controles:

Negativo = sustrato no inoculado.

Positivo = sustrato inoculado con M. kansasii

#### Procedimiento.

- Vaciar en tubos el sustrato de tween 80 correspondientes al número de cepas a probar.
- Inocular con una asada del cultivo, al sustrato. Inocular el control positivo.
- Incubar a 37 grados centigrados.

#### Resultados.

- Observar el cambio de color del líquido de ámbar a rosa o rojo. No agitar el tubo para hacer la lectura. Una prueba positiva ocurre cuando el líquido, no las células, torna a rosa o rojo.
- Leer a las 24 horas, reportar y descartarlo como positivo.
- Leer a los 5 días, y descartar como positivo.
- Leer de 10-12 días. Reportar el resultado final y descartar los demás tubos.

#### Reducción de telurito.

Las células micobacterianas reducen las sales de telurito a telurio metálico, éste actúa como un aceptor artificial de electrones y se reduce a telurio metálico de color negro.

Los cultivos de crecimiento lento no fotocromógenos (M. avium-intracellulare) son positivos a los tres días, otros no fotocromógenos comunmente son negativos a los tres días.

Reactivo.

Telurito de potasio al 0.2%.

- Disolver 0.1 g de telurito de potasio en 50 ml de agua destilada.
- Vaciar en tubos en cantidad de 2 ml.
- Esterilizar en autoclave 10 min.
- Conservar en refrigeración.

Controles:

Negativo = medio no inoculado

Positivo = medio inoculado con M. avium

Procedimiento.

- Inocular el medio líquido con una asada del cultivo.
- Incubar a 37 grados centigrados 7 días. Si el medio se ve muy turbio no prolongar el tiempo de incubación. Si el medio está un poco turbio y se sospecha del complejo M. avium repetir la prueba con un subcultivo fresco.
- Con pipeta Pasteur agregar 2 gotas de la solución de telurito a cada tubo. Descartar la solución de telurito no utilizada.
- Reincubar a 37 grados centigrados.
- Al tercer día, leer los resultados. No agitar el tubo.

#### Resultados.

Positivo = precipitado blanco metálico de telurio.

Negativo = no se forma el precipitado.

Crecimiento en NaCl al 5%.

Los microorganismos tienen la capacidad de desarrollar en medios con alta concentración de sal.

Esta es una prueba para confirmar crecimiento rápido y crecimiento lento, M. triviale, M. flavescens algunas veces crecen en NaCl.

#### Medio.

Medio inclinado de Löwenstein-Jensen con 5% de NaCl.

Medio de Löwenstein-Jensen sin NaCl.

-- Hacer una suspensión de microorganismos con agua destilada o solución salina estéril.

#### Procedimiento.

- Inocular el medio con NaCl al 5% y el medio sin NaCl (control) con 0.1 ml del inóculo.
- Incubar a 37 grados centigrados.
- Leer después de que se presente el crecimiento.
- Los cultivos pueden descartarse después de 4 semanas de incubación.

#### Resultados.

Positivo = crecimiento en el medio con NaCl y crecimiento en el medio control.

Negativo = no crece en el medio con NaCl pero sí en el medio control.



#### Aril Sulfatasa.

La aril sulfatasa es una enzima que libera fenoltaleína por desdoblamiento de la sal tripotásica del disulfato de fenoltaleína que se incorpora al agar ácido oleico; la prueba se realiza añadiendo una pequeña cantidad de una solución alcalina de carbonato de sodio a la superficie de un cultivo de 3 días. La aparición de un color púrpura indica una prueba positiva.

Existen dos métodos que comúnmente se usan para detectar esta enzima, un medio sustrato líquido y un medio sólido.

Se usó el medio líquido. Este consiste en dos pruebas: A los 3 días y a las 2 semanas; la primera es de más valor para la identificación de micobacterias de crecimiento rápido, y algunas de crecimiento un poco lento, mientras que la segunda se usa principalmente con especies de crecimiento lento.

