

IDENTIFICACIÓN DE *Mycobacterium sp.*, EN UNA POBLACIÓN DE
TORTUGAS MORROCOY (*Geochelone carbonaria*) EN CAUTIVERIO Y EN SU
ENTORNO, EN UN ZOOLOGICO DE LA SABANA DE BOGOTÁ.

ANGELA NATALIA AGUDELO COD. 14021071

DIRECTOR: Dr. GERMÁN RODRIGUEZ MARTINEZ

SUBDIRECTOR: LEONARDO ARIAS BERNAL

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
BOGOTÁ D.C.
MARZO DEL 2007

IDENTIFICACIÓN DE *Mycobacterium sp.*, EN UNA POBLACIÓN DE
TORTUGAS MORROCOY (*Geochelone carbonaria*) EN CAUTIVERIO Y EN SU
ENTORNO, EN UN ZOOLOGICO DE LA SABANA DE BOGOTÁ.

NATALIA AGUDELO CODIGO: 14021071

Trabajo de Grado como requisito parcial para optar al título de Médico
Veterinario

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
BOGOTÁ D.C.
MARZO DEL 2007

Nota de aceptación

Director

Firma del jurado

Firma del jurado

Bogotá, Marzo del 2007.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo quiero agradecerle a la vida por permitirme estudiar lo que siempre soñé.....

Quiero darle gracias al Médico Veterinario del Zoológico de la Sabana de Bogotá, (Leonardo Arias Bernal), que fue un apoyo en la toma de decisiones y siempre estuvo dispuesto a abrirme las puertas del Zoológico cuando lo necesité, a todos los trabajadores (José Libardo, Jimy, Jacinto, José Murcia, Eufrasio, Edwin y Rosa), que siempre me recibieron con los brazos abiertos y estuvieron dispuestos a ayudarme en el desarrollo del trabajo de campo.

También quiero agradecerle a la directora del Departamento de Microbiología de la Universidad Nacional (Martha Isabel Murcia), que fue un acompañamiento constante e indispensable para el desarrollo de la parte más importante del trabajo de grado; adicionalmente agradecerle especialmente a Johana Hernandez Toloza que con su apoyo y dedicación en el procesamiento de muestras, pude sacar adelante mi trabajo de grado; y en general a todo el personal del laboratorio de micobacterias de la Universidad Nacional (Yaneth, Miriam, y demás personas que no recuerdo el nombre), que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme en lo que necesitara.

Un especial agradecimiento a la Facultad de Medicina Veterinaria y al Departamento de investigaciones de la Universidad de la Salle que apoyaron el

proyecto e hicieron posible el inicio de este trabajo de grado; y a mi director el Dr. Germán Rodríguez Martínez, que siempre estuvo ahí incondicionalmente y siempre me dio ánimo para seguir adelante.

A mis padres les tengo un agradecimiento enorme ya que siempre me apoyaron en todo sentido y me dieron ánimo hasta el último momento.

Por último agradezco a todas las personas que de manera indirecta fueron un apoyo para mi y una motivación para seguir con fuerza y paciencia en el desarrollo de mi trabajo de grado, que en este momento es una satisfacción importante para mi.

DEDICATORIA

Esta trabajo de grado está dedicado principalmente a las Tortugas Morrocoy y todos los reptiles y en general a todos los animales silvestres, ya que les prometo que siempre trabajaré por y para ellos....

También quisiera dedicarle este logro a una persona que ya no está conmigo en el "mundo terrenal" y que sé que hubiera estado orgulloso de mí, a él a mi parcerero le dedico este trabajo que representa la fuerza, la perseverancia y la pujanza que alguna vez me mostró.....

TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
1. OBJETIVOS	8
1.1. OBJETIVO GENERAL	8
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
2. JUSTIFICACIÓN	10
3. MARCO TEÓRICO	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1. MARCO GEOGRÁFICO	19
4.2. MARCO DEMOGRÁFICO	20
4.3. TIPO DE ESTUDIO	20
4.4. POBLACIÓN	20
4.4.1 Criterios de exclusión	21
4.5. TRABAJO EN CAMPO	21

	Página
4.5.1. Prueba de Tuberculina (Tuberculinización)	21
4.5.2. Muestreo	22
4.5.2.1. Toma y conservación de muestras de materia fecal (MAF)	22
4.5.2.2. Toma y conservación de muestras de suelo	23
4.5.2.3. Toma y conservación de muestra de agua	25
4.6. METODOLOGÍA EN LABORATORIO	26
4.6.1. Microscopía directa (Baciloscopia)	26
4.6.2. Procesamiento de las muestras	28
4.7. CASO CLINICO EN TORTUGA ICOTEA (<i>Trachemys scripta spp.</i>)	33
4.8. IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS	36
4.9. PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y ENZIMÁTICAS ADICIONALES	40
4.10. MANEJO DE LA INFORMACIÓN	41
4.11. CONFIABILIDAD	41
5. RESULTADOS	42
5.1. TUBERCULINIZACIÓN	42
5.2. MICROSCOPIA DIRECTA (BACILOSCOPIA) Y CRECIMIENTO DE MUESTRAS DE MAF	44
5.2.1. Baciloscopia	44
5.2.2. Crecimiento	45
5.3. BACILOSCOPIA Y CRECIMIENTO DE MUESTRAS AMBIENTALES	47

	Página
5.3.1. Suelo (tierra)	47
5.3.2. Agua/sedimento	47
5.4. CASO DE TORTUGA ICOTEA (<i>Trachemys scripta spp.</i>)	54
5.5. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>Mycobacterium sp.</i> , POR PCR-PARA	58
5.6. PRUEBAS BIOQUIMICAS-ENZIMÁTICAS	64
6. DISCUSIÓN	66
6.1. LIMITANTES DEL ESTUDIO	76
7. CONCLUSIONES	78
8. RECOMENDACIONES	80
BIBLIOGRAFÍA	82
BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA	85
ANEXOS	86

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Inventario de Tortugas Morrocoy (<i>Geochelone carbonaria</i>) en un Zoológico de la Sabana de Bogotá.	20
Tabla 2. Tuberculinización en Tortugas Morrocoy (<i>Geochelone carbonaria</i>) en un Zoológico de la Sabana de Bogotá.	42
Tabla 3. Baciloscopia de muestras de MAF de tortugas Morrocoy (<i>Geochelone carbonaria</i>).	44
Tabla 4. Crecimiento de <i>Mycobacterium sp.</i> en cultivos a partir de MAF de Tortugas Morrocoy (<i>Geochelone carbonaria</i>).	46
Tabla 5. Baciloscopia (ZN) y crecimiento de muestras ambientales de un Zoológico de la Sabana de Bogotá.	48
Tabla 6. Caso de Tortuga Icotea (<i>Trachemys scripta spp.</i>) en un Zoológico de la Sabana de Bogotá.	54
Tabla 7. Identificación y tiempo de crecimiento de <i>Mycobacterium sp.</i> , por PCR-PRA.	63
Tabla 8. Prueba Bioquímica – enzimática para confirmar o descartar la presencia de <i>M. tuberculosis</i> en cultivos de agua.	64

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Tuberculinización en Tortugas Morrocoy	21
Figura 2. Obtención de muestras de materia fecal.	23
Figura 3. Obtención de muestras de suelo.	24
Figura 4. Obtención de muestras de Agua y sedimento de la poseta del encierro de las Tortugas Morrocoy (<i>Geochelone carbonaria</i>).	26
Figura 5. Coloración de Ziehl – Neelsen y microscopía directa (Baciloscopía).	27
Figura 6. Procesamiento de muestras de materia fecal.	28
Figura 7. Procesamiento de muestra de Agua.	31
Figura 8. Procesamiento de muestras de suelo.	32
Figura 9. Procesamiento de muestras de Tortuga Icotea (<i>Trachemys scripta spp.</i>)	35

	Página
Figura 10. Extracción y amplificación de ADN por PCR.	36
Figura 11. Identificación por PRA.	38
Figura 12. Marcadores de peso molecular utilizados en la identificación molecular.	40
Figura 13. Dermorreacción negativa a la tuberculinización en Tortugas Morrocoy (<i>Geochelone carbonaria</i>).	43
Figura 14. Baciloscopia de muestras de MAF de Morrocoy (n=19).	45
Figura 15. Cultivos de MAF de Tortugas Morrocoy sin crecimiento al terminar el periodo de cultivo.	46
Figura 16. Baciloscopia y crecimiento de muestras ambientales.	49
Figura 17. Siembra de tejido y orina en Agar Sangre y Mc Conkey.	55
Figura 18. Baciloscopia de las muestras de la Tortuga Icotea (<i>Trachemys scripta spp.</i>)	56
Figura 19. Crecimiento de muestras sembradas en cultivos para micobacterias de la Tortuga Icotea (<i>Trachemys scripta spp.</i>)	57
Figura 20. PCR de las muestras con crecimiento positivo.	59

	Página
Figura 21. PRA de las muestras con amplificación de ADN por PCR.	59
Figura 22. Prueba Bioquímica – enzimática en cepa control positivo (<i>M. tuberculosis</i>)	64
Figura 23. Prueba Bioquímica – enzimática en cepa de (<i>M. fortuitum</i>), proviniente de la muestras de agua.	65
Figura 24. Contacto de Tortugas Morrocoy (<i>Geochelone carbonaria</i>) con micobacterias ambientales.	73
Figura 25. Comparación del crecimiento con lo reportado.	73
Figura 26. Comparación de la identificación por PRA con lo reportado.	74
Figura 27. Alta presencia de microorganismos diferentes a micobacterias en medios de cultivo con muestras de MAF.	77

LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Microscopía directa	86
Anexo 2. Procesamiento y cultivo de las muestras	87
Anexo 3. Identificación Molecular	94
Anexo 4. Prueba de Tuberculina	97
Anexo 5. Identificación de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	98
Anexo 6. Procedimiento de recontaminación	103

IDENTIFICACIÓN DE *Mycobacterium sp.*, EN UNA POBLACIÓN DE TORTUGAS MORROCOY (*Geochelone carbonaria*) EN CAUTIVERIO Y EN SU ENTORNO, EN UN ZOOLOGICO DE LA SABANA DE BOGOTÁ.

RESUMEN

En un Zoológico de la Sabana de Bogotá, se presentó alta mortalidad de aves por Tuberculosis Aviar, en un encierro en el cual habitaban 2 clases diferentes: reptiles (Tortugas Morrocoy) y aves. Por esto el objetivo del estudio fue establecer la presencia del *Mycobacterium sp.*, por medio de la identificación molecular (PCR-PRA), en una población de 19 tortugas Morrocoy en cautiverio en el zoológico mencionado anteriormente. Para esto, se tuberculinizaron todas las tortugas, las cuales resultaron negativas y se recolectaron muestras de materia fecal y muestras ambientales (agua y suelo) y se cultivaron en medios OK/MSTA, LJ y OK respectivamente, realizando baciloscopia para cada una de las muestras. De la muestras de materia fecal sólo 4 fueron positivas a baciloscopia y de 9 muestras ambientales (suelo (n=7), agua (n=2)), 5 fueron positivas (suelo (n=4), agua (n=1)); en cuanto al crecimiento fueron negativas todas las de materia fecal de las Tortugas Morrocoy. De las muestras ambientales (suelo, agua) crecieron 5 y 1 muestras respectivamente. Adicionalmente se obtuvo muestras de la necropsia de una Tortuga Icotea, (tejido, orina y absceso) y sólo hubo crecimiento de la muestra de absceso.

En el cultivo de la muestra de absceso se identificó *Mycobacterium gordonae* tipo 3, en los de suelo se obtuvo *Mycobacterium avium* tipo 3 y en el de Agua se obtuvo *Mycobacterium fortuitum* tipo 1. Lo que indica que las Tortugas Morrocoy están en contacto con las micobacterias.

Los hallazgos sugieren la necesidad de una vigilancia continua, que permita la identificación de la presencia de micobacterias; por medio de pruebas de laboratorio apropiadas (baciloscopia, cultivo, pruebas bioquímicas y moleculares); ya que se debe evitar que las Tortugas sigan siendo parte de un ciclo epidemiológico de transmisión como portadores sanos y el contacto con los humanos debe darse sólo cuando sea estrictamente necesario, aplicando normas de bioseguridad.

Palabras clave: Identificación molecular, micobacterias, medios de cultivo, tuberculinización, baciloscopia.

IDENTIFYING *Mycobacterium sp.* IN A MORROCOY TURTLES (*Geochelone carbonaria*) POPULATION KEPT IN CAPTIVITY AND IN THEIR SETTING IN A ZOO ON THE PLAIN NEAR BOGOTÁ

Abstract

High bird mortality, due to avian tuberculosis, was presented in a zoo on the plain near Bogotá, in a cage inhabited by 2 different species: reptiles (Morrocoy tortoise) and birds. The study was thus aimed at establishing the presence of *Mycobacterium sp* by means of molecular identification (PCR-PRA) in a population of 19 Morrocoy tortoises kept in captivity in the aforementioned zoo. All the turtles were therefore tuberculinised, proving negative; faecal material and environmental samples (water and soil) were collected and cultivated in OK/MSTA, LJ and OK medium respectively. Bacilloscopy was carried out on each sample. Only 4 of the faecal material samples were positive by bacilloscope; 5 environmental samples were positive by bacilloscope, (4 soil samples and 1 water sample). Regarding growth, faecal material, soil surface and Blue Macaws samples were negative. Samples from the necropsy of a Slider turtle (*Trachemys scripta spp.*) (tissue, urine and abscess) were also obtained and only the abscess sample grew.

Mycobacterium gordonae type 3 was identified in the abscess sample culture, *Mycobacterium avium* type 3 in soil and *Mycobacterium fortuitum* type 1 in water, indicating that Morrocoy turtles had been in contact with the mycobacteria.

The findings suggested ongoing surveillance, since it must be avoided that the turtles continue being part of an epidemiological cycle of transmission as healthy carriers and contact with humans must only happen when strictly necessary, by applying biosafety regulations.

Key words: molecular identification, mycobacteria, culture medium, tuberculinisation, bacilloscope.

INTRODUCCIÓN

En un zoológico de la Sabana de Bogotá, se ha presentado en los últimos años una enfermedad con mortalidad en un encierro en el cual habitaban 2 clases diferentes: reptiles (actualmente 19 tortugas Morrocoy (*Geochelone carbonaria*) y aves Alcaraván (*Burhinus distriatus*), Pava común (*Ortalis mot mot*) y Tinguas (*Porphyryla martinica*). Entre mayo del 2002 y septiembre del 2003, se presentó en estas aves una sintomatología similar, caracterizada por secreciones nasales, bilaterales y unilaterales, pérdida progresiva de peso, mal estado de plumaje, diarrea, depresión y, en algunos casos, muerte súbita. En la necropsia se encontró inflamación granulomatosa, zonas de caseificación y apariencia hemorrágica en diferentes órganos como pulmón, hígado, riñón, tráquea, sacos aéreos e intestino. En la mayoría de muestras de las diferentes especies de aves, la histopatología identificó bacilos ácido alcohol resistentes, y se confirmó la presencia de *Mycobacterium avium*, lo cual indicaba la posible presencia de tuberculosis aviar en el encierro del Zoológico¹.

Posteriormente se realizó un proyecto de grado en la Universidad de la Salle titulado “Comportamiento epidemiológico de tuberculosis aviar en un encierro de un Zoológico de la Sabana de Bogotá”, el cual identificó la *Mycobacterium avium*.

¹ ZOOLÓGICO JAIME DUQUE, Tocancipá Cundinamarca, Necropsias 2002-2003; laboratorio histopatología Universidad de la salle.

Aunque los hechos anteriores sugieren la presencia de Tuberculosis Aviar en el encierro mencionado, no se ha adelantado a la fecha en el zoológico, un estudio que permita establecer si la infección afecta a los reptiles del encierro, en este caso las tortugas del género *Geochelone*, como portadores sanos. Así mismo, en el ámbito nacional no se han realizado estudios científicos para identificar la presencia de micobacterias en los reptiles de otros zoológicos. En otros países se han realizado algunos estudios en reptiles y tortugas en cautiverio y en vida silvestre, en los cuales se ha logrado identificar micobacterias y Clamidias^{2,3}.

La Tuberculosis Aviar, no solo afecta a las aves, sino que puede producir infección y enfermedad en otras especies animales, domésticas y silvestres. En animales domésticos puede afectar a especies que hacen parte de sistemas de explotación productiva (ganadería, porcicultura, caprinos y ovinos, entre otros) y a mascotas. Los animales infectados pueden transmitir esta micobacteria a personas, dando lugar a cuadros atípicos, especialmente en humanos inmunodeficientes⁴ y generando riesgos potenciales para la población sana.

² LEAH L. CREER. Osteoartritis por *Mycobacterium chelonae* en tortugas marinas (*Lepidochelys kempii*). Journal of Wildlife Diseases. 2003; 39(3): 736-741 pp.

³ G. SOLDATI, Z. H. Detección de *Mycobacteria* y *Chlamydia* en inflamaciones granulomatosas de reptiles(estudio retrospectivo). Veterinary Pathology. 2004; 41 :388-397 pp.

⁴ BOTERO David; Enfermedades Infecciosas, corporación para investigaciones Biológicas , 3ra edición, Medellín Colombia, 1985., 578-587 pp.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, el problema específico de esta investigación, consistió en establecer si en el encierro del zoológico las Tortugas portan el microorganismo del género *Mycobacterium sp.*, a partir de muestras de materia fecal, por medio del aislamiento e identificación microbiológicas. Esto permitió examinar el papel que juegan dentro de la patogenia de Tuberculosis Aviar en el encierro.

1. OBJETIVOS

1.1. GENERAL

Establecer la presencia del *Mycobacterium sp.* en una población de 19 Tortugas Morrocoy (*Geochelone carbonaria*) en cautiverio y en su ambiente (agua y suelo), en un zoológico de la Sabana de Bogotá.

1.2. ESPECÍFICOS

- Aplicar la prueba de tuberculina (PPD *Mycobacterium avium*) a las Tortugas Morrocoy del encierro y evaluar el resultado.
- Tomar muestras de Materia Fecal (MAF), Agua, suelo y otras que surjan indirectamente del proceso como orina, tejidos de necropsias etc.
- Con las muestras anteriores realizar:
 - Coloraciones con Ziehl-Neelsen (ZN) y observar por microscopía directa si hay presencia de bacterias ácido alcohol resistentes (BAAR).
 - Cultivos en medios específicos utilizados para identificar y diferenciar las especies de micobacterias.

- Para aquellas muestras que resultaron positivas a crecimiento, Identificar la o las especies de micobacterias obtenidas por medio de pruebas moleculares, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Análisis de Fragmentos de DNA obtenidos por digestión con enzimas de Restricción (PRA).
- Realizar pruebas bioquímicas para identificación cuando sea necesario.
- Identificar riesgos para la población humana.

2. JUSTIFICACIÓN

La información sobre la identificación de *Mycobacterium* en tortugas del género *Geochelone*, especie *carbonaria* a partir de materia fecal, es escasa en los ámbitos nacional e internacional; así mismo, no se conoce la respuesta de esta especie de tortugas a la prueba de tuberculina. Por lo tanto, los resultados de este estudio permitirán llenar un vacío de conocimiento sobre el tipo de diagnóstico del microorganismo en estas especies, diseñar programas de control para los animales que están involucrados directamente e indirectamente, como aves, mamíferos y reptiles, que tienen o han tenido contacto con el encierro e, implantar programas de protección para las personas que tengan contacto con ellos.

Adicionalmente, el estudio permitirá verificar en nuestro medio si las metodologías de aislamiento e identificación recomendadas (Procesamiento, baciloscopia, cultivo e identificación molecular), son eficaces en micobacterias que infectan tortugas morrocoy y, por tanto, pueden ser utilizadas en programas de control y seguimiento rutinario.

3. MARCO TEÓRICO

Algunas especies del género *Mycobacterium* tienen gran importancia porque producen enfermedades como la Tuberculosis y la Paratuberculosis, con implicaciones zoonóticas. Estas enfermedades se conocen hace miles de años y en el momento actual aún se está lejos de controlarlas.

El género *Mycobacterium* pertenece a la clase *Actinobacteria*, orden Mycobacteriales, familia *Mycobacteriaceae*, e incluye más de 100 especies, de las que no menos de 20 tienen capacidad patógena⁵.

Las micobacterias son bacilos Gram positivos delgados y su longitud varía mucho entre las especies. El poder patógeno de este tipo de bacterias se debe en gran parte a la densa pared celular que es rica en lípidos, lo que le permite sobrevivir en ambientes hostiles (como la célula hospedadora y el medio ambiente). El tipo de lesiones y el patrón de difusión varían según la especie de micobacteria y el estado de defensas del hospedero, pero, en general los mecanismos básicos son similares⁶. En la patogénesis intervienen dos componentes, uno invasivo (condicionado por los factores de virulencia asociados a la pared y a su capacidad de multiplicación intracelular), y otro inmunopatológico (derivado de la

⁵ MURRAY Patrick, Microbiología Médica, 5 ed. Madrid:Elsevier Mosby, 2006.

⁶ BROOKS, Geo F., Microbiología Médica, 18 ed. Méjico: Manual Moderno, 2004.

imposibilidad de eliminar los bacilos del interior de los macrófagos), que determina la aparición de hipersensibilidad retardada. A consecuencia de todo ello se produce una inflamación granulomatosa, que puede quedar localizada o difundirse a otros órganos.

Las fuentes habituales de las micobacterias patógenas suelen ser los seres vivos infectados. Las vías de eliminación de las distintas especies de micobacterias varían; por ejemplo, *M. bovis* se elimina por vía respiratoria, heces, leche, orina y semen; *M. avium* y *M. paratuberculosis* se eliminan por heces y la *M. tuberculosis* principalmente por vía respiratoria.