Inocular todas las micobacterias al medio sustrato tanto para la prueba a los 3 días como para la de las 2 semanas. Los patógenos potenciales de crecimiento rápido comúnmente son positivos a los 3 días, mientras que las especies saprófitas no son positivos antes de las 2 semanas. Los cultivos de crecimiento lento que se prueban a los 3 días y/o a las 2 semanas pueden ser útiles para M. marinum, M. szulgai, M. xenopi, M. triviale y M. flavescens.

Medio sustrato líquido.

Preparación del sustrato patrón.

- Disolver 2.6 g de fenolftaleína disulfato, sal tripotásica, en 50 ml de agua destilada, esto da una solución 0.08 M.
- Esterilizar por filtración (membrana Millipore de 0.45  $\mu$ m).
- Mantener en refrigeración.

Nota: Antes de usar el disulfato de fenolftaleína, probar presencia de fenolftaleína libre, la cual puede dar una reacción falsa positiva.

Preparación.

- Usar caldo Dubos o Middlebrook 7H.9
- El caldo Dubos se prepara al 5% con fracción V de albúmina bovina.
- Se esteriliza por filtración, con membrana Millipore de 0.25  $\mu$ m.
- Se preparan 2 matraces con 200 ml de este medio.

Medio Sustrato final.

- Adicionar 2.5 ml de sustrato patrón 0.08 M a 200 ml de medio líquido estéril. Esto da un sustrato 0.001M para la prueba de 3 días.
- Agregar 7.5 ml del sustrato patrón 0.08M a 200 ml de medio líquido estéril. Esto da un sustrato 0.003M para la prueba de 2 semanas.
- Asépticamente vaciar 2 ml de sustrato final a tubos con tapón de rosca estériles.

- Para el control de calidad, al sustrato no inoculado se le agregan 2 gotas de carbonato de sodio. El sustrato debe quedar incoloro, si la solución torna a rosa descartar el sustrato y checar la solución patrón.

#### Reactivo

Carbonato de Sodio 2N.

#### Controles:

Negativo = medio sustrato no inoculado

Positivo = medio sustrato inoculado con M. fortuitum

#### Procedimiento.

- Inocular los tubos que contienen sustrato con 0.1 ml de un cultivo de microorganismos en medio líquido o con una asada de un cultivo fresco.
- Incubar a 37 grados centigrados.
- Después de 3 días de incubación el sustrato 0.001M se retira de la incubadora y agregar no más de 6 gotas de solución de carbonato de sodio 2N.
- Después de 2 semanas de incubación del sustrato 0.003M, sacar de incubación y agregar solución de carbonato de sodio 2N.

#### Resultados.

Positivo = cambio de color a rosa o rojo.

Negativo = no hay cambio de color.

Crecimiento en Agar MacConkey.

La capacidad de M. fortuitum para crecer en agar MacConkey se usa como criterio para la separación de este microorganismo de otros de crecimiento rápido. M. fortuitum desarrolla en 5 días mientras que otras micobacterias de crecimiento rápido son inhibidas.

Se inoculan todos los cultivos de crecimiento rápido en agar MacConkey. M. fortuitum y M. chelonae presentan crecimiento y algunas veces cambian de color de 5 a 11 días.

Medio

Agar MacConkey sin cristal violeta, 20 ml por placa.

Controles:

Negativo = medio no inoculado y una placa inoculada con M. chlei

Positivo = placa inoculada con M. fortuitum

Procedimiento.

- Se puede dividir la placa con medio en cuadros de 2 cm<sup>2</sup>, y allí inocular en cada cuadro una cepa diferente, lo mismo que la cepa control, se siembra por la técnica de estría.
- Incubar a 37 grados centígrados sin atmósfera de CO<sub>2</sub>.
- Leer a los 5 y 11 días.

Resultados

Positivo = hay crecimiento, puede ocurrir también cambio de color.

Negativo = no hay crecimiento.

## Ureasa

La ureasa es una enzima que puede hidrolizar urea, se produce en esta reacción amoníaco y dióxido de carbono.