Todos los mamíferos, las aves y algunos reptiles son sensibles a todas las especies de forma variable.⁷

Las enfermedades micobacteriales producidas por “*Mycobacterium* no tuberculosos”, han sido reportadas en mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces, y muchas de estas infecciones han sido reportadas tanto en animales en cautiverio como de vida silvestre. Adicionalmente se han aislado micobacterias de animales sin evidencia de enfermedad, encontrando colonización a nivel del tracto respiratorio y digestivo. Aunque muchas especies se consideran patógenas el hecho de encontrar la *Mycobacteria* no implica enfermedad.

⁷ VADILLO S. Manual de microbiología, Madrid:Mc Graw Hill interamericana, 2002. capítulo 37.

Mycobacterium avium (Complejo)/(Complex)

Este complejo es de lento crecimiento y está compuesto por dos especies, claramente aceptadas *M. avium* y *M. intracellulare* así como otras micobacterias de difícil asignación⁸, este complejo pertenece al grupo de las Mycobacterias no tuberculosas. Las tuberculosis aviares son muy contagiosas y crónicas, en general de clínica variable y provocan lesiones granulomatosas.

Mycobacterium avium paratuberculosis

Causa la paratuberculosis, una enfermedad intestinal de rumiantes y otros herbívoros, muy contagiosa, de curso crónico y caquetizante, con enteritis proliferativa y diarreas incoercibles⁹.

MYCOBACTERIAS DE RÁPIDO CRECIMIENTO

Son consideradas como no patógenas, pero se han reportado casos de enfermedad pulmonar asociada a estas micobacterias¹⁰. Dentro de este grupo están principalmente, la *M. chelonae* que tiene como hospederos las tortugas, peces, bovinos, gatos, suidos, manatíes, monos, produciendo lesiones granulomatosas diseminadas o localizadas (abscesos), y dermatitis¹¹; el

⁸ MURCIA Martha I, Distribución de patrones PRA en aislamientos clínicos del complejo *Mycobacterium avium* procedentes de España y Suramérica; Biomédica 2004;24(supl):60-4 pp.

⁹ VADILLO, Op. Cit., Capítulo 37.

¹⁰ GRIFFITH D.E, Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. American Review of Respiratory Disease. May; 147(5):1271-8; 1993.

¹¹ WALLACH Joel. Diseases of exotic animals, medical and surgical management, WB saunders company Philadelphia, 1983, 1011p.

Mycobacterium chelonae crece en ambientes acuáticos entre 22 y 44° C, que es equivalente a la temperatura corporal de los poiquilotermos. De todas formas la tuberculosis en reptiles es considerada una enfermedad esporádica.¹²

El *M. fortuitum* afecta a bovinos, gatos, perros y cerdos, produciendo lesiones granulomatosas en diversas localizaciones.¹³

Mycobacterium tuberculosis complex

A este complejo hace parte; *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. canetti*. *Mycobacterium africanum* produce la tuberculosis humana en África, *M. microti* la tuberculosis en ratas silvestres y *M. canetti* también es capaz de producir la tuberculosis en humanos¹⁴. La especie *M. bovis* ha sido subdividida recientemente en *M. bovis* subsp. *bovis*, y *M. bovis* subsp. *caprae*, *Mycobacterium bovis* infecta al bovino y a una variedad de animales domésticos y silvestres. En el hombre, la infección por *M. bovis* se produce vía ingestión de productos crudos contaminados como la leche, o por inhalación de gotas en suspensión. En consecuencia, la población más expuesta es la de los agricultores y personal de mataderos y frigoríficos. La única forma de distinguir la tuberculosis bovina de la humana causada por *M. tuberculosis*, es mediante el cultivo y tipificación bacteriana, ya que ambas patologías no se pueden diferenciar clínica ni radiológicamente. A estas especies se suman al menos otras sesenta

¹² LEAH L. CREER, Op. cit., 736–741 pp.

¹³ FOWLER MILLAR, Zoo and Wild animal medicine 1999.

¹⁴ COLE S T. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiology 2002; 148: 2919-28 pp.

micobacterias oportunistas, no tuberculosas, capaces de causar enfermedades en humanos¹⁵.

Mycobacterium lepraemurinum

Es el agente de la lepra murina y felina, un proceso granulomatoso de la piel y del tejido subcutáneo caracterizado por la formación rápida de nódulos suaves y carnosos.

Con respecto al problema de zoonosis, en este caso de animales en cautiverio en Zoológicos, parques, etc, es de gran importancia ya que hay un cercano contacto de los animales con los cuidadores, trabajadores, profesionales etc. y además se facilita la transmisión por vía aerosol, fómites, agua y comida contaminada.¹⁶

Mientras que las micobacterias tuberculosas se transmiten de hospedero a hospedero, las Mycobacterias no tuberculosas son adquiridas del medio ambiente por un mecanismo poco conocido, en el cual influye la susceptibilidad y la virulencia. Adicionalmente las micobacterias son difíciles de eliminar porque tienen la habilidad de sobrevivir en el suelo¹⁷ preferiblemente cuando este tiene un pH entre 5 y 5.5 y temperaturas de 43°C.

¹⁵ HEIFETS L. Mycobacterial infections other than tuberculosis and leprosy (Infections caused by nontuberculous Mycobacteria-NTM). Sem Resp Crit Care Med 2004; 25 283-96 pp.

¹⁶ THOMPSON PJ, SEALS, seal trainers and mycobacterial infection 1993.

¹⁷ THOEN CO, Tuberculosis, tuberculoidoses, and other mycobacterial infeccions 1994.

Por estas razones es necesario prevenir la exposición de animales susceptibles a estos patógenos y, adicionalmente, promover la educación en cuanto al manejo animal dentro de los Zoológicos, para evitar el desarrollo de este tipo de enfermedades. Así mismo, es necesario controlar el manejo de encierros en los que se sospecha el problema con todas las medidas de bioseguridad, ya que el principal diseminador es el hombre.¹⁸

Según algunos estudios, en un grupo de 120 tortugas marinas verdes (*Chelonia mydas*), del Pacífico, se encontraron lesiones tuberculosas en pulmón, que fueron positivas por coloración de ZN y en cultivos se identificó *M. avium*¹⁹. En una Tortuga marina (*Lepidochelys kempii*), se identificó el *M. chelonae* como causante de osteoartritis, el aislamiento se realizó a partir de muestras de líquido sinovial.²⁰ Y en un estudio retrospectivo de serpientes, tortugas y lagartos se observó que de lesiones granulomatosas en piel, se detectaron micobacterias pertenecientes al complejo tuberculosis por medio de coloración de ZN y PCR.²¹

En cuanto al aislamiento y la identificación, la sola sospecha de la presencia de *Mycobacterium sp.*, en un individuo o población, exige medidas de seguridad biológica estrictas.

¹⁸ FOWLER MILLAR, Op. cit.

¹⁹ BROCK, J. A., R. M. NAKAMURA, A. Y. MIYAHARA, AND E. M. L. CHANG. 1976. Tuberculosis in Pacific green sea turtles, *Chelonia mydas*. Transactions of the American Fisheries Society 105: 564-566 pp.

²⁰ LEAH L. GREER, Op. cit., pp. 736-741.

²¹ SOLDATI G, Z. H, Op. Cit.

Para el diagnóstico de enfermedades causadas por micobacterias, se requiere un análisis de campo y otro de laboratorio. En el análisis de campo se utilizan técnicas que tratan de medir la respuesta inmunitaria celular, directa o indirectamente, el método más aceptado es la intradermorreacción con tuberculina PPD (derivado proteico purificado), que provoca una intensa reacción de hipersensibilidad retardada en animales que hayan tenido anteriormente contacto previo con el bacilo.

El análisis de laboratorio se realiza con muestras procedentes de animales vivos (leche, biopsias, líquidos aspirados, lavados bronquiales o heces y orina), de animales muertos (necropsia, tomando tejido de lesiones compatibles, nódulos linfáticos retrofaríngeos) o de otros animales sin lesiones aparentes. Las muestras pueden conservarse frescas o congeladas para análisis microbiológicos y en formol al 10% para estudios histopatológicos. Se realiza también microscopía directa en la que se emplea la tinción de Ziehl-Neelsen o la fluorescente de Truant para frotis o extensiones de exudados o excreciones de animales vivos o material de necropsia. Para el aislamiento, sobretodo para las de crecimiento lento, se requiere emplear sistemas de descontaminación y de concentración de las micobacterias, especialmente cuando están en pequeña cantidad. Los medios de cultivo se utilizan una vez descontaminada y concentrada la muestra: los inóculos se siembran de acuerdo a sus necesidades. Existen medios líquidos y sólidos, pero los más habituales son los sólidos. En cuanto a la morfología de las colonias, existen diferencias apreciables en cuanto a la forma y las características de las colonias (tipo y tiempo de crecimiento, tipo de colonias, etc.).

Las pruebas bioquímicas se utilizan para diferenciar las principales especies de micobacterias tuberculosas. La inoculación experimental es un método clásico útil para la recuperación de micobacterias a partir de material patológico, pero actualmente está en desuso. Los métodos moleculares se están imponiendo en la identificación, por su sensibilidad, especificidad y rapidez. Los que más resaltan son: Sondas para la confirmación de cultivos, secuenciación de ADN, PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), RFLP (Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción), detección directa e identificación por amplificación de ácidos nucleicos e hibridación y, sistemas de tipificación molecular de las cepas.²² Estas técnicas moleculares permiten identificar y establecer la huella particular de cada especie y sus cepas, por lo cual destaca la importancia de su uso para establecer la epidemiología molecular de las micobacterias.²³

²² VADILLO S., Op. Cit.

²³ BIOMÉDICA, Revista del instituto nacional de salud volumen 24, suplemento No 1, tuberculosis- junio 2004 Bogotá DC. 188- 199 pp.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MARCO GEOGRÁFICO

Las muestras de materia fecal se obtuvieron de las Tortugas Morrocoy (*Geochelone carbonaria*) que se encuentran en un Zoológico de la Sabana de Bogotá, ubicado en el Departamento de Cundinamarca, en el municipio de Tocancipá.²⁴

- Latitud: 0452 N
- Longitud: 7358 W
- Elevación: 2600 m.s.n.m
- Tipo de estación: variable
- Promedio de precipitación anual (mm): 705,8.

²⁴ IDEAM, Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales.

4.2. MARCO DEMOGRAFICO

Se trabajó con un total de 19 tortugas de sexo y edad diferente (tabla 1).

Tabla 1. Inventario de tortugas Morrocoy (*Geochelone carbonaria*) en un Zoológico de la sabana de Bogotá (ZSB)

ZOOLOGICO DE LA SABANA DE BOGOTÁ (ZSB)			
Genero / especie	No de animales	Sexo	Edad
<i>Geochelone carbonaria</i>	16	7 machos 9 hembras	Adultos
<i>Geochelone carbonaria</i>	3	Indeterminado	Juveniles
TOTAL	19		

Fuente: Autora; ZSB: 2006.

4.3. TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio descriptivo, centrado en métodos de laboratorio.

4.4. POBLACIÓN

19 tortugas morrocoy (*Geochelone* sp) del Zoológico de la Sabana de Bogotá.

Se incluyó una Tortuga Icoatea (*Trachemys scripta spp.*), ya que se sacrificó debido a una alta mortalidad y prevalencia de lesiones ulcerantes y abscedativas en caparazón y plastrón, y por lo tanto, se aprovechó para obtener muestras de tejido (Pulmón, Hígado y Riñón), Orina y Absceso.

4.4.1. Criterios de exclusión

Se planteó excluir aquellas tortugas de las cuales no se pudiera obtener la muestra, lo que no ocurrió en ningún caso.

4.5. TRABAJO DE CAMPO

4.5.1. Prueba de Tuberculina (Tuberculinización)

Se aplicó la tuberculina PPD de *Mycobacterium avium* (CSL® ARB No. 6627, NRA 36611/0600), (0,1 ml) a cada una de las tortugas en el miembro anterior izquierdo (MAI) (Figura 1), o en el miembro anterior derecho (MAD), a nivel intradérmico (anexo 4). Se aplicó inicialmente a 3 tortugas para observar el comportamiento y la reacción local post aplicación, con el fin de realizar un procedimiento seguro en el resto de animales.

Figura 1. Tuberculinización en Tortugas Morrocoy.



A: 0,1 ml de PPD de *Mycobacterium avium*, B: Aplicación de PPD por vía intradérmica a nivel del pliegue del MAI.

Fuente: Autora, ZSB: 2005.

4.5.2. Muestreo

4.5.2.1. Toma y conservación de muestras de Materia Fecal (MAF)

Dentro del encierro de exhibición se manipuló a todas las tortugas (n=19) y las muestras de materia fecal se obtuvieron de manera individual a través del recto. Antes de obtener la muestra se sometió a cada tortuga a un baño en agua tibia (21-23°C) con el fin de relajar los músculos de la cola y el esfínter cloacal para facilitar la obtención de la muestra y disminuir el estrés en el animal. La muestra se tomó con hisopos estériles en el caso de tortugas pequeñas y utilizando el dedo meñique con guantes estériles individuales para cada toma en el caso de tortugas grandes. La muestra recolectada (aproximadamente 1 gr MAF) se envasó en un recipiente plástico con taparrosca estéril; la muestra fue llevada al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional inmediatamente, protegida de la luz directa en una caja y aseguradas, evitando que se derramaran. Una vez llegaron las muestras al laboratorio de sometieron a refrigeración (4° C) hasta el momento del procesamiento (Figura 2).

NOTA: Se recolectó una muestra por animal, pero se obtuvo una segunda y hasta tercera muestra tiempo después para suplir las muestras previas que resultasen no apropiadas por presentar un alto grado de microorganismos diferentes a las micobacterias.

Figura 2. Obtención de muestra de materia fecal



A: Baño con agua tibia (21-23°C) de una tortuga Morrocoy (*Geochelone carbonaria*), antes de la toma de la muestra; B y C: Estimulación con hisopo estéril y dedo meñique cubierto con guante estéril respectivamente; D: Transporte de materia fecal en tubos estériles con taparrosca.

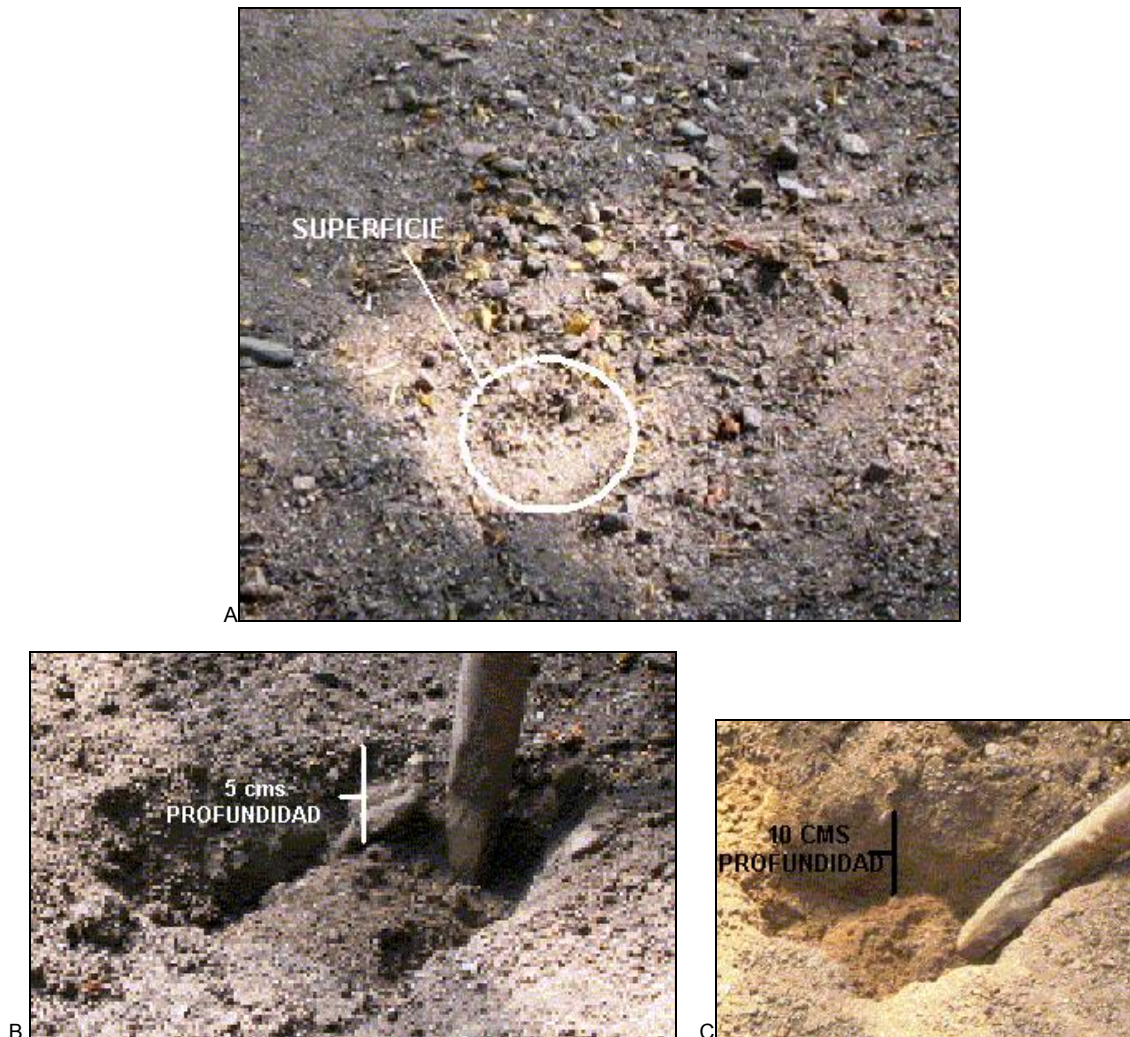
Fuente: Autora, ZSB y Laboratorio Microbiología Universidad Nacional: 2005.

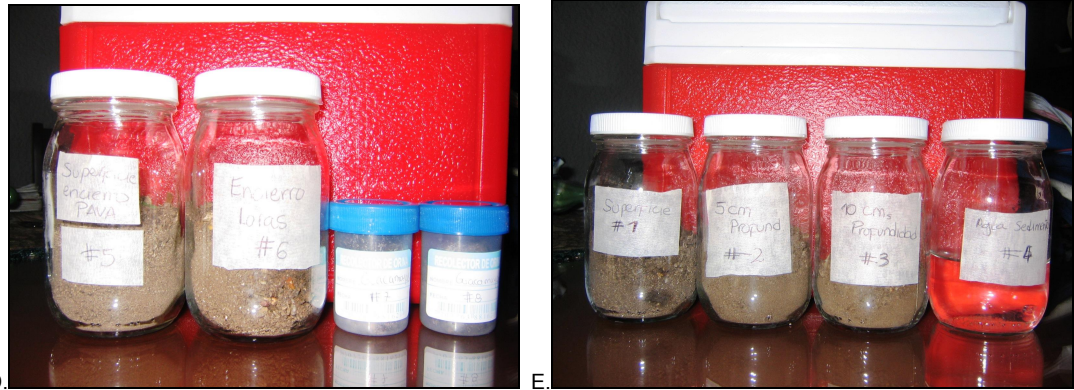
4.5.2.2. Toma y conservación de muestras de Suelo

Se recolectaron 7 frascos con taparrosca estériles, en diferentes sitios a distintas profundidades (superficie, a 5cms de profundidad y a 10cms de profundidad) (Figura 3), de los cuales 3 muestras fueron tomadas del suelo en el encierro de las Tortugas Morrocoy, Otra muestra fue tomada dentro en el mismo complejo, pero en un encierro vecino al de las tortugas en donde habitaba un ave, una Pava; y las 3 muestras restantes se obtuvieron del encierro de las Loras y las Guacamayas

para obtener muestras control. Las muestras se llevaron inmediatamente al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional en donde se sometieron a refrigeración (4°C) hasta el momento del procesamiento. Se realizó igualmente el coprocultivo e identificación en los casos de crecimiento positivo, como se indica adelante (Anexo 2).

Figura 3. Obtención de muestras de suelo.





D: De izquierda a derecha muestra de suelo de encierro de Pava (n=1), Loras (n=1), Guacamayas (n=2) respectivamente; E: De izquierda a derecha muestras de suelo de encierro de Tortugas Morrocoy de superficie, a 5cm de profundidad y a 10cm de profundidad, respectivamente.
Fuente: Autora, ZSB: 2005.

4.5.2.3. Obtención y conservación de muestra de agua

Se recolectó con un succionador de plástico limpio para poder obtener muestra del sedimento y del agua simultáneamente (Figura 4); Se depositó en un frasco con taparrosca estéril (como se observa en la foto E en la Figura 3), agua y sedimento de la poseta ubicada en el encierro de las tortugas Morrocoy y se hizo lo mismo que con las muestras de suelo; durante el periodo de cultivo de las muestras se observó una gran cantidad de contaminación, aunque se logró decontaminar se decidió volver a tomar muestras de agua de la poseta con el fin de realizar nuevamente el proceso con mayor confiabilidad. Aunque el proceso general es muy similar, el tipo de cultivo y los reactivos utilizados fueron diferentes a los de las muestras de suelo (anexo 2).

Figura 4. Obtención de muestra de Agua y sedimento de la poseta del encierro de las Tortugas Morrocoy.