Los escotocromógenos como M. scrofulaceum son ureasa positivos, ya que ocasionalmente se encuentran cepas pigmentadas del complejo M. avium, M. xenopi y M. goodii que son negativas.

## Sustrato

Mezclar una parte de agar base de Difco-Bacto Urea concentrada con 9 partes de agua destilada, no agregar agar. Vaciar en cantidades de 3 ml en tubos de 13 X 100 con tapón de rosca.

## Controles:

Negativo = sustrato no inoculado

Positivo = sustrato inoculado con M. scrofulaceum, M. fortuitum o M. gastri.

## Procedimiento

- Inocular el sustrato líquido con una asada del cultivo.
- Incubar a 37 grados centígrados.
- Observar el cambio de color a rosa o rojo. Descartar después de 3 días.

## Resultados

Positivo = cambio de color a rosa o rojo.

Negativo = no hay cambio de color.

## Pirazinamidasa

En esta prueba, M. marinum es positivo a los 4 días y M. kansasii es negativo. M. bovis es negativo a los 4 y 7 días y el complejo M. avium y M. tuberculosis son positivos a los 4 días. Esta característica puede ayudar a diferenciar M. bovis niacina débilmente positiva, de M. tuberculosis, y a distinguir a M. bovis de otros miembros del complejo M. avium.

## Medio

Base de caldo Dubos 6.5 g

Agua destilada 1000.0 ml

### - Disolver y agregar:

Pirazinamida 0.1 g

Piruvato de sodio 2.0 g

Agar 15.0 g

- Calentar para disolver el agar. Vaciar en tubos con tapón de rosca en cantidades de 5 ml.

- Esterilizar en autoclave 15 minutos/121 grados centígrados.

Dejar enfriar el medio sin inclinarlo.

## Reactivos:

Sulfato ferroso y amonio al 1%. Prepararlo justo antes de usarlo.

## Controles:

Negativo = medio no inoculado

Positivo = medio inoculado con M. avium (intracellulare)

### Procedimiento

- Inocular la superficie del medio con los cultivos frescos, usando una asa adecuada que facilite esta operación, se siembra por duplicado. Incubar a 37 grados centigrados.
- Después de 4 días, sacar de la incubadora y agregar 1 ml de solución de sulfato ferroso y amonio a los primeros tubos.
- Poner los tubos en refrigeración para evitar la contaminación.
- Después de 4 horas ver si a los tubos se les ha formado una banda rosa en el agar. Para leer colocar los tubos sobre un fondo blanco.
- Después de 7 días de incubación, sacar los segundos tubos y hacer lo mismo que con los primeros.

Nota: Si a los 4 días la prueba es positiva, no es necesario esperar el segundo cultivo de 7 días.

### Resultados

Positivo = una banda rosa en el agar.

Negativo = no hay formación de banda rosa en el agar.

### Asimilación de Hierro.

En la prueba de asimilación de hierro, M. fortuitum es positivo y M. chelonae es negativo. Otras más de crecimiento rápido son positivas. Las de crecimiento lento y M. flavescens son negativos.

## Medio

Medio de Löwenstein-Jensen inclinado.

### Reactivos:

Solución acuosa de citrato férrico de amonio al 20%. Vaciar en recipientes pequeños. Esterilizar en autoclave. Si la solución está turbia, descartar y preparar nueva.

### Controles:

Negativo = medio no inoculado

Positivo = medio inoculado con M. fortuitum.

### Procedimiento

- Inocular el medio con una gota de una suspensión de microorganismos.
- Incubar hasta que se presente crecimiento. Incubar el medio control con este cultivo.
- A los medios con crecimiento y al medio control agregar la solución de citrato estéril (una gota por cada ml de medio de Löwenstein).
- Reincubar los cultivos hasta 21 días. Se hacen lecturas semanales.

### Resultados

Una reacción positiva se ve por la aparición de un color café oxidado en las colonias y una decoloración en el medio.