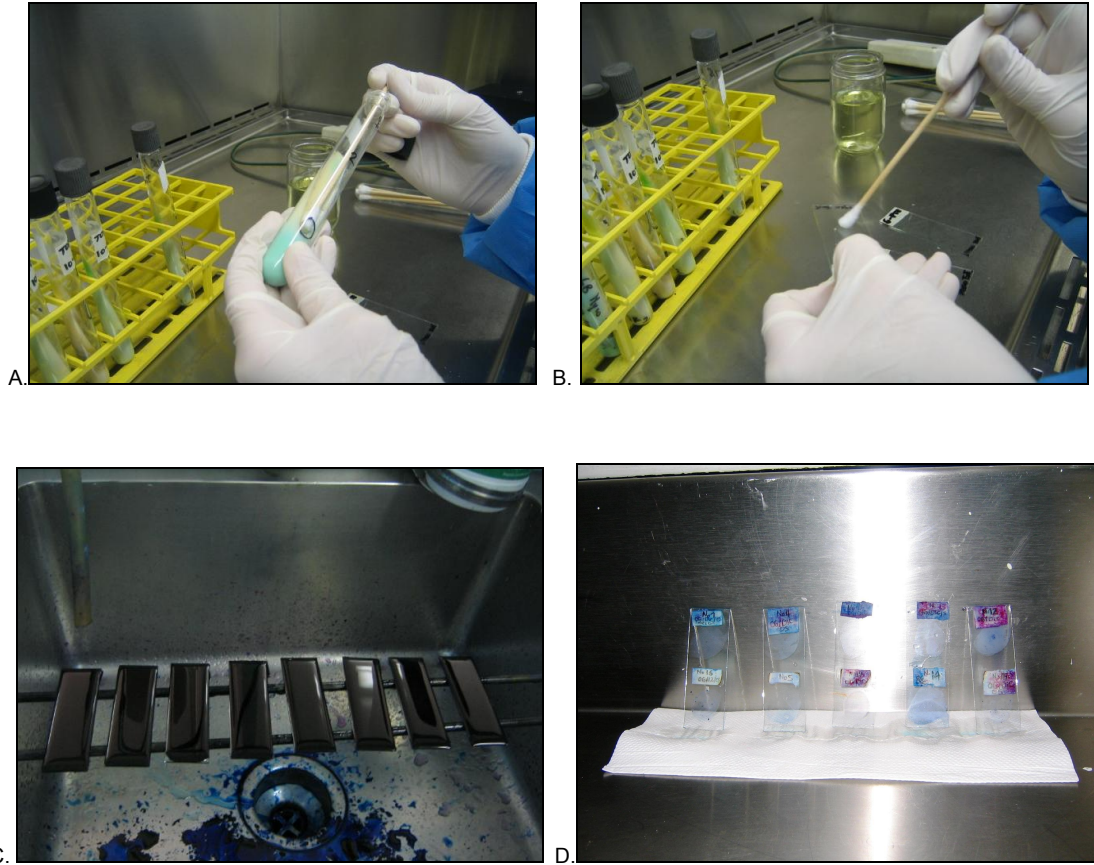
Fuente: Autora, ZSB: 2005.

4.6. METODOLOGÍA EN LABORATORIO

4.6.1. Microscopía directa (Baciloscopia)

Se empleó la tinción de Ziehl-Neelsen con el frotis de materia fecal, y con otras muestras como las de orina, tejido, suelo y agua (Figura 5). También fue utilizada la coloración en caso de cultivos contaminados que iban a ser descartados o para aquellos que ya habían cumplido el periodo de cultivo y no había ningún crecimiento, para confirmar que no había presencia de micobacterias (anexo 1).

Figura 5. Coloración de Ziehl-Neelsen y Microscopía directa (Baciloscopia)



A: Extracción de colonia con hisopo estéril; B. frotis en lámina portaobjetos;
C: coloración con azul de Metileno, D: Láminas después de la tinción.

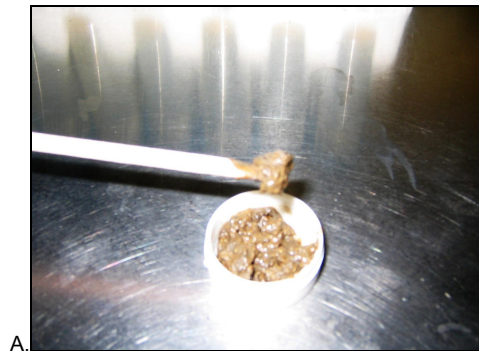
Fuente: Autora, Laboratorio de Microbiología Universidad Nacional de Colombia: 2006.

4.6.2. Procesamiento de las muestras

El procesamiento se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología en la sección de micobacterias de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, cumpliendo todas las normas de Bioseguridad (Figuras 6,7 y 8).

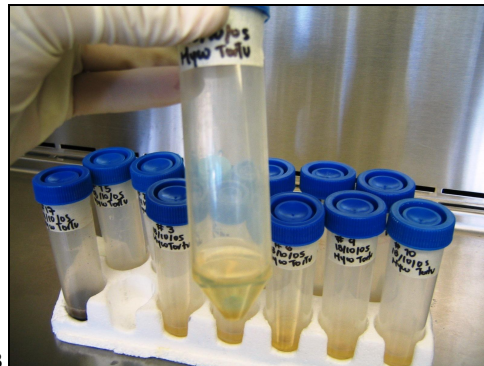
Se utilizó un cultivo específico para cada tipo de muestra (anexo 2)

Figura 6. Procesamiento de muestras de materia fecal



A.

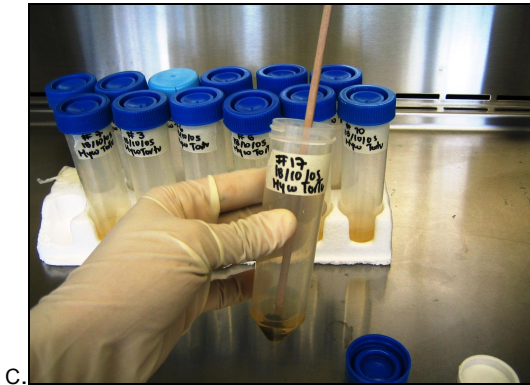
Materia fecal



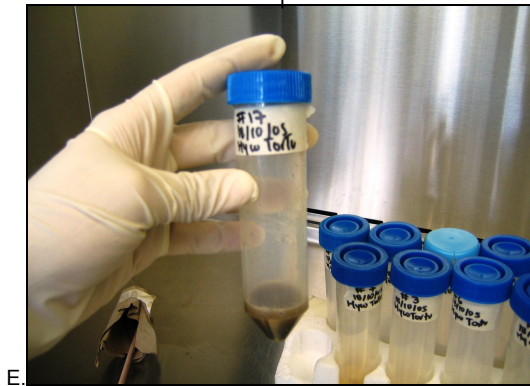
B.

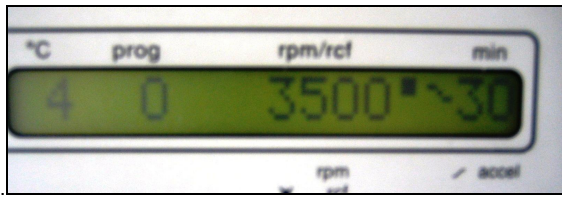
Medio DUBOS Albúmina



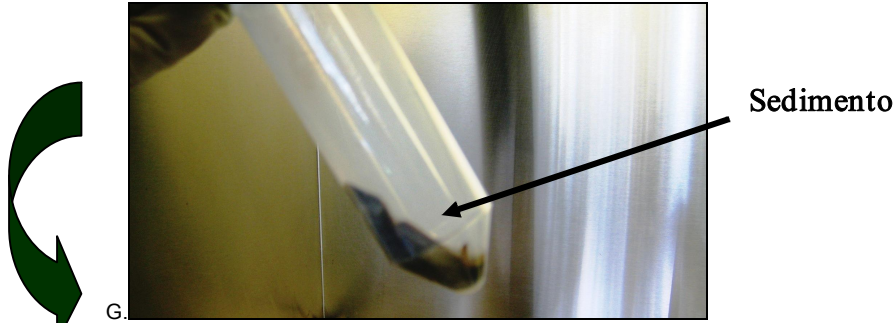


Mezcla de materia fecal con DUBOS

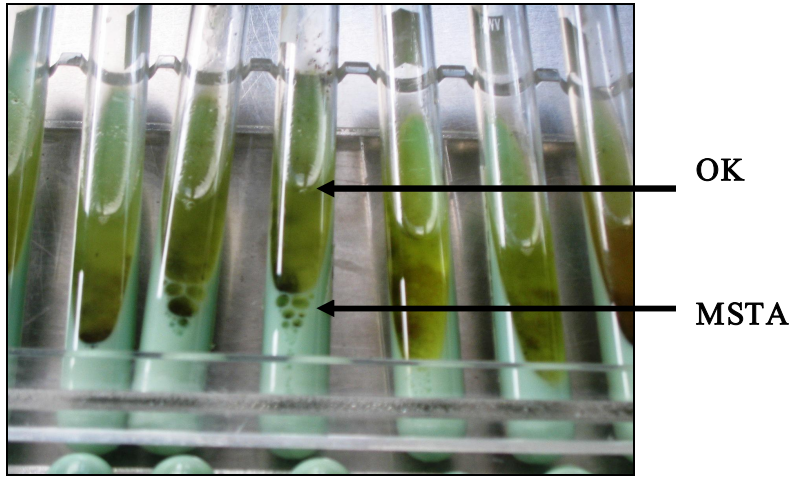




F. Centrifugación de Materia fecal en DUBOS



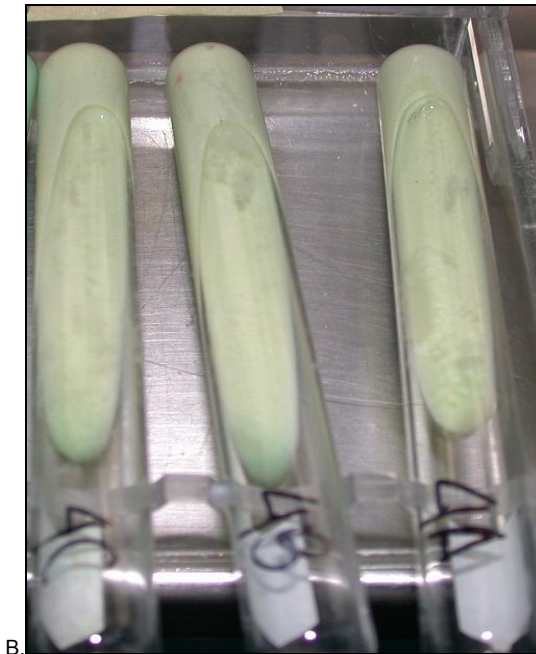
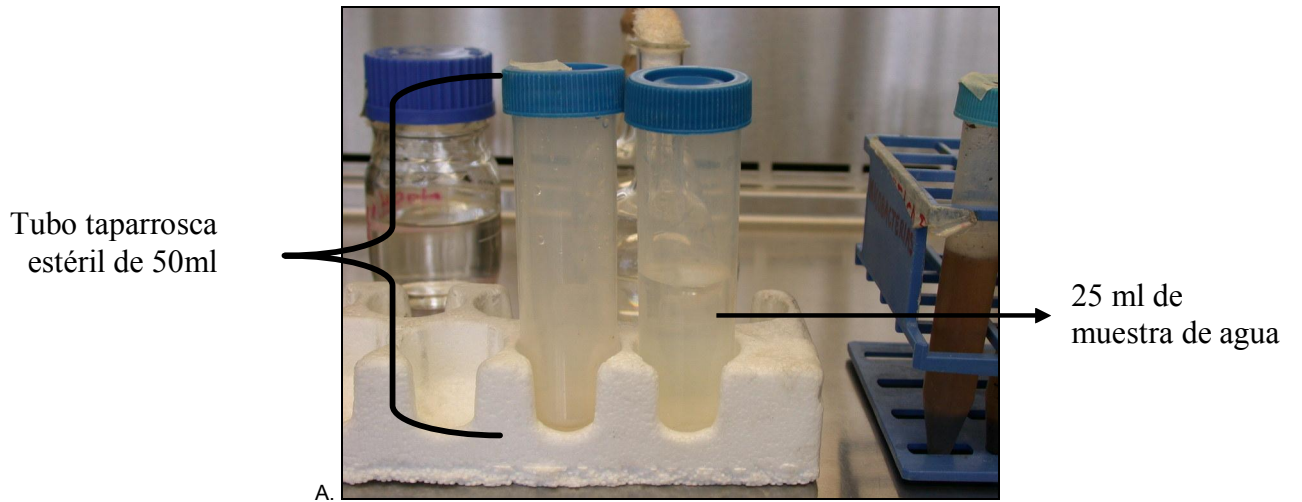
G. Descartó sobrenadante y procedió a proceso de decontaminación, lavado y resuspensión del sedimento para su cultivo.



H. Cultivo en medio Bifásico OK/MSTA.

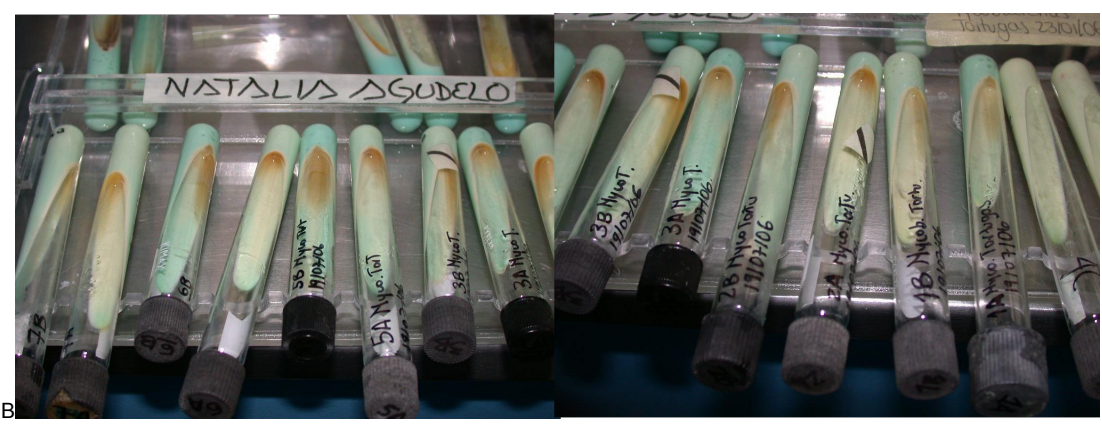
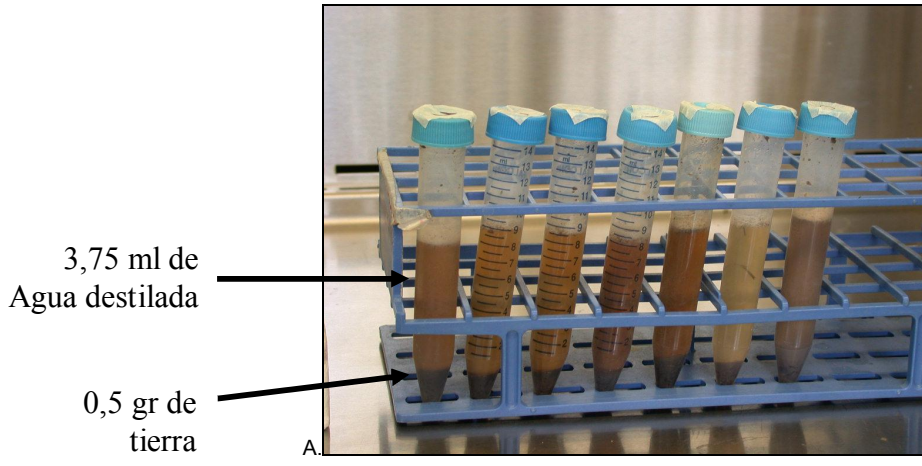
Fuente: Autora, Laboratorio Microbiología Universidad Nacional: 2005-2006.

Figura 7. Procesamiento de muestras de Agua



B: Tubos con medio Lowenstein- Jensen (LJ), sembrados con 0,1 ml (cada uno) de muestra de agua procesada
Fuente: Autora, Laboratorio Microbiología Universidad Nacional: 2006.

Figura 8. Procesamiento de muestras de suelo



B: Tubos de medio Ogawa Kudoh (OK) sembrados con 0,2 ml (cada uno), de muestras de suelo procesadas

Fuente: Autora, Laboratorio Microbiología Universidad Nacional: 2006.

4.7. CASO CLÍNICO EN TORTUGA ICOTEA (*Trachemys scripta spp.*)

Durante el periodo de desarrollo del trabajo de grado, específicamente durante el año 2005, se observó que un grupo de tortugas Ico teas del Zoológico, comenzó a presentar lesiones granulomatosas en plastrón, adelgazamiento progresivo y alta mortalidad; por esto se tomó la decisión de realizar cultivos bacteriológicos básicos apoyados de los estudios histopatológicos de cada una de las tortugas que murieron con esa sintomatología. De esta primera etapa, el resultado arrojado fue el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*, a pesar de la anamnesis de aislamiento de esta bacteria se tomó la decisión de incluir uno de estos animales en el trabajo de grado, (ya que uno de ellos iba a ser sacrificado con fines de enriquecimiento del conociendo por parte del Zoológico y poder orientar el manejo del resto de tortugas) ya que era un problema crónico con los signos descritos anteriormente y con la sospecha de hubiese alguna micobacteria. Por otra parte, para soportar el procedimiento realizado en las tortugas Morrocoy y comparar el comportamiento de las diferentes muestras durante todo el proceso y los resultados obtenidos.

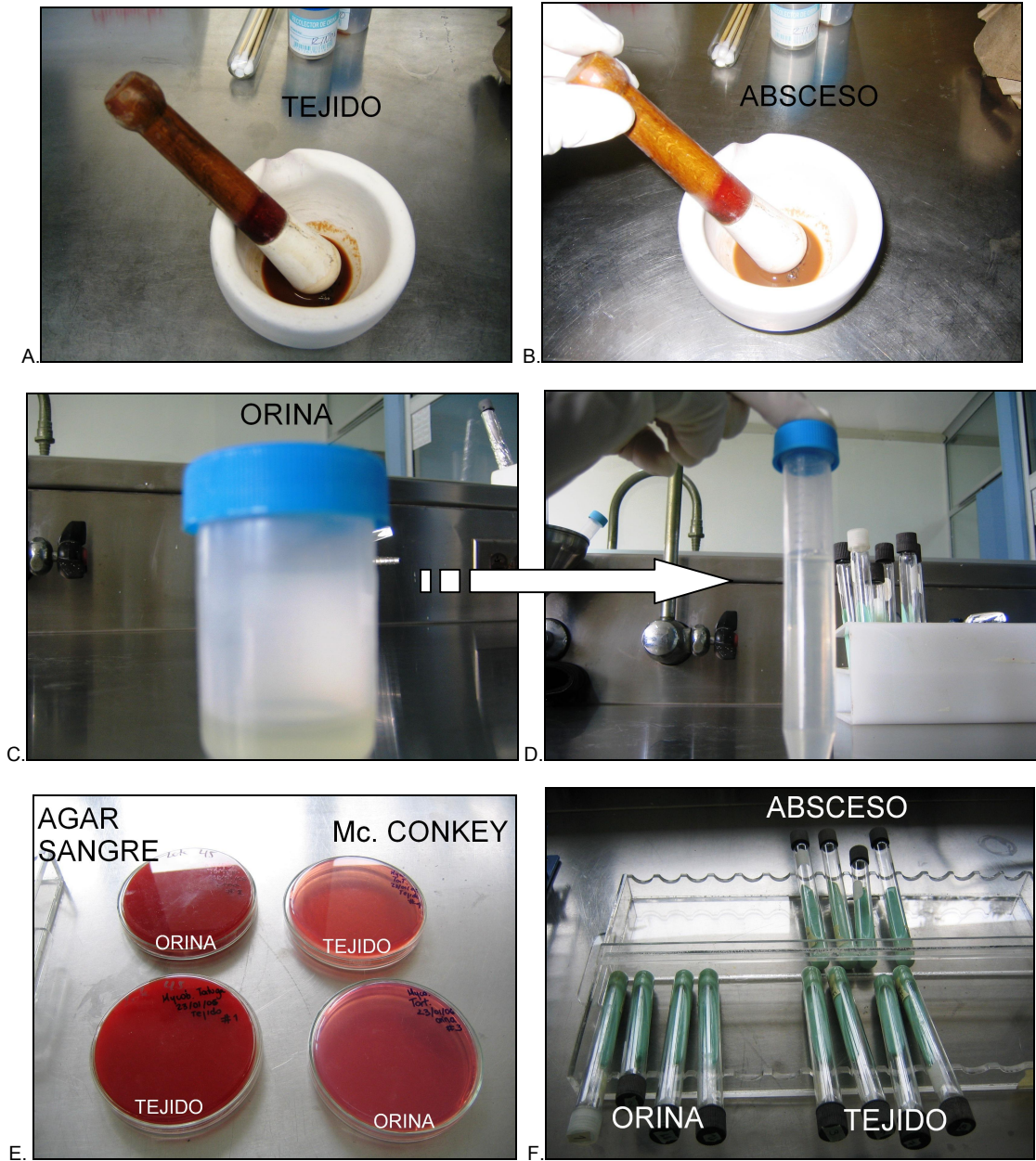
Por lo tanto, en el sacrificio realizado el 20 de Enero del 2006 a una tortuga Ico tea (*Trachemys scripta spp.*), escogida al azar, se tomaron muestras de Orina, Hígado, Pulmón, Bazo, Riñón y un Absceso en el plastron; las muestras fueron llevadas directamente al laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional, debidamente refrigeradas para procesarlas oportunamente.

Una vez en el laboratorio, antes de procesar las muestras, se realizó baciloscopía sólo a las muestras de orina y absceso, debido a que las muestras de tejido eran muy pequeñas y se optó por utilizarlas únicamente para los cultivos.

Posteriormente, se realizaron cultivos básicos (Agar Sangre y Mc Conkey) en los cuales se sembró el sobrenadante del procesamiento de las muestras de orina, y tejido; del absceso no se realizó cultivo en estos medios debido a la cantidad de la muestra. La lectura de los resultados se realizó a las 48 horas.

Por último se procesaron todas las muestras (anexo 2) y se cultivaron de la siguiente manera: Hígado, Bazo, Riñón y Pulmón como una muestra (pool) debido al tamaño de la muestra; Orina y Absceso por separado en medios OK (Ogawa-Kudoh). El proceso seguido se ilustra en la figura 9.

Figura 9. Procesamiento de muestras de Tortuga Icotea (*Trachemys scripta spp.*)



A y B: procesamiento de muestras de tejido y de Absceso; C: Muestra de Orina obtenida por cistocentesis; D: orina centrifugada; E: Cultivo de orina y tejido en cultivos básicos, y F: Cultivo de todas las muestras en medios OK para micobacterias.

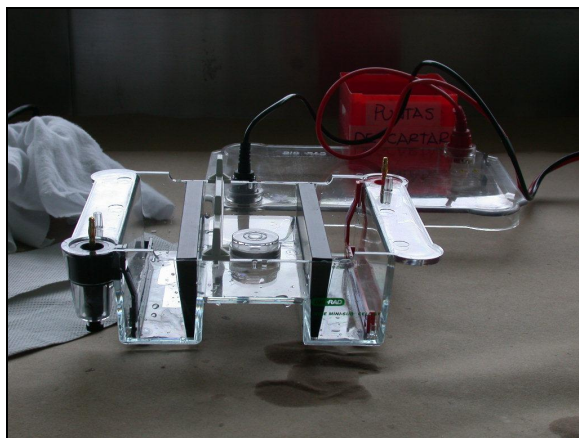
Fuente: Autora; Laboratorio Microbiología Universidad Nacional: 2006.

4.8. IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS

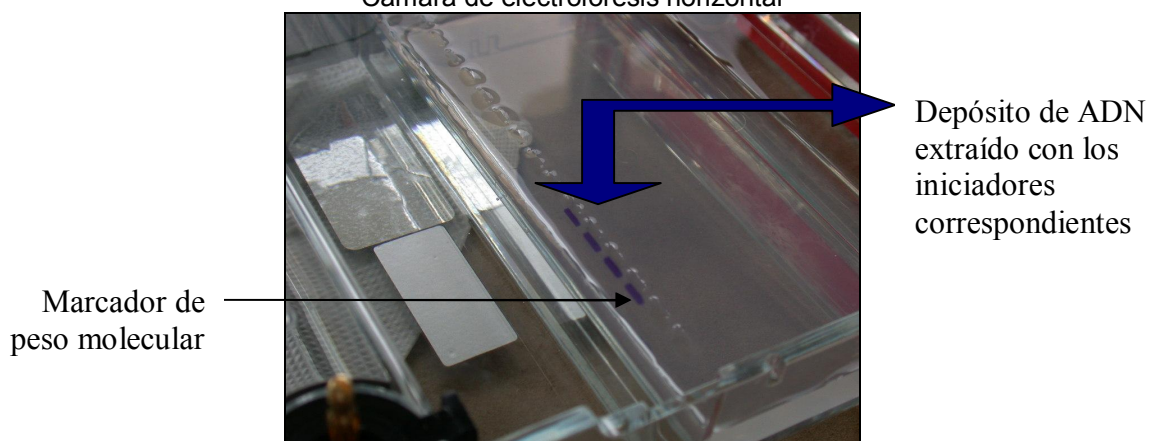
Para la identificación se utilizaron el PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) , para la extracción y amplificación del ADN (Figura 10) y PRA (Análisis de Restricción Enzimática), para la correspondiente identificación (Figura 11); para cada proceso se utilizaron diferentes marcadores de peso molecular los cuales se observan en la figura 12. La identificación se aplicó a los cultivos que tuvieron crecimiento positivo de colonias (anexo 3).

Figura 10. Extracción y amplificación de ADN por PCR

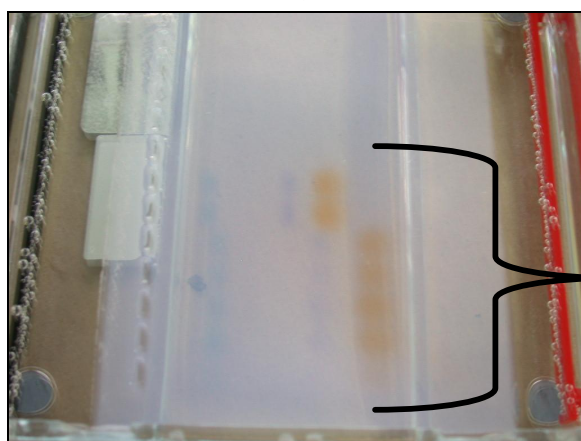




Cámara de electroforesis horizontal

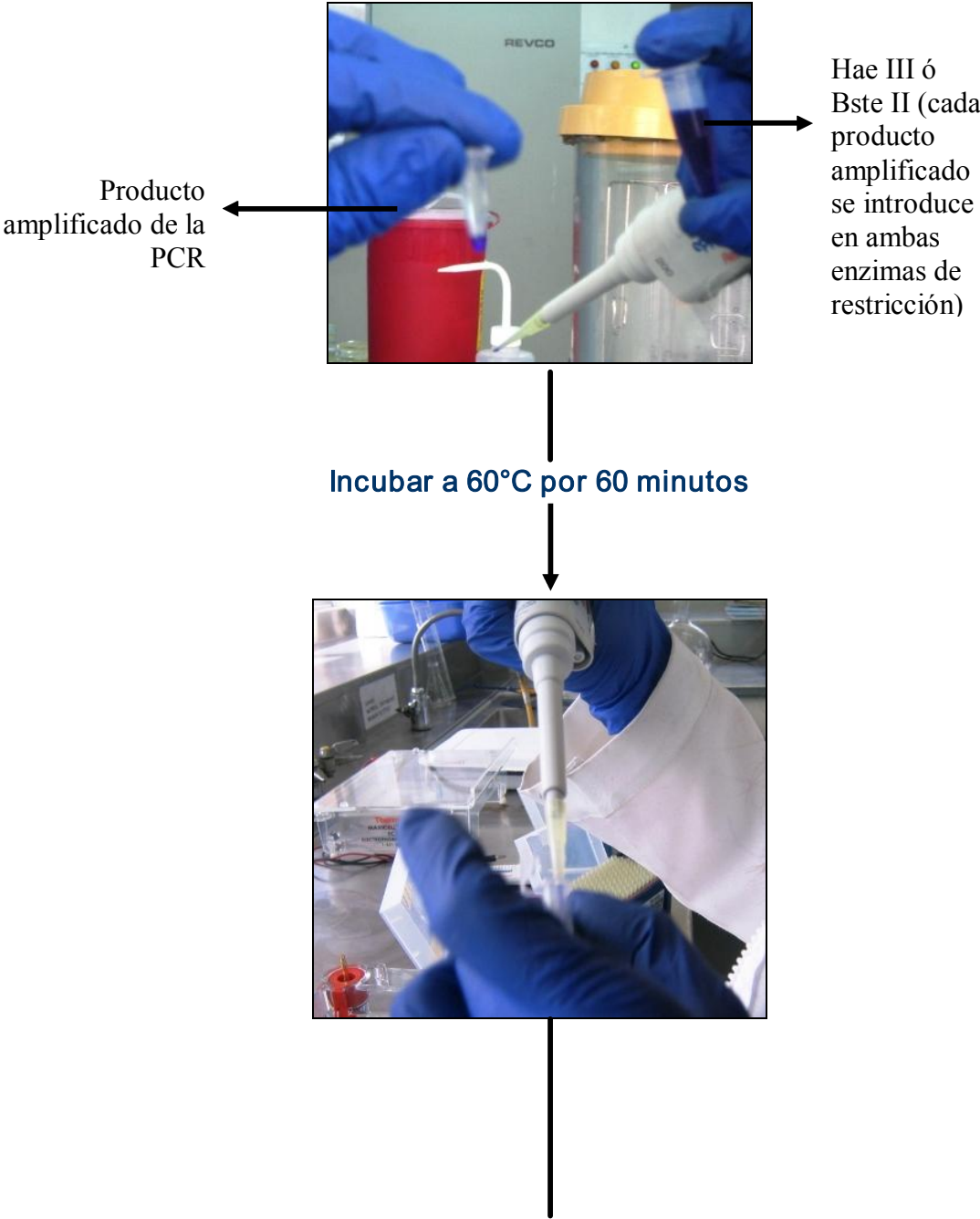


Inicia a correr con 100 Voltios durante 90 minutos



Final de electroforesis. Separación de fragmentos según peso molecular

Figura 11. Identificación por PRA.





- Pozo No.
- 1 Marcador de peso molecular Bste II
 - 2 H37 RV (cepa tuberculosis positiva)
 - 3 Tierra 1 (Morrocoy)
 - 4 Agua
 - 5 Tortuga Icotea
 - 6 Tierra 2 (loras, Pava y Guacamayas rojas)
 - 7 H37 RV (cepa tuberculosis positiva)
 - 8 Marcador de peso molecular Hae III
 - 9 H37 RV (cepa tuberculosis positiva)
 - 10 Tierra 1
 - 11 Agua
 - 12 Tortuga Icotea
 - 13 Tierra 2
 - 14 H37 RV (cepa tuberculosis positiva)

Azul: Bste II
Verde: Hae III

Montaje del gel con cada producto amplificado de cada muestra y con los marcadores de peso molecular, para Bste II y Hae III respectivamente.



Se deja correr en cámara de electroforesis horizontal a 60 voltios durante 5 horas

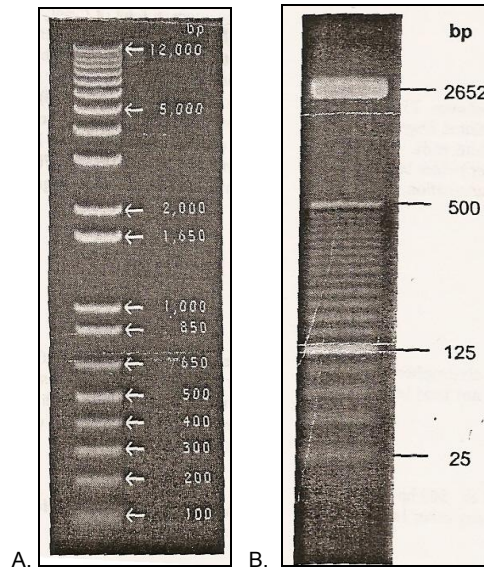


Lectura en Documentador de geles y se anotan los pesos moleculares Guiados por los marcadores de peso molecular



Por último se realizó la identificación a través del programa PRASITE, el cual es de excelente calidad y está avalado a nivel mundial (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>)

Figura 12. Marcadores de peso molecular utilizados en la identificación molecular



A: Marcador de peso molecular para PCR; B: Marcador de peso molecular para PRA.

Fuente: Invitrogen, life technologies, cat. No. 10787-018 y 10597-011.

4.9. PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y ENZIMÁTICAS ADICIONALES

Debido a los resultados obtenidos con el cultivo de las muestras de agua (una micobacteria con pesos moleculares muy parecidos al *Mycobacterium tuberculosis*, como se indica en la sección de resultados) y aunque la morfología de las colonias no coincidía con *M. tuberculosis*, se tomó la decisión de realizar pruebas bioquímicas y enzimáticas para descartar definitivamente la presencia de *M. tuberculosis*, ya que implicaba un problema importante desde el punto de vista epidemiológico y de salud pública. Se realizaron las pruebas con Niacina, Reducción de nitratos y Actividad de catalasas (anexo 5).

4.10. MANEJO DE LA INFORMACIÓN:

Se diseñó una base de datos con las variables y los resultados de cada uno de los casos del estudio

Manejo estadístico: con los resultados obtenidos se estimaron las frecuencias de cada una de las variables.

4.11. CONFIABILIDAD:

La toma y el procedimiento de las muestras, la realización de las pruebas bioquímicas y moleculares, fueron orientadas por Bacteriólogos y Microbiólogos profesionalmente dedicados a esta labor de manera cotidiana. Todos los procesos de laboratorio se realizaron en el Laboratorio de bacteriología de la facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. En estas condiciones es razonable plantear que la confiabilidad en los procesos de es la mejor esperada en unas condiciones dadas.

NOTA: los procedimientos fueron realizados tanto por la estudiante como por el personal del laboratorio y que algunos de ellos se repitieron.

5. RESULTADOS

5.1. TUBERCULINIZACIÓN

Tras la aplicación de la tuberculina de *M. avium* a las tortugas Morrocoy (*Geochelone carbonaria*), se obtuvo que ninguna presentó dermorreacción a las 24 horas ni a las 48 horas, como se puede observar en la tabla 2 y la figura 13.

Tabla 2. Tuberculinización en Tortugas Morrocoy (*Geochelone carbonaria*) en un Zoológico de la Sabana de Bogotá

Tortuga No	Edad	Sitio	Lectura 24h	Lectura 48h
1	A	MAI	N	N
2	A	MAD	N	N
3	A	MAD	N	N
4	A	MAD	N	N
5	A	MAI	N	N
6	A	MAD	N	N
7	A	MAI	N	N
8	A	MAD	N	N
9	A	MAD	N	N
10	A	MAI	N	N
11	A	MAD	N	N
12	A	MAD	N	N
13	A	MAD	N	N
14	A	MAD	N	N
15	A	MAD	N	N
16	J	No se aplico por ser muy pequeña		
17	J	MAD	N	N
18	J	MAD	N	N
19	A	MAD	N	N

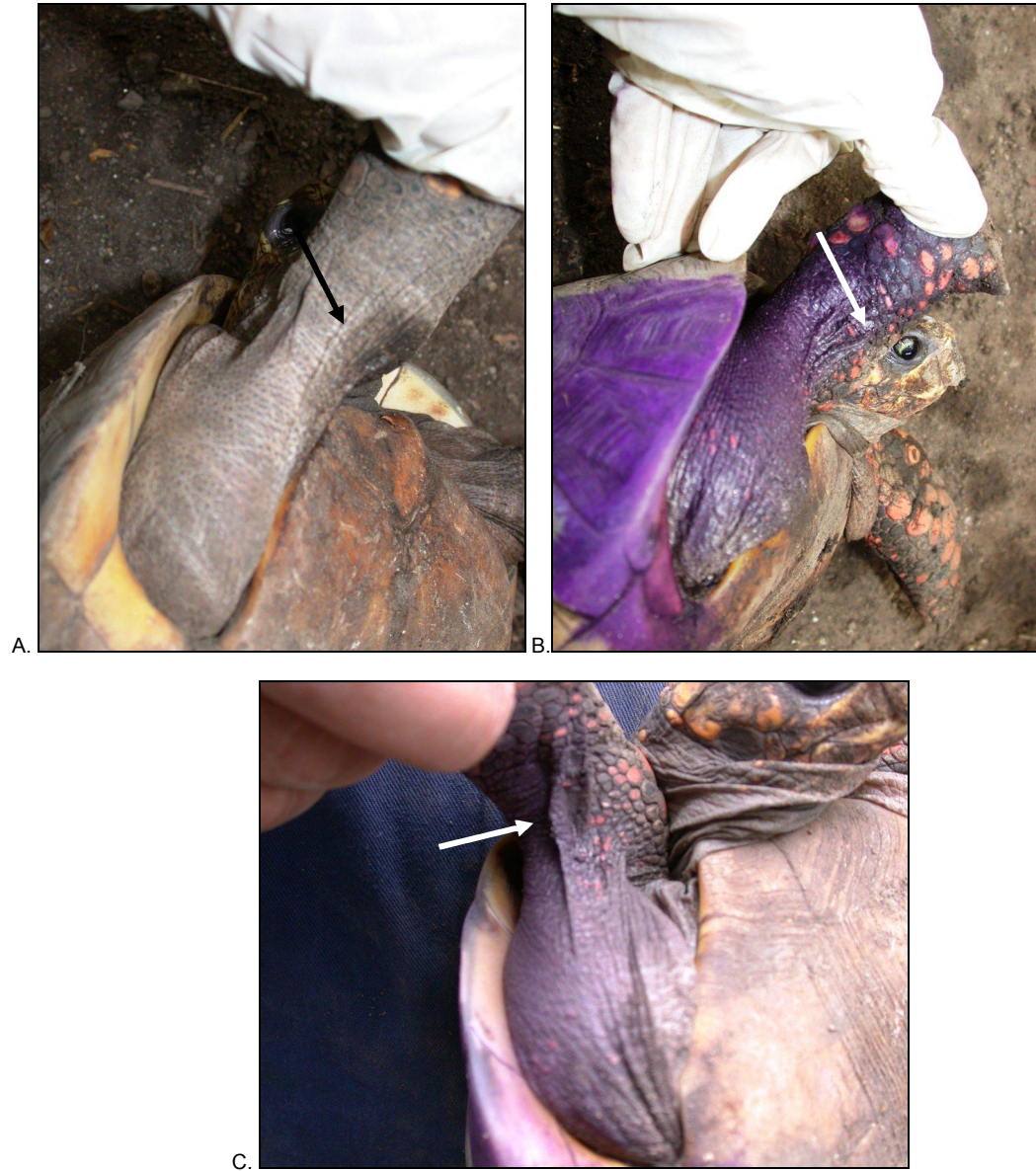
Edad: A: Adulto; J: juvenil

Sitio: MAD (Miembro anterior derecho); MAI (Miembro anterior izquierdo)

Lectura: N: Negativo; P: Positivo.

Fuente: Autora; ZSB:2005.

Figura 13. Dermorreacción negativa a la Tuberculinización en Tortugas Morrocoy (*Geochelone carbonaria*)



Fuente: Autora; ZSB: 2006

5.2. MICROSCOPIA DIRECTA (BACILOSCOPIA) Y CRECIMIENTO DE MUESTRAS DE MATERIA FECAL

5.2.1. Baciloscopia

De 19 muestras de Materia fecal (MAF) sólo 4 muestras (21%), fueron positivas con la coloración de ZN, pero con muy bajo número de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) (tabla 3). También se observó alto grado de flora bacteriana y otros microorganismos como, cocobacilos e hifas principalmente, como se observa en la figura 14.

Tabla 3. Baciloscopia de muestras de MAF de Tortugas Morrocoy (*Geochelone carbonaria*)

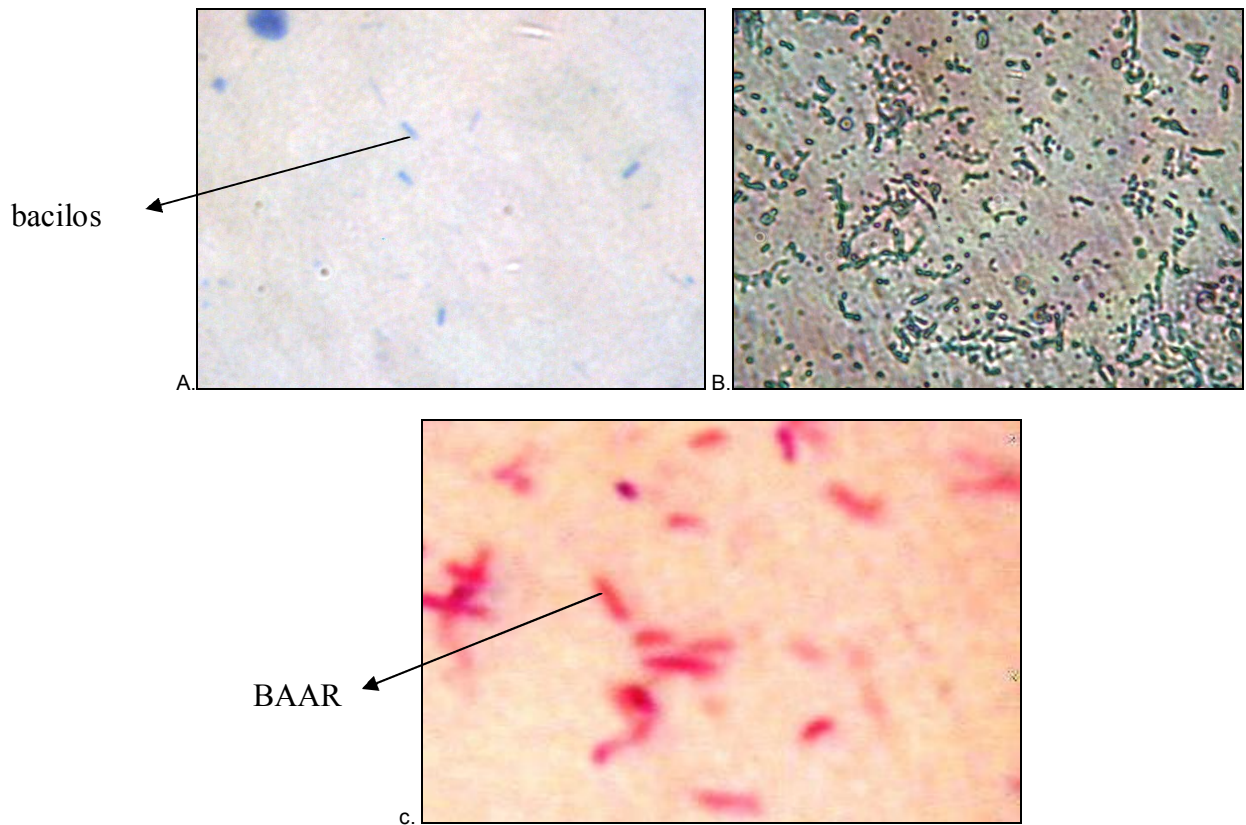
Muestra No	Tortuga No	R/tado	Observaciones
1	14	N	Contaminado
2	4	N	Contaminado
3	18	N	Contaminado
4	17	N	Contaminado
5	19	P	2 Bacilos, Contaminado
6	8	N	Contaminado
7	3	P	1 Bacilo, Contaminado
8	1	N	Contaminado
9	11	N	Contaminado
10	9	N	Contaminado
11	12	N	
12	16	P	5 Bacilos, Contaminado
13	13	N	Contaminado
14	2	N	
15	5	N	Contaminado
16	6	N	
17	7	P	1 Bacilo, Contaminado
18	10	N	
19	15	N	

Resultado: P: Positivo; N: Negativo

Contaminado: Término de laboratorio: presencia de cocobacilos, hifas y otros microorganismos.

Fuente: Autora; Laboratorio Microbiología Universidad Nacional:2005.

Figura 14. Baciloscopia de muestras MAF de Morrocoy (n=19)



A: ZN negativo, B: Alto grado de contaminación y C: ZN positivo con no más de 5 BAAR
Fuente: Autora: Laboratorio Microbiología Universidad Nacional: 2005.

5.2.2. Crecimiento

En las 19 muestras de MAF cultivadas durante un período total de 12 semanas, no se obtuvo crecimiento en ningún cultivo. (tabla 4 y figura 15).