## B I B L I O G R A F I A

1. Armstrong, J.R.: "Eradication of Tuberculosis from an extensively managed beef herd". Aust. Vet. J. 57: 220-223, (1981).
2. Benjamin, R. G. and Daniel, T.M.: "Serodiagnosis of Tuberculosis using the enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) of antibody to Mycobacterium tuberculosis antigen 5". Am. Rev. Respir. Dis., 126: 1013-1016, (1982).
3. BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY.  
8a. edición.  
The Williams & Wilkins Company,  
Baltimore, (1974).
4. Calderón, J.E.: "Respuesta inmune a la tuberculosis". XXX Jornadas Pediátricas. Asociación de médicos del Hospital Infantil de México "Federico Gómez", Memorias, México, D.F., (1984).
5. Chapman, J.S., Bernard, J.S. and Speight, M.: "Isolation of mycobacteria from raw milk. Am. Rev. Respir. Dis., 91: 351-355, (1965).
6. Collins, C.H. and Grange, J.M.: "The bovine tubercle bacillus". J. Appl. Bacteriol. 55: 13-29, (1983).
7. Davis, B.D., Dulbeco, R., Einsen, H.N., Ginsberg, H.S., Wood, W.E.Jr.  
TRATADO DE MICROBIOLOGIA.  
Salvat Editores, S.A.,  
Barcelona, España (1975).

8. Dunn, R.L. and Hodgson, D.J.: "Atypical mycobacteria in milk". J. Appl Bacteriol. 52: 373-376, (1982).
9. Finegold, S.M., Martin, W.J. (Bailey-Scott)  
 DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO.  
 6a. edición,  
 Editorial Médica Panamericana,  
 Buenos Aires, (1983).
10. Gillespie, J.H., Timoney, J.F., Hagan y Bruner:  
 ENFERMEDADES INFECCIOSAS DE LOS ANIMALES DOMESTICOS.  
 4a. edición,  
 La Prensa Médica Mexicana, S. A.
11. González, S.N., Torales, T.A., Gómez, A.D.  
 INFECTOLOGIA CLINICA.  
 2a. edición,  
 Editorial Trillas,  
 México, (1984).
12. Gruff, H., Loder, A., Osterhout, M.: "Postulated sources of Mycobacterium intracellulare and Mycobacterium ~~acrofulaceum~~ infection: isolation of Micobacteria from estuaries and ocean waters". Am. Rev. Respir. Dis. 120: 1385-1388, (1979).
13. Grayboski, S.: "Tuberculosis. A look at the world situation". Chest. 84: 756-761, (1983).
14. Jarnagin, J.L., Himes, E.D., Richards, W.D., Luchsinger, W.D., Harrington, R.Jr.: "Isolation of Mycobacterium Kansasii from lymph nodes of cattle in the United States". Am. J. Vet. 44/10: 1853-1855, (1983).

15. Kazda, J.F.: "The principles of the ecology of Mycobacteria". *Biol. Mycobact.* 2: 323-340, (1983).
16. Lajero, M.: Comunicación personal. (Trabajo en Prensa), 1987.
17. Leslie, Y.W.: *J. Comp. Path.* 69: 1-10, (1959).
18. Lionardo, M.D., Isola, J.H., Ambroggi, M., De Bianchi, A.M., De Kantor, I.N.: "Non tuberculous mycobacterioses in Buenos aires". *Medicina (Buenos Aires)*. 41: 419-422, (1981).
19. Lowrie, D.B.: "The macrophage and mycobacterial infections". *Trans. Roy. Soc. Trop. Med.* 77/5: 646-655, (1983).
20. Mc. Murray, D.N.: "Mechanisms of energy in Tuberculosis". *Chest*. 77/1: 4-5, (1980).
21. Marchant and Packer  
 VETERINARY BACTERIOLOGY AND VIROLOGY.  
 7a. Edition.  
 The Iowa State University Press.  
 Ames, Iowa, USA, (1967).
22. Oatway, W.H. Jr.: "Nontuberculous Mycobacteria and associated diseases". *Am. Rev. Respir. Dis.* 120: 1389-1390, (1979).
23. Olvera, C.R., Pérez, H.C.I.: "Tuberculosis bovina, aislamiento de micobacterias en el ganado bovino". *Salud Pública de México*, XVIII/1: 115-123. enero-febrero, (1976).