Tabla 4. Crecimiento de *Mycobacterium sp.*, en cultivos a partir de MAF, de Tortugas Morrocoy (*Geochelone carbonaria*)

Muestra No	Tortuga No	Creció
1	14	No
2	4	No
3	18	No
4	17	No
5	19	No
6	8	No
7	3	No
8	1	No
9	11	No
10	9	No
11	12	No
12	16	No
13	13	No
14	2	No
15	5	No
16	6	No
17	7	No
18	10	No
19	15	No

Fuente: Autora; Laboratorio Microbiología Universidad Nacional:2005 - 2006.

Figura 15. Cultivos de MAF de tortugas Morrocoy sin crecimiento al terminar el periodo de cultivo



Cultivos de MAF sin crecimiento al culminar la 12ava semana de incubación.

Fuente: Autora; Laboratorio Microbiología Universidad Nacional: 2006

5.3. BACILOSCOPIA Y CRECIMIENTO DE MUESTRAS AMBIENTALES

5.3.1. Suelo (Tierra)

Las muestras de tierra obtenidas de la superficie, del encierro de las Morrocoy, resultaron negativas al ZN y no crecieron durante el periodo de incubación. Las muestras de tierra obtenidas a 5 y 10 cm de profundidad resultaron positivas a ZN y presentaron crecimiento en el medio de cultivo. La muestra de tierra tomada en la superficie de la Pava (*Ortalis sp.*) resultó positiva a ZN y con un crecimiento también positivo al igual que la muestra de tierra tomada en el encierro de las Guacamayas rojas (*Ara macao*). La muestra obtenida en el encierro de las loras (*Amazona sp.*) fue negativa para ZN pero creció en el medio de cultivo; y la muestra del encierro de las Guacamayas azules (*Ara ararauna*) fue negativa, tanto para ZN, como para crecimiento en medio de cultivo (tabla 5 y figura 16).

5.3.2. Agua/Sedimento

La primera muestra de agua fue negativa para ZN, y no tuvo crecimiento; adicionalmente se observó un alto grado de contaminación en el medio de cultivo que no permitió seguir con el proceso a pesar de los protocolos de descontaminación.

La segunda muestra de agua, procesada inmediatamente se tomó, se observó ZN positivo y hubo crecimiento positivo (tabla 5 y figura 16).

Tabla 5. Baciloscopia (ZN) y crecimiento de muestras ambientales de un Zoológico en la Sabana de Bogotá

Muestra	R/tado	Observaciones	Crecimiento
SUELO (TIERRA)	(ZN)		
Suelo de encierro Morrocoy			
Superficie	N		No
5cm profundidad	P		Si
10 cm profundidad	P		Si
Encierros diferentes pero del mismo complejo			
Superficie encierro Pava	P		Si
Encierros diferentes fuera del complejo			
Superficie encierro loras	N		Si
Superficie encierro Guacamayas rojas	P		Si
Superficie encierro Guacamayas azules	N		No
AGUA/SEDIMENTO			
1ra Muestra	N	Alta contaminación	No
2da Muestra	P		Si

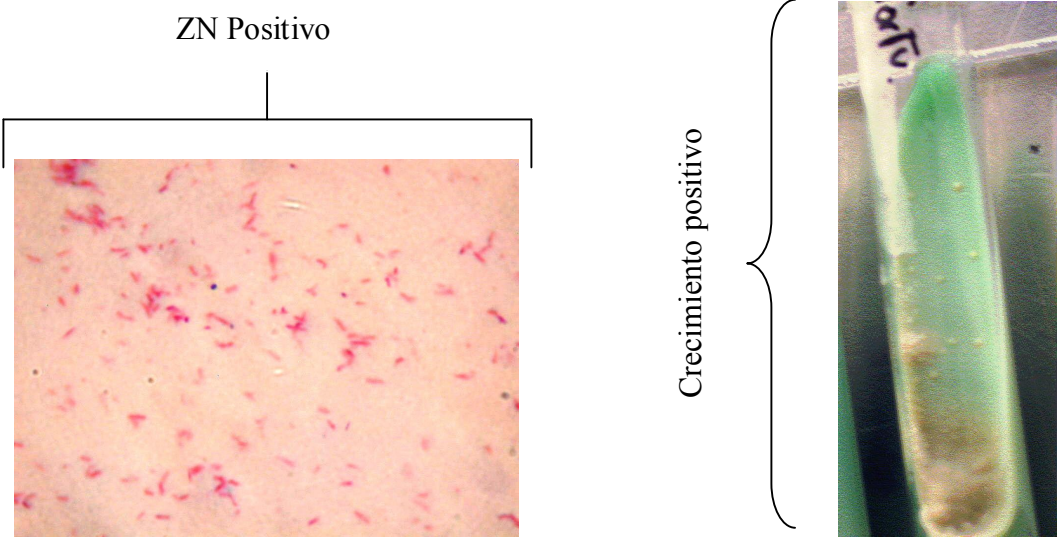
Resultado: P: Positivo; N: Negativo

Contaminado: Término de laboratorio: presencia de flora normal como cocobacilos, hifas y otros microorganismos diferentes a micobacterias.

Fuente: Autora; Laboratorio Microbiología Universidad Nacional:2006.

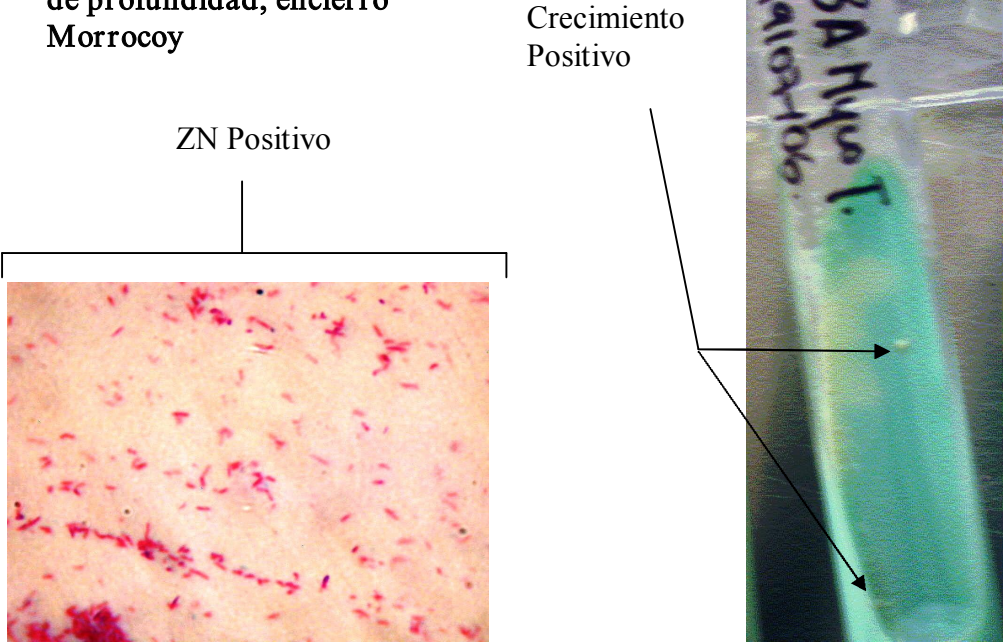
Figura 16. Baciloscopia y Crecimiento de muestras ambientales

Muestra de suelo de 5cm de profundidad encierro Morrocoy



A.

Muestra de tierra de 10 cm de profundidad, encierro Morrocoy

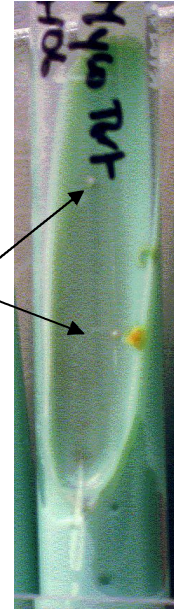
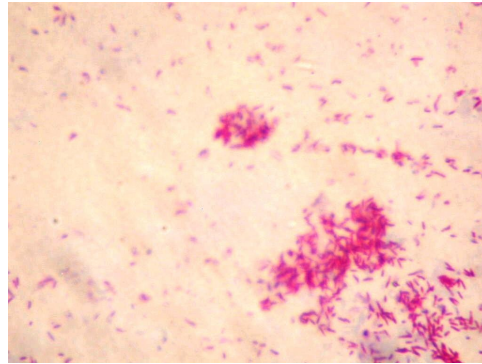


B.

Muestra de tierra del
encierro de la Pava

Crecimiento positivo

ZN
Positivo

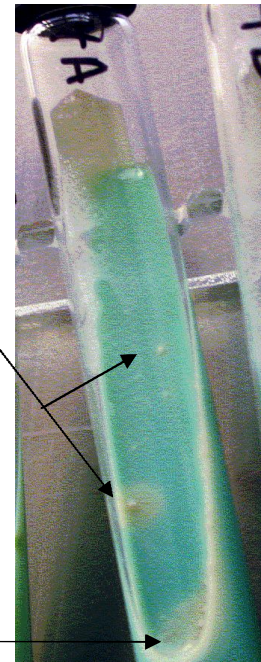
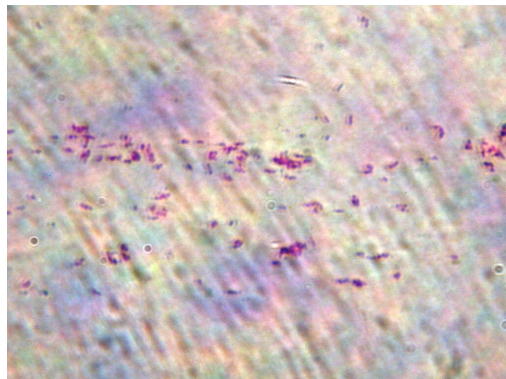


C.

Muestra de tierra de
encierro de Guacamayas
rojas

ZN Positivo

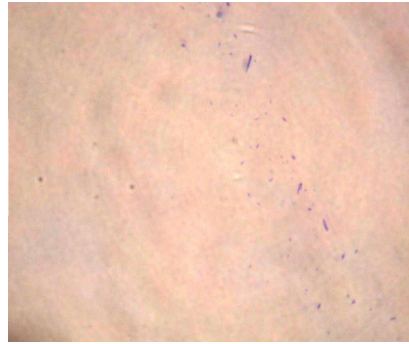
Crecimiento positivo



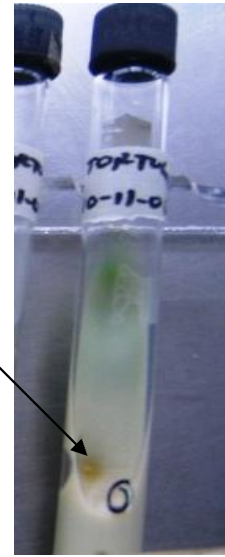
D.

Muestra de tierra de encierro de Loras

ZN
Negativo



Crecimiento
positivo



E.

Muestra de tierra de la superficie del encierro de las Tortugas Morrocoy

ZN Negativo



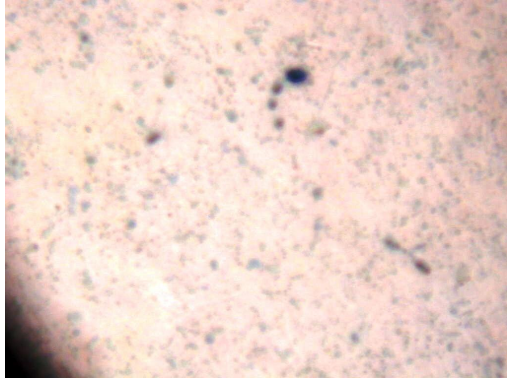
Crecimiento
Negativo



F.

Muestra de tierra de encierro
de Guacamayas azules

ZN Negativo



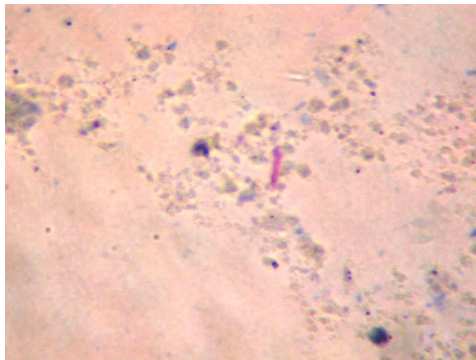
Crecimiento
Negativo



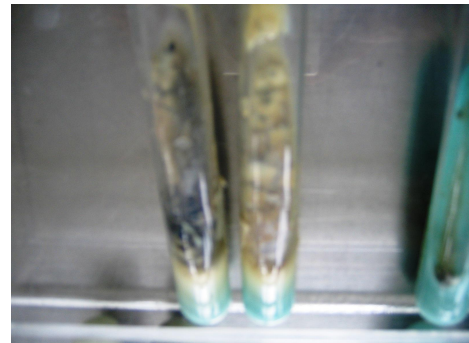
G.

1ra Muestra de agua del
encierro de tortugas Morrocoy

ZN Negativo



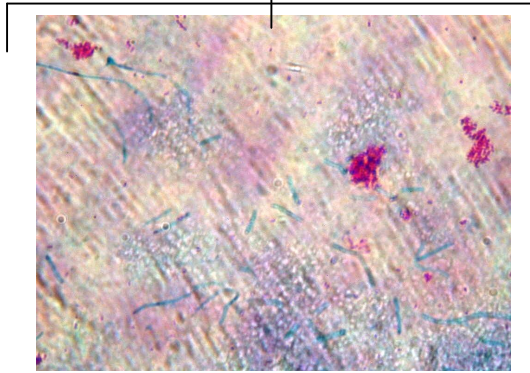
Crecimiento negativo



H.

2da Muestra de agua del encierro
de tortugas Morrocoy

ZN Positivo



Crecimiento
Positivo



1.

Fuente: Autora; Laboratorio Microbiología Universidad Nacional:2006.

5.4. CASO DE TORTUGA ICOTEA (*Trachemys scripta spp.*)

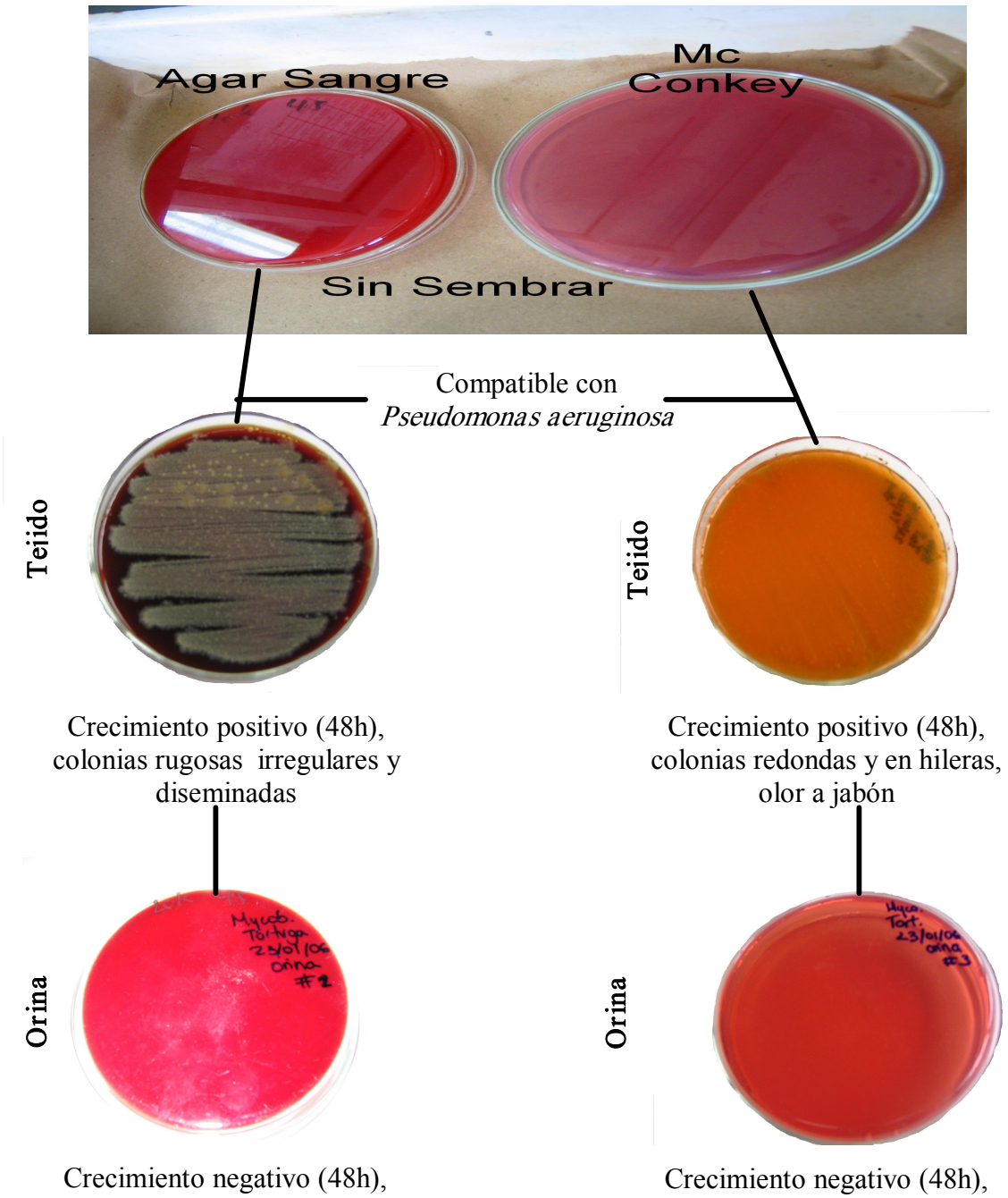
En el caso de la tortuga Icotea (*Trachemys scripta spp.*), de la siembra de tejido y orina en medios de cultivo básicos como Agar Sangre y Mc Conkey se obtuvo crecimiento de la muestra de tejido en ambos medios, mientras que la muestra de orina no creció en ningún medio. Según las características morfológicas de las colonias y por el olor característico a jabón, se llegó al diagnóstico presuntivo de *Pseudomonas aeruginosa*, más no se realizaron las pruebas bioquímicas para la identificación de la bacteria, debido al deterioro de los cultivos (figura 17). Al realizar Baciloscopia se obtuvo que de las tres muestras (Orina, tejido y Absceso), solo la de absceso fue positiva, indicando la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (figura 18). Con respecto al cultivo para la posterior identificación de *Mycobacterium sp.*, se obtuvo que de la siembra de tejido, Orina y Absceso, sólo creció el cultivo con la muestra de Absceso (figura 19 tabla 6).

Tabla 6. Caso en Tortuga Icotea (*Trachemys scripta spp.*) en un Zoológico en la Sabana de Bogotá

Muestras	Cultivo						Baciloscopia	
	Agar Sangre		Mc conkey		Esp. Para micobacterias			
	Realizó	Creció	Realizó	Creció				Realizó
Tejido	Si	Si	Si	Si	Si	No	Si	Negativo
Absceso	No	No	No	No	Si	Si	Si	Positivo
Orina	Si	No	Si	No	Si	No	Si	Negativo

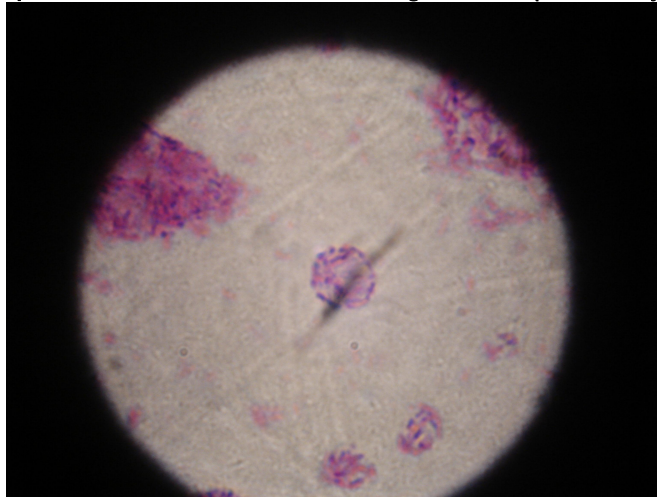
Fuente: Autora; Laboratorio Microbiología Universidad Nacional:2006.

Figura 17. Siembra de Tejido y orina en Agar Sangre y Mc Conkey

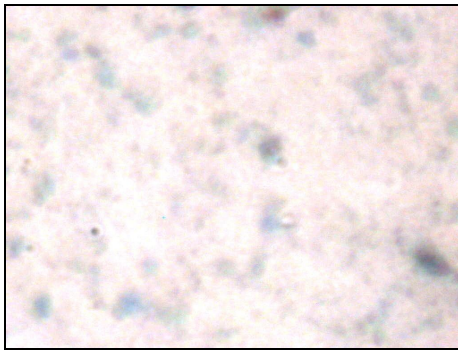


Fuente: Autora; Laboratorio Microbiología Universidad Nacional:2006.

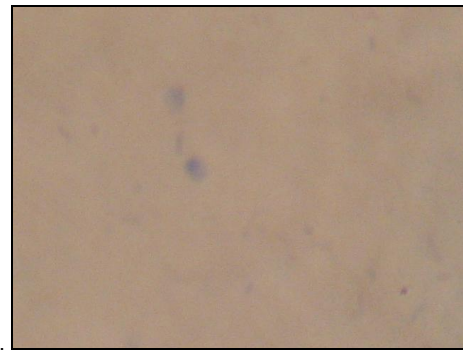
Figura 18. Baciloscopia de las muestras de la Tortuga Icoatea (*Trachemys scripta* spp.)



A.



B.

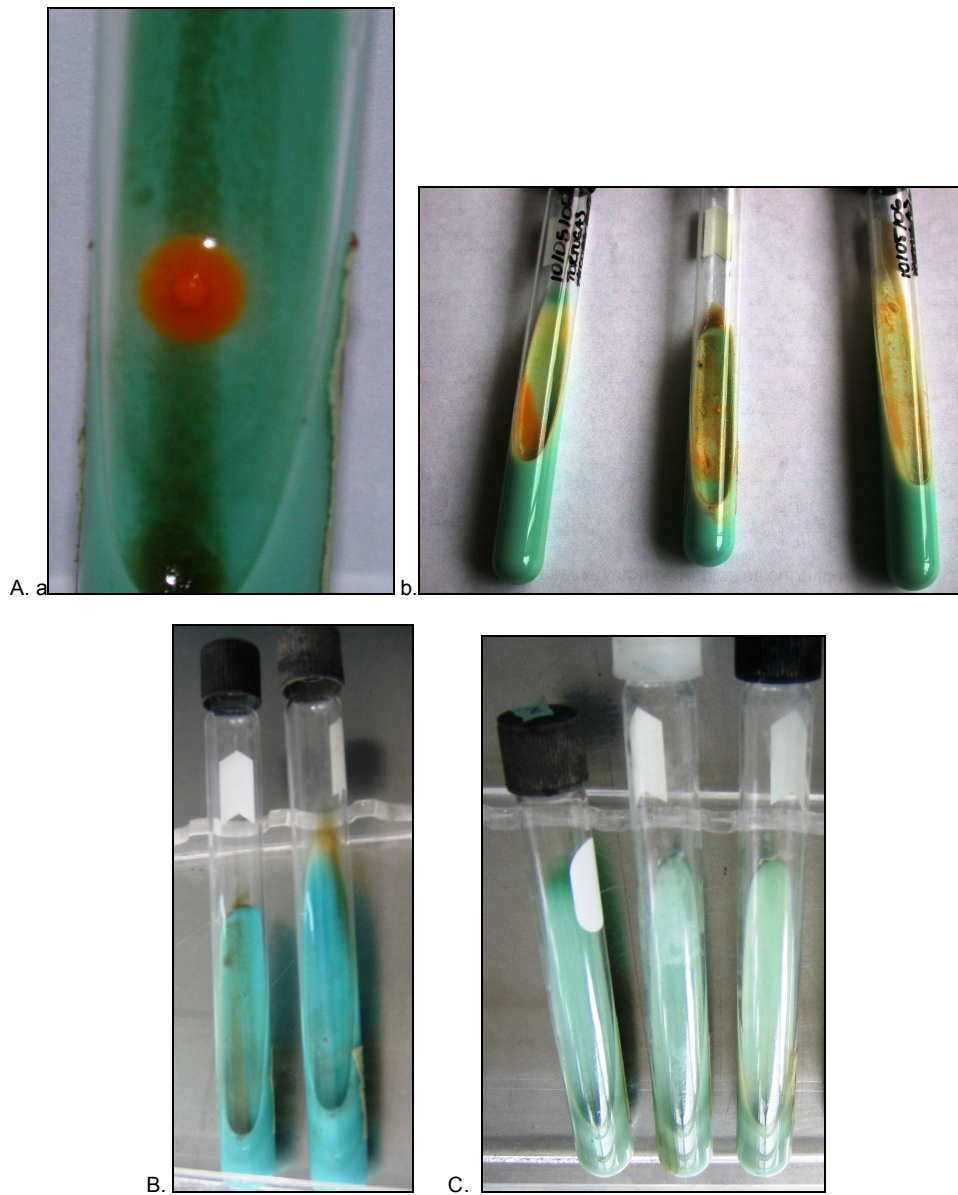


C.

A: Baciloscopia positiva de muestra de absceso; B y C: Baciloscopia negativa de tejido y orina respectivamente

Fuente: Autora; Laboratorio Microbiología Universidad Nacional:2006.

Figura 19. Crecimiento de muestras sembradas en cultivos para micobacterias de la Tortuga Icoatea (*Trachemys scripta spp.*)



A: a.Crecimiento inicial positivo de muestra de absceso, b: Repiques de cultivo inicial; B y C:Crecimiento negativo de muestras de tejido y orina respectivamente.
Fuente: Autora; Laboratorio Microbiología Universidad Nacional:2006

5.5. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Mycobacterium sp.*, POR PCR-PRA.

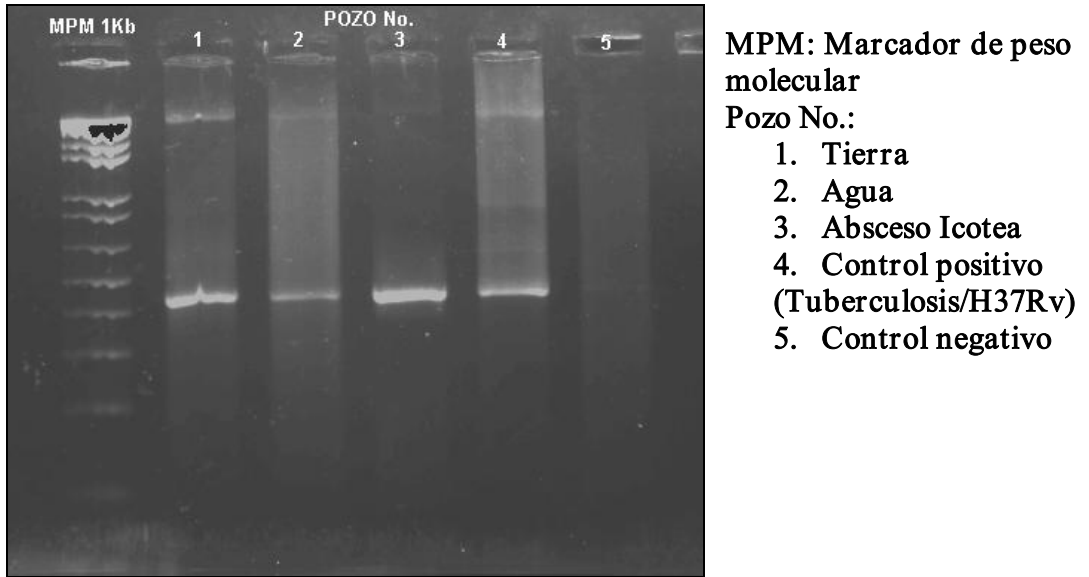
La identificación molecular se realizó con cada uno de los cultivos que crecieron, según el origen de la muestra: el cultivo que creció a partir de la muestra de absceso de la Tortuga Icoatea (*Trachemys scripta spp.*), todas las que tuvieron crecimiento positivo a partir de muestras de tierra y al cultivo que tuvo crecimiento a partir del segundo muestreo de agua/sedimento, del encierro de las Tortugas Morrocoy (*Geochelone carbonaria*).

Como se mencionó en la metodología y en el anexo 2, la primera etapa de la identificación consta de la extracción y amplificación de ADN de *Mycobacterium sp.*, por medio de PCR. En todas las muestras mencionadas anteriormente se obtuvo amplificación de ADN, lo cual confirmó la presencia de micobacterias (figura 20).

Por consiguiente, se prosiguió con la identificación de género y especie de la micobacteria de cada una de las muestras, según los pesos moleculares, con base en los marcadores de peso molecular para cada enzima, BstII y HaeIII respectivamente, por medio del PRA (figura 21).

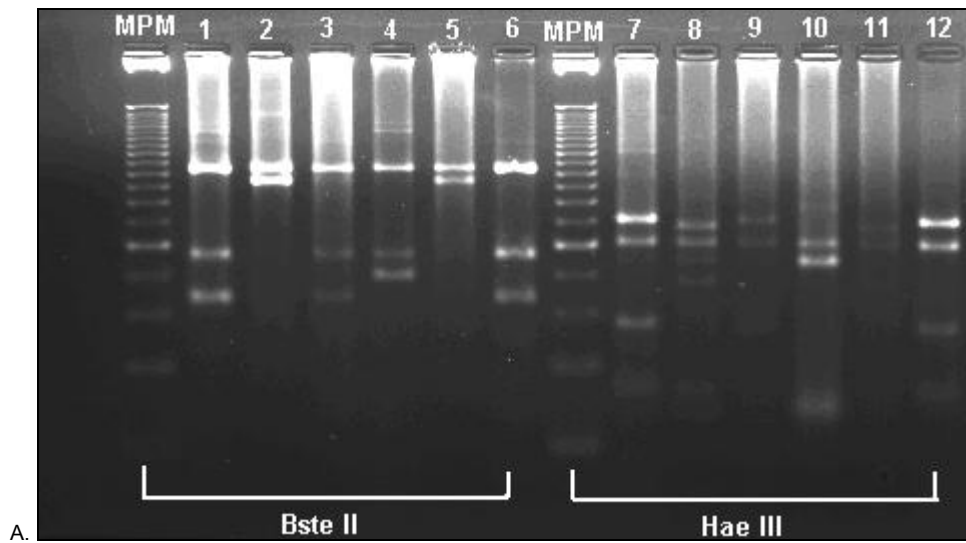
Posterior al PRA se anotaron los pesos moleculares y se introdujeron en el programa "PRASITE", mencionado en la metodología, y se obtuvieron diferentes tipos de micobacterias en todas las muestras, y un tiempo de crecimiento distinto, como se indica en la Tabla 7.

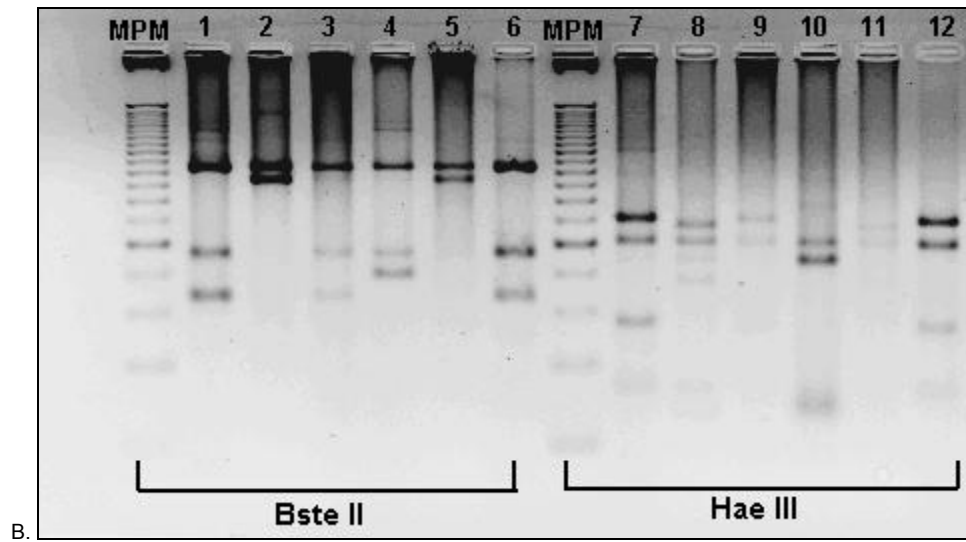
Figura 20. PCR de las muestras con crecimiento positivo



Fuente: Autora; Laboratorio Microbiología Universidad Nacional:2006

Figura 21. PRA de las muestras con amplificación de ADN por PCR





A y B:

MPM: Marcador de peso molecular (25bp) para Bste II y Hae III

NOTA: las Figuras A y B son iguales pero con efectos diferentes para poder observar bien las bandas.

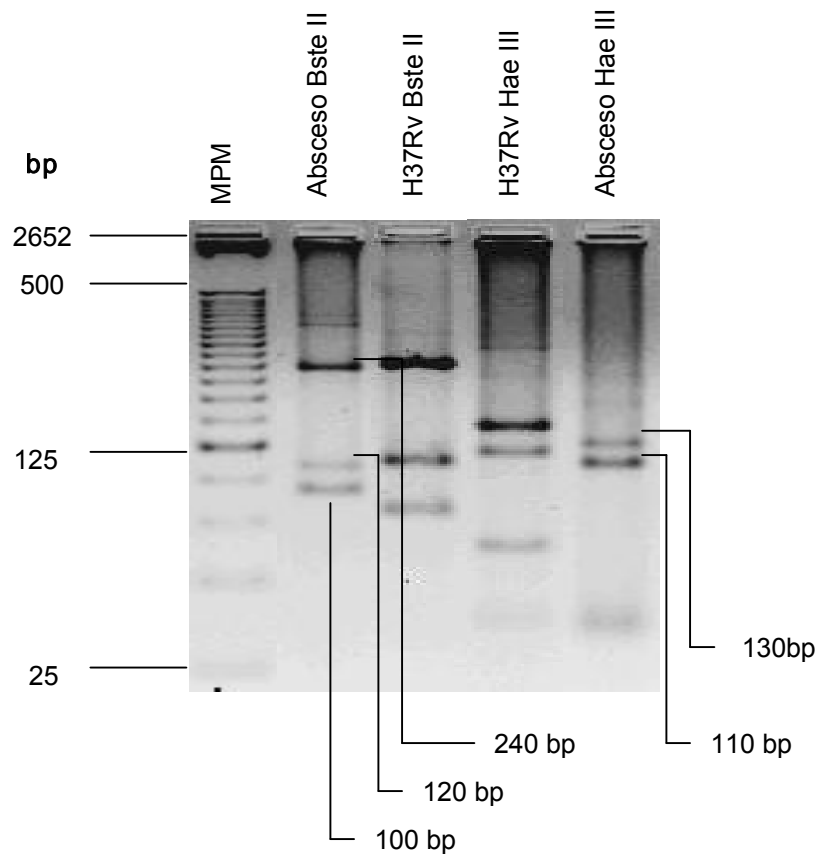
Bste II

1. Tuberculosis H37Rv
2. Tierra 1
3. Agua
4. Absceso Icotea
5. Tierra 2
6. Tuberculosis H37Rv

Hae III

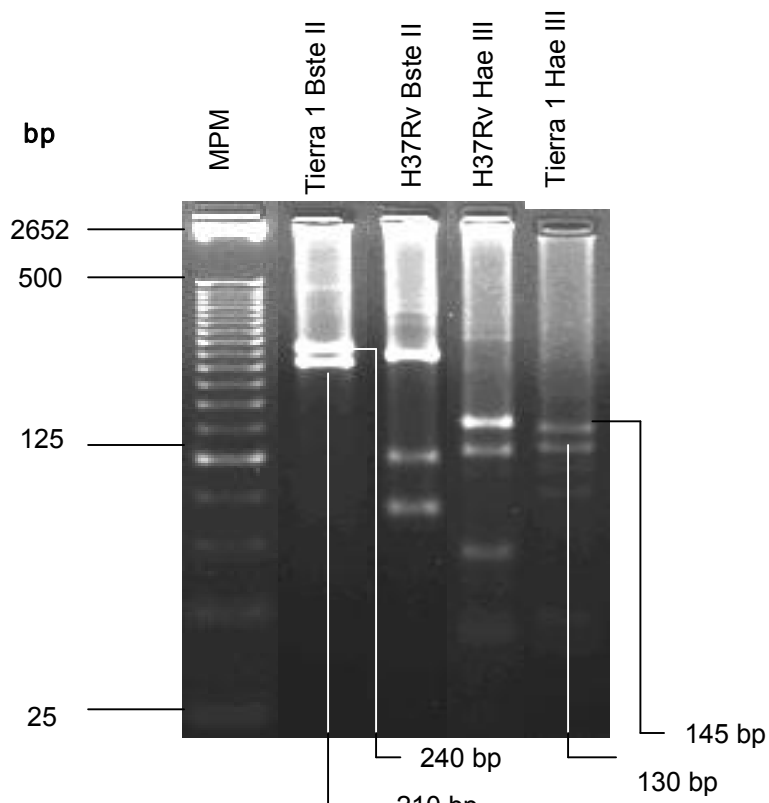
7. Tuberculosis H37Rv
8. Tierra 1
9. Agua
10. Absceso Icotea
11. Tierra 2
12. Tuberculosis H37Rv

Fuente: Autora; Laboratorio Microbiología Universidad Nacional:2006.



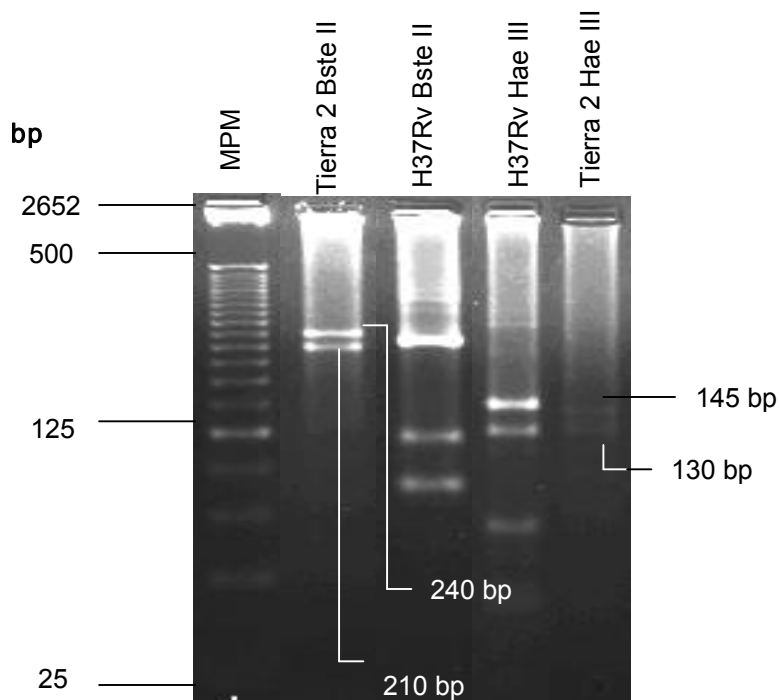
c.

Identificación molecular de *Mycobacterium gordonae* Tipo 3 en muestra de Absceso de Tortuga Icoetea (*Trachemys scripta* spp.)



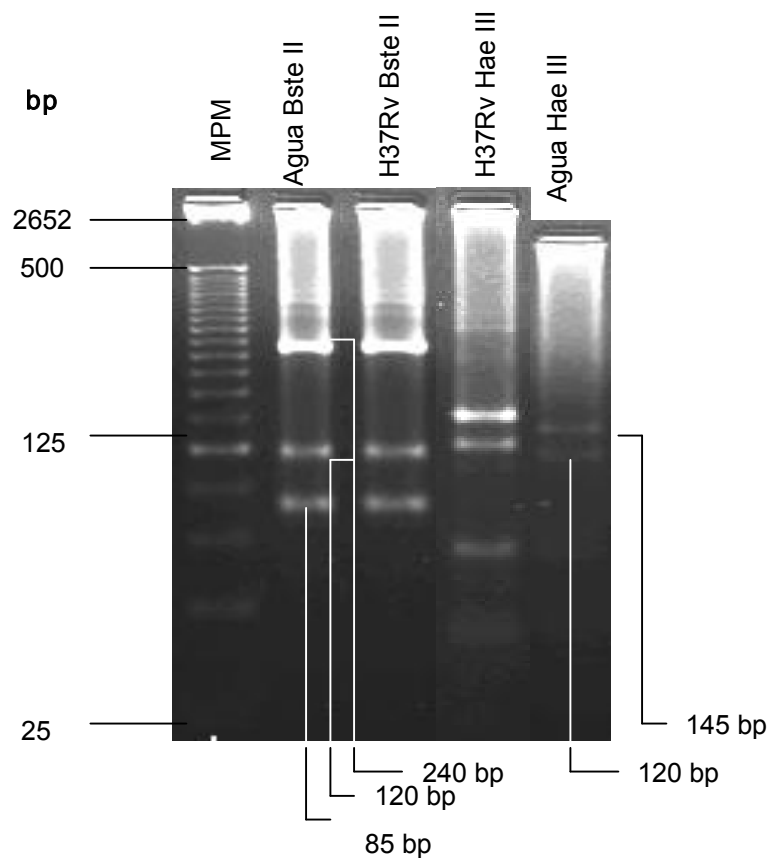
D.

Identificación molecular de *Mycobacterium avium tipo 3* en muestras de tierra 1 (encierro Morrocoy)



E.

Identificación molecular de *Mycobacterium avium tipo 3* en muestras de tierra 2 (encierro Loras, Pava y Guacamayas rojas)



Identificación molecular de *Mycobacterium fortuitum* Tipo 1 en muestra de Agua/sedimento (encierro Morrocoy)

Fuente: Autora; Laboratorio Microbiología Universidad Nacional:2006.

Tabla 7. Identificación y Tiempo de crecimiento de *Mycobacterium* sp., por PCR-PRA

Muestra	TC semana	Resultado		
		Género	Especie	Tipo
Tortuga Icoetea				
Absceso	12	<i>Mycobacterium</i>	<i>gordonae</i>	3
Ambientales				
Tierra 1 y 2	9	<i>Mycobacterium</i>	<i>avium</i>	3
Agua	3	<i>Mycobacterium</i>	<i>fortuitum</i>	1

TC: Tiempo de crecimiento

Fuente: Autora; Laboratorio Microbiología Universidad Nacional:2006.

5.6. PRUEBAS BIOQUÍMICAS–ENZIMÁTICAS

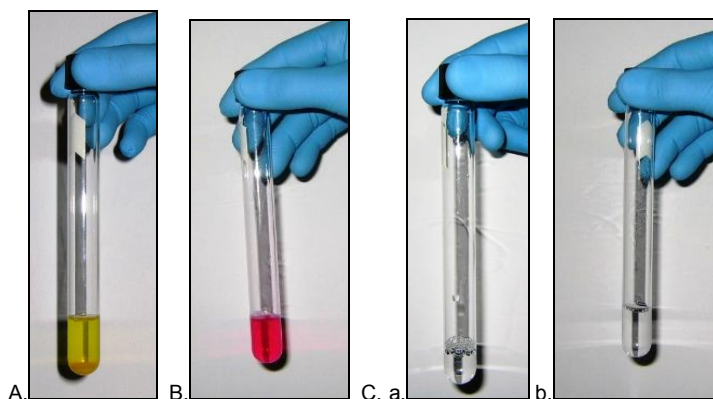
Por las razones mencionadas en la metodología (pruebas bioquímicas), sólo se realizó esta prueba al cultivo que creció de Agua, el cual resultó negativo a la detección de niacina, negativo a la reducción de nitratos y positivo a la actividad de catalasa, lo cual confirma la presencia de *M. fortuitum* y rechaza la presencia de *M. tuberculosis* en el agua del encierro de las Morrocoy (tabla 8, figura 22 y 23).