24. Orme, I.M. and Collins, F.M.: "Immune response to atypical Mycobacteria: Immunocompetence of heavily infected mice measured In vivo fails to substantiate immunosuppression data obtained In vitro". Infect. Immunity. 43/1: 32-37, (1984).
25. Parker, B.C., Ford, M.A., Gruft, H. and Falkinham, J.D.: "Epidemiology of infection by nontuberculous Mycobacteria. IV. Preferential aerosolization of Mycobacterium intracellulare from natural waters". Am. Rev. Respir. Dis. 128: 652-656, (1983).
26. Pérez, T.R. y Flores, B.F.: "Datos generales de 2 202 autopsias". Prensa Med. Méx. 24: 117, (1959).
27. Proust, A.J. and Wiles, H.: "Pulmonary disease in a child caused by atypical mycobacteria". Med. J. Aust. 141: 242-243, (1984).
28. Ridaura, S.C., y López, C.E.: "Análisis de la mortalidad en el Hospital General de México, S.S.A.: Observaciones de 11 años". Rev. Med. Hosp. Gral. Méx. 31/4:, (1968).
29. Soave, O., Jackson, S. and Ghumman, J.S.: Atypical Mycobacteria as the probable cause of positive tuberculin reaction in Squirrel Monkeys (Saimiri sciureus). Laboratory Animal Science. 31/3: 295-296, (1981).
30. Soto, C.F.: "Aislamiento de Mycobacterias a partir de leche de bovinos con reacción negativa al derivado proteínico purificado de M. avium y M. bovis". Tesis de Licenciatura Fac. Med. Vet. Zoot. UNAM, (1985).
31. Tsukamura, M.: "Mycobacterium parafortuitum: a new species". J. Gen. Microbiol. 42: 7-12, (1966).

32. Tsukamura, M., Shimoide, H., Kita, N., Kawakami, K., Yoshimoto, K., Otsuka, W., Kuze, A., Tamura, M., Kondo, H., Matsuda, N., Mitani, Y.: "Studies on the lung disease due to atypical Mycobacteria in Japan (Report of the year 1980 of the mycobacteriosis research group of the National Chest Hospitals)". Kekkaku. 57/5: 299-310, (1981).
33. Tsukamura, M., Kita, N., Shimoide, H., Nagasawa, S., Kawakami, K., Nakajima, N., Ito, T., Mitani, Y., Yoshimoto, K., Otsuka, W., Yamagata, Y., Tamura, M., Wada, R., Haseda, Y. and Kuze, A.: "Studies on the lung disease due to atypical Mycobacteria in Japan (report of the year 1981 of the mycobacteriosis research group of the National Chest Hospitals)". Kekkaku. 58/6: 339-346, (1982).
34. Tsukamura, M., Kita, N., Shimoide, H., Nagasawa, S., Kawakami, K., Ito, T., Mitani, Y., Otsuka, W., Wada, T., Takazawa, N., Kuze, A. and Haseda, Y.: "Studies on the lung disease due to nontuberculous Mycobacteria in Japan (report of the year 1982 of the mycobacteriosis research group of the Japanese National Chest Hospitals)". Kekkaku. 59/5: 329-336, (1983).
35. Tsukamura, M.

IDENTIFICATION OF MYCOBACTERIA.

The National Sanatorium Chubu Chest Hospital Obu.  
Aichiken Japan, (1957).

36. Vestal, A.R.  
IDENTIFICATION OF MYCOBACTERIA. CDC.  
Atlanta Ga, (1981).
37. Warren, N.G., Body, B.A., Silcox, V.A. and Matthews,  
J.H.: "Pulmonary Disease Due to Mycobacterium mageritense".  
J. Clin. Microbiol. 20/2: 245-247, (1984).
38. Zinsser, H.  
MICROBIOLOGIA.  
17a. Edición.  
Editorial Médica Panamericana,  
Buenos Aires, (1983).