Tabla 8. Prueba Bioquímica - enzimática para confirmar o descartar presencia de *M. tuberculosis* en cultivo de Agua

Especie micobacteria	Detección de niacina	Reducción de nitratos	Actividad de catalasa	
			T° ambiente	68° C
<i>M. tuberculosis</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
Agua	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo

Fuente: Autora; Laboratorio Microbiología Universidad Nacional:2006.

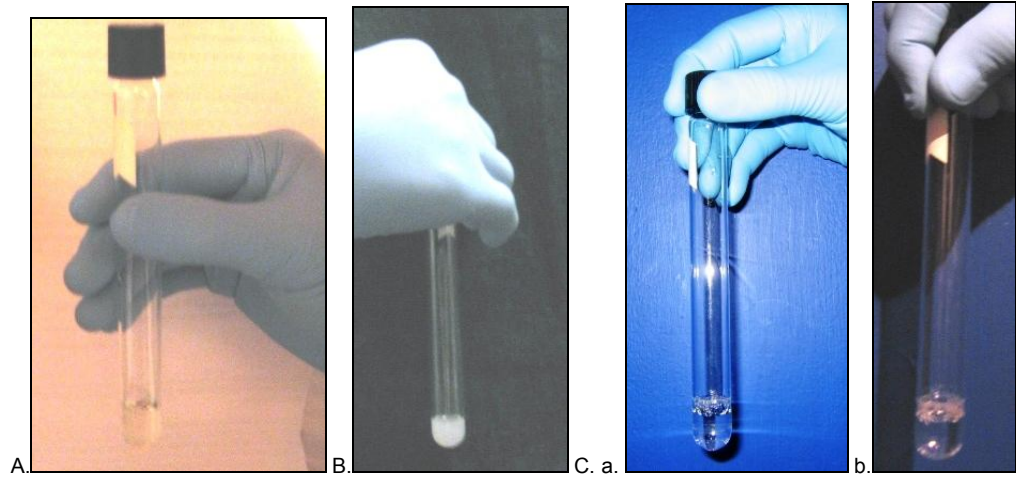
Figura 22. Prueba Bioquímica–enzimática en cepa control positivo (*M. tuberculosis*)



A: positivo a niacina (desarrollo de color amarillo); B: positivo a nitratos (desarrollo de color fucsia); C. a: positivo a catalasa a T° ambiente (formación burbujas en la superficie); b: negativo a 68°C (no formación de burbujas)

Fuente: Autora; Laboratorio Microbiología Universidad Nacional:2006.

Figura 23. Prueba Bioquímica – enzimática en cepa de (*M. fortuitum*), proveniente de la muestra de Agua



A: Negativo a niacina (sin desarrollo de color); B: negativo a nitratos (no desarrollo de color fucsia); C. a:positivo a T° ambiente (formación burbujas en la superficie); b: positivo a 68°C (formación de burbujas en la superficie)

Fuente: Autora; Laboratorio Microbiología Universidad Nacional:2006.

6. DISCUSIÓN

En esta investigación se buscó establecer si las Tortugas Morrocoy (*Geochelone carbonaria*), en el encierro actual de un Zoológico de la Sabana de Bogotá, portan microorganismos del género *Mycobacterium sp.*, por medio de la identificación y el aislamiento en muestras de materia fecal. Se obtuvo baciloscopias positivas con muy pocos BAAR en algunas tortugas, pero no se obtuvo crecimiento de bacterias en los medios de cultivo específicos para micobacterias de las muestras de MAF procesadas. Por esta razón, no se pudo llegar al aislamiento y posterior identificación molecular, lo que sugiere que algunas tortugas, posiblemente por su estado inmunológico, pueden desarrollar micobacterias (ambientales) en su organismo pero, debido a que no son huéspedes naturales, no presentan los cuadros clínicos, ni eliminación de la bacteria por materia fecal. Esto permite suponer de manera plausible que las tortugas pueden ser portadores sanos en determinado momento, sin presentar la enfermedad²⁵. A lo cual debe sumarse que estas tortugas, según Mader: 2006, hacen parte de las especies de reptiles más resistentes.

Para valorar, con base en los resultados obtenidos, la utilidad de las muestras de materia fecal de Morrocoy, es necesario tener en cuenta varios hechos:

²⁵ SOLDATI G, Z. H, Op. Cit., 388-397 pp.

- Los protocolos de manejo en nuestro estudio fueron adecuados ya que están estandarizados en los ámbitos nacional e internacional.
- No se encuentran estudios de este tipo realizados con tortugas y reptiles en general.
- En los estudios realizados con muestras de materia fecal de origen humano con frecuencia se encuentran micobacterias.

Estos aspectos permiten afirmar que las muestras de materia fecal de Morrocoy no son adecuadas para el cultivo de micobacterias, debido a la alta presencia de microorganismos de la flora normal (10^{11} microorganismos por gramo de materia fecal), que en este caso no son bacterias del género *Mycobacterium*, este hecho se conoce a nivel de laboratorio como “alta contaminación”, la cual puede inhibir en el crecimiento de las micobacterias. Debe destacarse, sin embargo, la facilidad de tomar la muestra que permite producir el menor estrés posible a las tortugas, con base en el conocimiento médico y biológico del animal²⁶.

Otro parámetro estudiado, que complementa el problema central de investigación, fue la respuesta de las tortugas Morrocoy a la tuberculinización con DPP de *M. avium*, cuyos resultados ya fueron descritos. Recuérdese que ninguna tortuga presentó dermorreacción positiva. La tuberculinización indica si hay presencia de células y mediadores bioquímicos que reaccionen a nivel local con un tipo de micobacteria determinada, pero este tipo de respuesta no siempre es específica. En el caso de las tortugas Morrocoy, a pesar de que están en contacto con las

²⁶ ECKERT, K. L., K. A. BJORN DAL, F. A. ABREU-GROBOIS Y M. DONNELLY (Editores). 2000 (Traducción al español). *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas*. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE. Publicación No. 4.

micobacterias, no resultaron positivas a la prueba. Sin embargo, no es posible afirmar de manera concluyente que no hayan tenido una infección previa, ya que esta prueba presenta falsos negativos²⁷. Por lo anterior, la prueba de tuberculinización no tiene el suficiente valor como herramienta diagnóstica de micobacteriosis, en tortugas Morrocoy. Adicionalmente, los resultados obtenidos no se pudieron comparar con los de otros estudios ya que no se ha publicado sobre el manejo de tuberculina intradérmica en reptiles, específicamente en tortugas.

Con respecto a la baciloscopia, sólo 4 muestras fueron positivas con menos de 5 bacilos, lo cual está también en relación con la contaminación de las muestras. Esto refuerza la idea de que la alta contaminación (reacuérdesse su significado) de las muestras y los cultivos pueden inhibir el crecimiento de las micobacterias, (Comunicación personal, Martha Murcia, Directora del Departamento de Microbiología de la Universidad Nacional).

En la baciloscopia y el crecimiento de muestras ambientales (tierra y agua), aquellas muestras que resultaron positivas tuvieron también crecimiento positivo en los medios de cultivo específicos para micobacterias, excepto la muestra de tierra del encierro de las loras (*Amazona sp.*). Esto sugiere que la baciloscopia negativa no descarta definitivamente la presencia de alguna micobacteria, ni una baciloscopia positiva confirma un caso tuberculoso.²⁸ Antes de hacer referencia a la Identificación molecular se hará mención del caso que se presentó en una

²⁷ VADILLO S, Op. cit.

²⁸ VADILLO S, IBID.

población de Tortugas Ico teas (*Trachemys scripta spp.*). Se procesaron muestras de tejido, orina, y absceso de plastrón, con el fin comparar en el laboratorio el comportamiento de las muestras con las ya mencionadas, y establecer si la materia fecal de tortugas puede recomendarse para este tipo de procesos microbiológicos que permiten confirmar la presencia de alguna micobacteria. Nuevamente se llegó a la conclusión que la MAF de Tortugas Morrocoy es poco apropiada para la identificación de micobacterias debido a su alta presencia de flora bacteriana normal diferente a las micobacterias.

En muestras de tejido de los reptiles acuáticos es frecuente encontrar *Pseudomonas aeruginosa*, a nivel sistémico o localizado en lesiones granulomatosas, acompañada de *Klebsiella sp.* y *Mycobacterium chelonae*, principalmente²⁹. Se quería saber si las lesiones granulomatosas en el plastrón eran causadas sólo por la *Pseudomonas* o existía actividad sinérgica con otro tipo de bacteria, en este caso con una micobacteria. Al sembrar las muestras de tejido (hígado, pulmón, bazo y riñón), orina y absceso, se obtuvo crecimiento sólo en la muestra procesada de absceso, lo cual coincide con estudios realizados en tortugas marinas en las cuales identificaron *M. chelonae* en muestras de líquido sinovial de lesiones abscedativas de articulaciones.³⁰ En cuanto a la baciloscopía, la única muestra positiva fue la del absceso con un alto número de bacilos y sin ningún grado de contaminación, a pesar de que era una muestra con más

²⁹ MADER, Reptile Medicine and Surgery .second edition, ed. Saunders elsevier, Canada 2006.

³⁰ LEAH L. GREER;, Op. cit., 736-741 pp.

microorganismos, por tratarse de un absceso. Como se dijo anteriormente fue la única muestra que creció; por consiguiente, ayuda a comprender el hecho por el cual no crecieron aquellas muestras de MAF de Morrocoy que fueron positivas a baciloscopia.

Con respecto al análisis molecular del resto de muestras, excepto las de MAF de Morrocoy, se identificó *Mycobacterium gordonae* tipo 3 en la muestra de absceso, la cual no se ha reportado en Tortugas Icoteas. Teniendo en cuenta que esta bacteria no tuberculosa tuvo la capacidad de producir lesiones granulomatosas en plastrón, sin manejo clínico posiblemente hubiera causado septicemia e, incluso, la muerte del animal³¹. La micobacteria señalada se considera parte del grupo de las crecedoras lentas y cromógena³². En el estudio presentó un tiempo de crecimiento de 12 semanas y colonias de color naranja, lo cual confirma este concepto.

Todo lo anterior debe contrastarse con el hecho de que se encuentra un solo estudio retrospectivo realizado por Jonson (descrito en Mader. Reptile zoonoses and treaths to public health, pp. 1023): en 90 reptiles se detectó micobacteria en un 15,6% por Baciloscopia y un 25,6% con PCR.

En el caso de las micobacterias ambientales, se identificó la micobacteria *Mycobacterium avium tipo3* en muestras de tierra. Esta bacteria se ha encontrado en varios estudios de suelo, principalmente en Clínicas humanas y en los

³¹ BROWNSTEIN, D. G. 1978. Reptilian mycobacteriosis. In Mycobacterial infections in zoo animals, R. Montali (ed.). Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., 265-268 pp.

³² N. RASTOGI, The mycobacteria: an intrduction to nomenclature and pathogenesis, Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 2001, 20(1), 21-54 pp.

alrededores de las viviendas de pacientes con SIDA³³. Este hallazgo es de gran importancia desde el punto de vista epidemiológico ya que esta bacteria puede causar lesiones granulomatosas en cualquier mamífero, incluyendo al ser humano, dependiendo de su estado inmunológico. Así mismo, puede causar lesiones granulomatosas y cuadros septicémicos en reptiles, tuberculosis aviar en las aves. En consecuencia, el hallazgo de esta micobacteria en tierra del encierro de las tortugas Morrocoy y los otros encierros cercanos, dentro y fuera del complejo, resalta la importancia del control y vigilancia dentro del Zoológico. Esta micobacteria se clasifica como crecedora lenta (N. Rastogi: 2001) y, en efecto, en el estudio el tiempo de crecimiento fue de 9 semanas. Por otra parte, según la teoría, las colonias de este tipo de micobacterias pueden ser cromógenas o no serlo³⁴. En el estudio se obtuvieron colonias no cromógenas.

En la muestra de agua se obtuvo *Mycobacterium fortuitum tipo 1*, la cual se ha encontrado en lesiones granulomatosas de tortugas marinas y en muestras de agua, al igual que el *M. chelonae*³⁵. Esta micobacteria se considera crecedora rápida, de máximo 30 días³⁶; en el estudio se obtuvo un crecimiento de 3 semanas.

El hecho de haber encontrado micobacterias ambientales, sugiere que además del manejo médico y biológico de este encierro, se requiere la aplicación continua de

³³ M. David, Mycobacterium avium complex in Water, food and soil samples collected from the environment of HIV-Infected individuals: Journal of Acquired Deficiency syndromes and human retrovirology, New York, 9:176-182 pp.

³⁴ VADILLO S, Op. Cit.

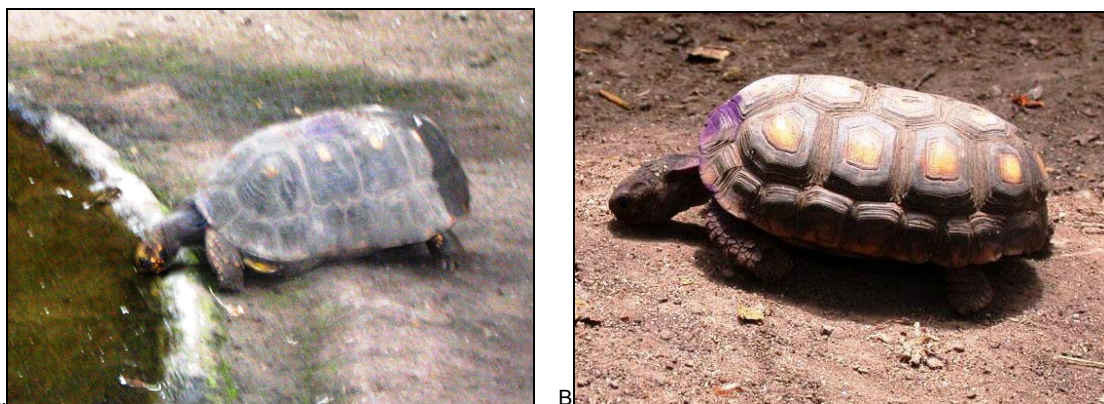
³⁵ PARASHAR DEEPTI; Optimization of procedures for isolation of Mycobacteria from soil and water samples obtained in Northern India; Applied an environmental microbiology, JUNE 2004, Vol 7, No6, pp. 3751-3753.

³⁶ A. LORETTA; Growth characteristics of atypical Mycobacteria in Water and their comparative resistance to disinfectants. Applied and environmental microbiology, Dec 1978,; Vol 36, No 6, pp. 839-846.

métodos diagnósticos para identificar la infección y/o la enfermedad, eliminación de las micobacterias ambientales y controlar el contacto directo que tienen las tortugas Morrocoy con las micobacterias ambientales, como se observa en la Figura 24. En consecuencia, se debe evitar que estos animales sigan siendo parte de un ciclo epidemiológico de transmisión como portadores sanos. Adicionalmente cabe resaltar que aves y mamíferos, silvestres o domésticos, no deben entrar en contacto con las Tortugas Morrocoy, ni con este encierro, ya que podría ponerse en riesgo la vida de los mismos. El contacto con humanos debe darse sólo cuando sea estrictamente necesario y aplicando todas las medidas de bioseguridad.

NOTA: Para comparar los resultados obtenidos en cuanto a crecimiento e identificación molecular por PRA con lo que ya está reportado, ver las figuras 25 y 26 respectivamente.

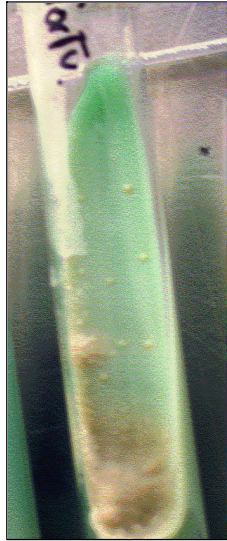
Figura 24. Contacto de Tortugas Morrocoy (*Geochelone carbonaria*) con micobacterias ambientales



A: Tortuga Morrocoy (*Geochelone carbonaria*) adulta, tomando agua de la poseta de donde se identificó *M. fortuitum* tipo 1; B: Tortuga Morrocoy juvenil, comiendo tierra del encierro, esta es la tortuga que coincidentalmente obtuvo el mayor número de BAAR en la baciloscopia.

Fuente: Autora; ZSB:2005.

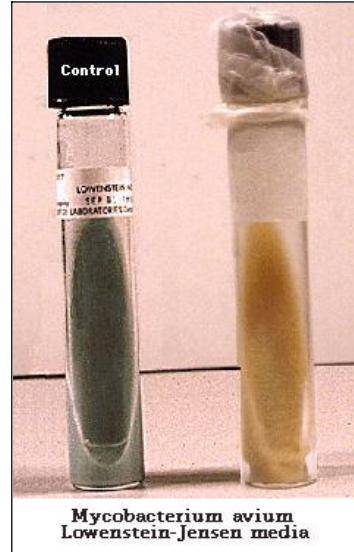
Figura 25. Comparación del crecimiento con lo reportado.



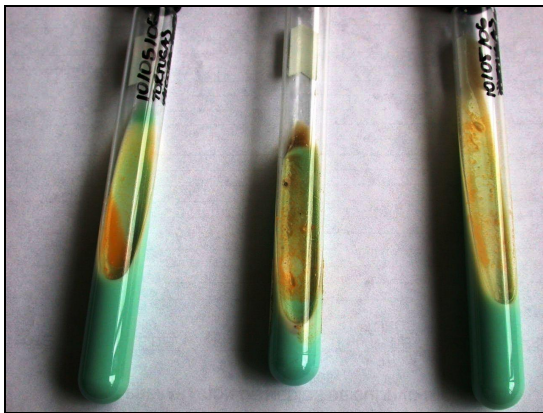
Mycobacterium avium
tipo 3 en medio OK

A.

Fuente: Autora, 2006



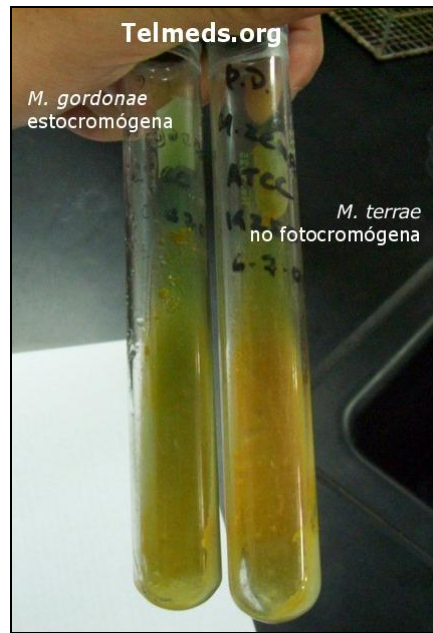
Fuente: telmeds.org/.../mycobacterias_nocardia.htm



Mycobacterium gordonae tipo 3
en medio OK

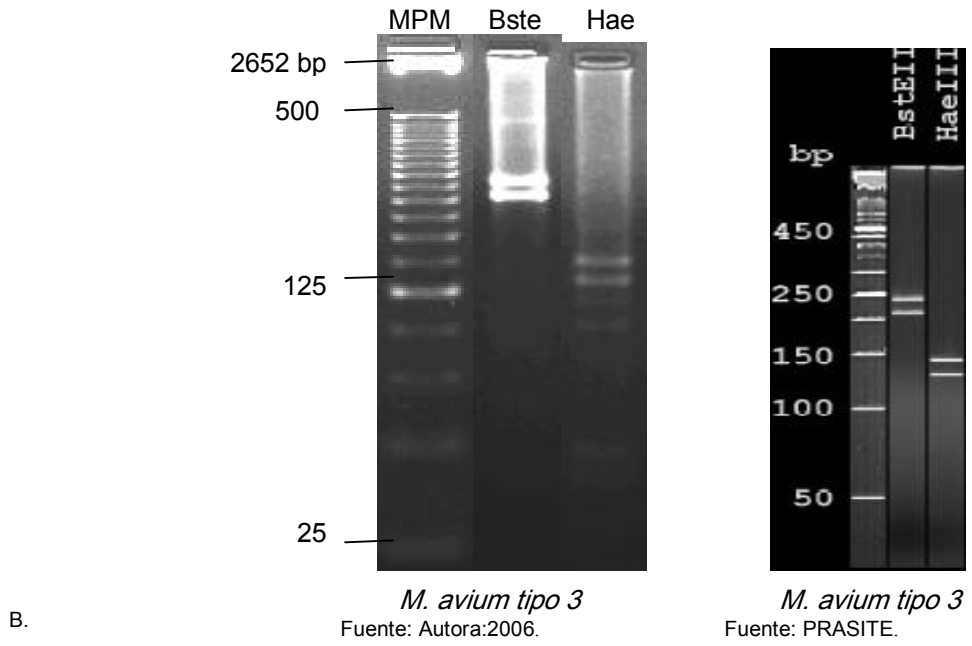
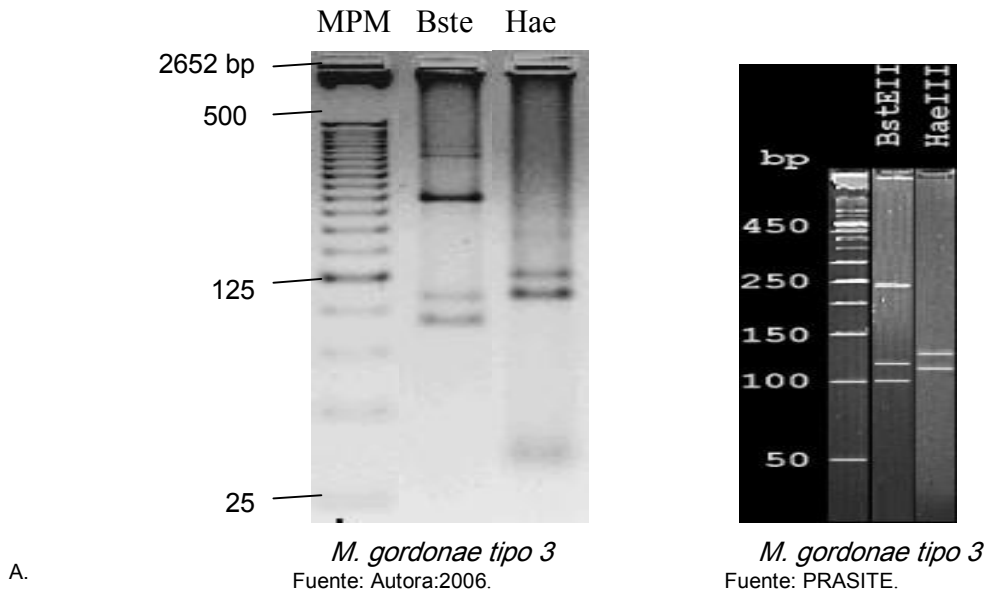
B.

Fuente: Autora, 2006

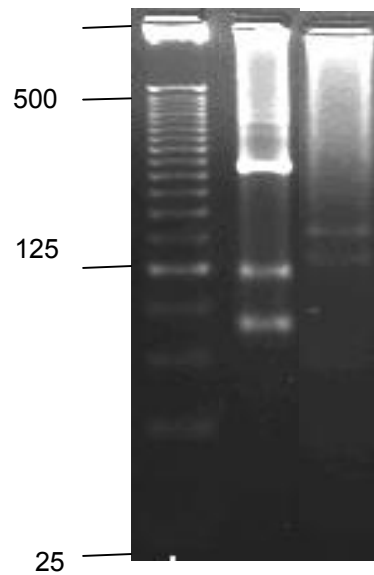


Fuente: telmeds.org/.../mycobacterias_nocardia.htm

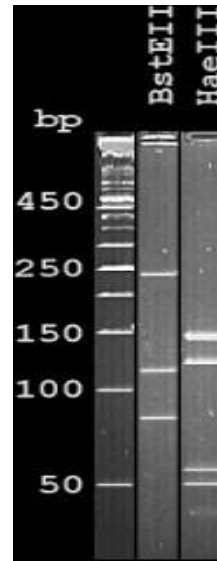
Figura 26. Comparación de identificación por PRA con lo reportado.



2652 bp MPM Bste Hae



M. fortuitum tipo 1
Fuente: Autora:2006.



M. fortuitum tipo 1
Fuente: PRASITE.

C.

6.1. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Cabe destacar las siguientes limitaciones:

- Como era de esperar las MAF contenían una diversidad de bacterias, como parte de su flora normal. Pese a seguir de manera adecuada los protocolos de manejo y procesamiento para decontaminar las muestras y los cultivos, esto no siempre se logró y los cultivos mantuvieron un alto grado de contaminación (recuérdese que es el término de laboratorio, que se refiere a aquellas muestras que tienen un alta presencia de microorganismo diferentes a lo que se espera, en este caso las micobacterias) (Figura 27). Por esta razón, en algunos casos fue necesario tomar nuevamente muestras.

- No se pudieron tomar muestras periódicas, debido a los costos y al estrés que se provocaría a los animales. Este hecho no permite identificar la dinámica de las micobacterias en las Tortugas y además genera dificultades de interpretación, ya que el momento del muestreo puede coincidir con ausencia de eliminación de la micobacteria, en el caso de animales que estén infectados.

- No fue posible identificar reservorios de las micobacterias encontradas en las tortugas Morrocoy. Los resultados muestran que hay micobacterias circulando entre los animales y el medio ambiente y otro estudio encontró micobacterias circulando en aves que alguna vez habitaron el encierro; por lo tanto, sólo cabe sugerir que las tortugas podrían hacer parte de esta cadena de transmisión.

Figura 27. Alta presencia de microorganismos diferentes a micobacterias en medios de cultivo con muestras de MAF.



Cultivos de MAF “contaminados” a la primera semana de cultivo
Fuente: Autora; Laboratorio Microbiología Universidad Nacional:2005.

7. CONCLUSIONES

No se identificó *Mycobacterium sp.* en Tortugas Morrocoy, a partir de muestras de MAF, debido a que no hubo crecimiento en los medios de cultivo.

Sólo se detectó micobacterias en la prueba de baciloscopia en 4 Tortugas Morrocoy.

En las muestras medio ambientales (Agua y suelo), se identificó la presencia de *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium avium*, lo que indica que las Tortugas Morrocoy están en contacto con las micobacterias; pero sólo 4 se encontraron infectadas.

Las muestras de MAF de Tortugas Morrocoy no son recomendables para la identificación de *Mycobacterium sp.*, debido a su alto grado de contaminación, y esta condición inhibe el crecimiento de las micobacterias.

Se obtuvo una respuesta negativa a la tuberculinización por parte de las Tortugas Morrocoy, esto no indica que sean negativas a tuberculosis por *M. avium*.

Se aisló la *Pseudomonas sp.* en las muestras de la Tortuga Icotea, también se identificó *M. gordonae tipo 3*, lo cual sugiere un control y seguimiento de los animales que habitan en el encierro de las Icoteas.

Los hallazgos encontrados sugieren un manejo que incluya, vigilancia constante, ya que se debe evitar que las Tortugas Morrocoy, sigan siendo parte de un ciclo epidemiológico de transmisión como portadores sanos.

Aves, mamíferos (silvestres o domésticos) y reptiles no deben entrar en contacto con las Tortugas Morrocoy ni con el encierro de las mismas, ya que podrían ponerse en riesgo las vidas de los mismos.

El contacto con los humanos debe ser sólo cuando sea estrictamente necesario y aplicando normas de bioseguridad.

8. RECOMENDACIONES

- Continuar con el seguimiento médico (evaluación clínica periódica, exámenes de laboratorio etc.), de los animales que habitan en este encierro, en este caso las tortugas Morrocoy (*Geochelone carbonaria*), Titi gris (*Saguinus leucopus*), Titi cabeciblanco (*Saguinus oedipus*) y Mono nocturno (*Aotus sp.*).
- Continuar con el seguimiento del suelo y del agua del encierro y de otras partes del zoológico y realizar identificación de micobacterias en el alimento suministrado a los animales que habitan el encierro.
- No incluir animales en el encierro, especialmente aves y mamíferos ya que pueden infectarse o desarrollar patologías importantes por micobacterias, por estar en contacto directo con el medio ambiente contaminado.
- Realizar un seguimiento médico a los trabajadores y personal que se encuentran en contacto directo con los animales y con el encierro para tener un mayor control epidemiológico, y proporcionar mayor seguridad de trabajo para las personas.
- Realizar identificación molecular de micobacterias en los primates mencionados en la primera recomendación con el fin de establecer la presencia o no de alguna micobacteria que puede poner en riesgo la vida de los animales y/o convertirse en un problema de salud pública mayor. En caso de llegar a ser positivos se recomienda el tratamiento con un debido antibiograma, y en caso de que el tratamiento fracase se recomienda el sacrificio. En el caso de resultar negativos, evaluar la posibilidad de

sacarlos del encierro para disminuir el riesgo epidemiológico, ya que se trata de una especie endémica en vía de extinción.

- Implementar un programa de vigilancia epidemiológica, no solo en el encierro sino en todo el zoológico ya que se identificaron micobacterias en encierros distintos al del estudio, con el fin de proporcionar una mejor calidad de vida a los animales y brindar seguridad al personal, trabajadores y visitantes.
- Realizar control y seguimiento de los animales que habitan en el encierro de las Tortugas Icoateas, incluyendo especialmente todas las tortugas que se encuentran en el mismo.
- Continuar con la capacitación y actualización periódica a los trabajadores sobre el manejo y las normas de bioseguridad que se deben seguir con este tipo de animales y encierros.
- Continuar con estudios epidemiológicos más a fondo de las micobacterias en este encierro, en caso de los mamíferos y los alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

A. LORETTA; Growth characteristics of atypical Mycobacteria in Water and their comparative resistance to disinfectants. *Applied and environmental microbiology*, Dec 1978,; Vol 36, No 6. 839-846 pp.

BIOMÉDICA, Tuberculosis Bogotá DC: Revista del Instituto Nacional de Salud volumen 24, suplemento No 1; junio 2004.

BOTERO David; Enfermedades Infecciosas, corporación para investigaciones Biológicas, 3ra edición, Medellín Colombia, 1985.

BROCK, J. A., R. M. NAKAMURA, A. Y. MIYAHARA, AND E. M. L. CHANG; Tuberculosis in Pacific green sea turtles, *Chelonia mydas*. *Transactions of the American Fisheries Society* 197. 6105: 564–566 pp.

BROOKS, Geo F., *Microbiología Médica*, 18 ed. Méjico: Manual Moderno, 2004.

BROWNSTEIN, D. G. Reptilian mycobacteriosis. *In Mycobacterial infections in zoo animals*, R. Montali (ed.). Smithsonian Institution Press, Washington. 1978, 265–268 pp.

COLE S T. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology* 2002; 148: 2919-28 pp.

DEEPTI PARASHAR; Optimization of procedures for isolation of Mycobacteria from soil and water samples obtained in Northern India; *Applied environmental microbiology*, June 2004, Vol 7, No6. 3751-3753 pp.

ECKERT, K. L., K. A. BJORN DAL, F. A. Abreu-Grobois y M. Donnelly (Editores). 2000 (Traducción al español). *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas*. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No. 4.

FORDHAM C. Isolation of *Mycobacterium avium* complex from water in the United States, Finland, and Kenya, *Journal of clinical Microbiology*, Vol 31, No 12, Dec 1993, 3227-3230 pp.

FOWLER MILLER, *Zoo and Wild animal medicine*, morris animal foundation, current therapy 4. 1999, chapter 21.

GARZÓN María Consuelo, *Bacteriología del Mycobacterium tuberculosis y de micobacterias no tuberculosas*, manual de procedimientos; Instituto Nacional de Salud, Bogotá 2001.

GRIFFITH D.E, Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. American Review of Respiratory Disease. May; 147(5):1271-8; 1993.

HEIFETS L. Mycobacterial infections other than tuberculosis and leprosy (Infections caused by nontuberculous Mycobacteria-NTM). Sem Resp Crit Care Med 2004; 25 283-96 pp.

IDEAM, instituto de hidrología, meteorología y estudios ambientales.

JOHNSON. Reptile zoonoses and threats to public health. In: MADER, Reptile Medicine and Surgery .second edition, ed. Saunders elsevier, Canada 2006.

Laboratorio microbiología Universidad Nacional. Micobacterias.

LEAH L. GREER, Journal of Wildlife Diseases, Wildlife Disease Association. 39(3), 2003, 736–741 pp.

MADER, Reptile Medicine and Surgery .second edition, ed. Saunders elsevier, Canada 2006.

MURCIA Martha Isabel; Distribución de patrones PRA en aislamientos clínicos del complejo *Mycobacterium avium* procedentes de España y Suramérica; Biomédica 2004;24(supl):60-4.

MURRAY Patrick, Microbiología Médica, 5 ed. Madrid:Elsevier Mosby, 2006.

M. David, Mycobacterium avium complex in Water, food and soil samples collected from the environment of HIV-Infected individuals: Journal of Acquired Deficiency syndromes and human retrovirology New York, 9:176-182 pp.

RASTOGI N. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis, Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 2001, 20(1), 21-54 pp.

SOLDATI G, Z. H. Detection of Mycobacteria and Chlamydiae in Granulomatous Inflammation of Reptiles: A Retrospective Study. Veterinary Pathology 2004, 41:388-397 pp.

TELENI Amalio, Rapid identification of Mycobacteria to the species level by polymerase Chain reaction and restriction enzyme analysis, journal of clinical microbiology, feb 1993 vol 31 No 2.

THOMPSON PJ, SEALS, Seal trainers and mycobacterial infection 1993.

THOEN CO, Tuberculosis, tuberculoidoses, and other mycobacterial infeccctions 1994.

VADILLO S. Manual de microbiología, Madrid: Mc graw hill interamericana, capitulo 37 2002.

WALLACH JOEL. Diseases of exotic animals, medical and surgical management. Philadelphia: WB saunders company 1983, 1011 p.

ZOOLÓGICO JAIME DUQUE, tocancipá Cundinamarca, Necropsias 2002-2003, Laboratorio de Histopatología Universidad de la Salle.

<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>

BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

BALLARD BONNIE, Exotic animal medicine for the veterinary technician. Iowa-USA: Blackwell publishing; 2003. 129-133 pp.

COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD. Resolución 008430 de 1993 sobre Normas Científicas Técnicas y Administrativas para la Investigación en Salud.

DORNALD. Diccionario Medico. 24^a Edición. New York: McGraw-Hill interamericana; 1993.

RICHARD K. HOOP, etiological agents of mycobacterioses in pet birds between 1986 and 1995. journal of clinical microbiology, vol. 34, no. 4. apr. 1996, 991–992 pp.

LEAO CARDOSO Sylvia, Identification of Two Novel *Mycobacterium avium* Allelic Variants in Pig and Human Isolates from Brazil by PCR-Restriction Enzyme Analysis. journal of clinical microbiology, vol. 37, No. 8. Aug. 1999, 2592–2597 pp.

LENNETTE, BALOWS. Manual de Microbiología Clínica. Buenos Aires: Panamericana; 1993.

MANDELL G. Enfermedades infecciosas, 1998, versión CD-Room.

PARÉ JEAN. Microbiology; fungi and bacterial diseases of reptiles In MADER. Reptile medicine and surgery. Canada: Saunders elsevier; 2006. 233-255 and 1023 pp.

ORTEGON LUIS HERNANDO, Manual teórico práctico de microbiología, universidad de la salle, 14-19 pp.

RUEDA JORGE, VARGAS LIUS CARLOS, instituto nacional de salud, red nacional de laboratorios, grupo de micobacterias. Bogotá Colombia 1990.

STITES DANIEL. Inmunología Básica y Clínica, Mexico: manual moderno, 1993.

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.bacterio.cict.fr

ANEXOS

ANEXO 1:

MICROSCOPIA DIRECTA³⁷:

Materiales

- frotis de materia fecal de cada tortuga (seco)
- reactivos de la tinción de Ziehl-Neelsen (Fuscina fenicada de ZN)
- solución decolorante
- solución contraste (azul de metileno)
- microscopio
- láminas portaobjetos
- reloj
- marcador permanente
- mechero
- aceite de inmersión

Metodología:

- Elaborar el frotis a partir de materia fecal u otra muestra, rotando el hisopo.
- Secar la lámina al ambiente y fijarla al calor por medio de flameo.
- Inundar el frotis con fuscina durante 10 minutos. (vapores)
- Enjuagar con agua
- Decolorar con la solución decolorante (Alcohol ácido) aprox 1 minuto
- Lavar con agua de la llave

³⁷ Vadillo S, Op. cit.

- Agregar solución contraste durante 30 segundos
- Lavar con agua corriente
- Secar al ambiente
- observar con inmersión (los organismos AAR se tiñen de rojo).

ANEXO 2:

PROCESAMIENTO Y CULTIVO DE LAS MUESTRAS³⁸

a. Coprocultivo:

Materiales:

- materia fecal en recipiente plástico con taparrosca
- tubo plástico taparrosca (capacidad de 50ml), que contenga 5 ml de medio de cultivo Dubos albúmina.
- NaOH al 2%
- Agitador serológico
- Agua destilada estéril
- Centrífuga refrigerada
- Rojo fenol
- HCL 2N
- Pipeta estéril
- Frascos con medio bifásico Ogawa-Kudoh/ Sauton Tween albúmina modificado (OK/MSTA)

³⁸ Laboratorio microbiología Universidad Nacional y Rapid identification of Mycobacteria to the species level by polymerase Chain reaction and restriction enzyme análisis, journal of clinical microbiology, feb 1993 vol 31 No 2.

- Tubos con medios Ogawa_Kudoh (OK)

- Ziehl-Neelsen

-Ácido sulfúrico 10%

Metodología:

Coloque 0,2 gr de materia fecal en un tubo plástico taparrosca, con capacidad de 50 ml que contenga 5 ml de medio de cultivo líquido Dubos albúmina.

- Mezcle vigorosamente durante 2 minutos.

- Deje en reposo a temperatura ambiente de 12 a 18 horas.

- Adicione 5 ml de NaOH al 2%.

- Mezcle vigorosamente durante 2 minutos.

- Rote en un agitador serológico por 15 minutos a temperatura ambiente.

- Agregue agua destilada estéril hasta completar 50 ml.

- Mezcle por inversión varias veces.

- Centrifugue a 3500 revoluciones por 30 minutos en centrífuga refrigerada.

- Descarte el sobrenadante sobre un recipiente con desinfectante.

- Limpie el borde del tubo con una gasa humedecida con hipoclorito de sodio al 2,5%.

- Agregue al sedimento 1 gota de rojo fenol como indicador a una concentración de 0,008mg/ml.

- Mezcle

- Neutralice gota a gota con HCL 2N, hasta que el indicador vire a amarillo.

- Resuspenda el sedimento en 1 ml de solución salina estéril o agua destilada estéril fresca.

- Mezcle vigorosamente durante 30 segundos.
- Siempre con pipeta estéril 0,2ml de sedimento decontaminado, en cada uno de los frascos de medio bifásico Ogawa-Kudoh/Sauton Tween albúmina modificado (OK/MSTA) y en dos tubos de medio OK.
- Incube los frascos de medio bifásico a 37°C en posición horizontal con un mínimo e inclinación.
- Lea los cultivos a la primera semana, ajuste las tapas y cambie los frascos del medio bifásico a posición vertical.
- En caso de presentar crecimiento, realice coloración de ZN. Si observa contaminación descarte, de lo contrario continúe la incubación.
- Lea nuevamente los cultivos a la cuarta, octava y duodécima semana según la escala semicuantitativa.
- En caso de presentar crecimiento, realice coloración de ZN para verificar la pureza del cultivo.
- Si el cultivo es puro, identifique e informe.
- Si no es puro, decontamine por el método de ácido sulfúrico al 10% y siembre nuevamente.
- Si al cabo de la duodécima semana no se observa crecimiento, descarte e informe.

b. Biopsia/ Muestra de Tejido post necropsia

Metodología:

Biopsias contaminadas:

- Coloque la biopsia en un homogenizador de tejidos o en su defecto en un mortero.
- Homogenice o macere completamente con solución salina o agua destilada estéril en la que viene la biopsia, hasta obtener una suspensión homogénea libre de partículas gruesas, agregue de 1 a 2 ml más de agua o solución salina estéril.
- Transvase a un tubo estéril de tapa rosca
- Agregue igual cantidad de Fosfato Trisódico FTS al 10% por 2 horas
- Centrifugue a 3.500 rpm durante 30 min en centrífuga refrigerada.
- Descarte el sobrenadante conservando un volumen final de 2 ml.
- Homogenice el sedimento
- Descontamine y siembre por el método del escobillón de Kudoh (Ver anexo 6).
- Haga baciloscopia con el sedimento sobrante.
- Siembre con una pipeta estéril, colocando 0,2ml del sedimento en los dos tubos de medio OK.
- Incube los tubos a 37°C con las tapas sin ajustar en posición horizontal con un mínimo de inclinación.
- Lea los cultivos a la primera semana; observe la presencia o no de contaminación y ajuste las tapas.
- Lea los cultivos a la cuarta, octava y duodécima semana según la escala semicuantitativa.
- En caso de presentar crecimiento, realice una coloración de ZN para verificar la pureza del cultivo.
- Si el cultivo es puro, identifique e informe.

- Si el cultivo no es puro, descontamine por el método de ácido sulfúrico al 10% y siembre nuevamente.
- Si al cabo de la duodécima semana no se observa crecimiento, descarte e informe.

c. Urocultivo:

Metodología:

- Mezcle la totalidad de la muestra
- Coloque máximo 30 ml de la muestra en un tubo plástico de centrifuga, taparroscas, con una capacidad de 50 ml.
- Descontamine agregando 10 ml de FTS al 20% (proporción 3:1)
- Mezcle
- Deje en reposo mínimo 2 horas y máximo 24 horas, a temperatura ambiente.
- Centrifugue a 3.500 rpm durante 30 min en centrifuga refrigerada.
- Descarte el sobrenadante
- Homogenice el sedimento.
- Impregne con el sedimento la totalidad del algodón de un escobillón estéril.
- Decontamine por el método de escobillón de Kudoh (Ver anexo 6)
- Siembre en dos tubos de medio OK.
- Incube los tubos a 37°C con las tapas sin ajustar, en posición horizontal, con un mínimo de inclinación.
- Lea los cultivos a la primera semana; observe la presencia o no de contaminación y ajuste las tapas.

- Lea los cultivos a la cuarta, octava y duodécima semana según la escala semicuantitativa.
- En caso de presentar crecimiento, realice una coloración de ZN para verificar la pureza del cultivo.
- Si el cultivo es puro, identifique e informe.
- Si el cultivo no es puro, descontamine por el método de ácido sulfúrico al 10% y siembre nuevamente.
- Si al cabo de la duodécima semana no se observa crecimiento, descarte e informe.

EN ORINA NO SE REALIZA BACILOSCOPIA POR SU BAJA ESPECIFICIDAD

d. Cultivo de Suelo:³⁹

Procedimiento:

- Colocar 0,5 gr de tierra en 3,75 ml de agua destilada estéril.
- Añadir a un tubo que contenga 1,25 ml de Verde malaquita al 0,2% más 5ml de NaOH al 2%.
- Incubar durante 15 minutos a 37°C.
- Resuspender en 5ml de ácido oxálico al 5% o NaOH al 2%
- Lavar
- Suspender en 1ml de agua destilada esteril.
- Sembrar 0,2ml en un tubo con medio de cultivo sólido Lowenstein-Jensen. (LJ).
- Incubar a 37°C. y observar diariamente hasta máximo 8 semanas.

³⁹ M. David, Op. cit., 176-182 pp.

e. Cultivo de Agua.⁴⁰

Procedimiento:

- Colocar 25ml de la muestra en un tubo de centrifuga de 50 ml de capacidad.
- Centrifugar a 5000 rpm durante 30 minutos a 22°C.
- Descartar sobrenadante.
- Suspender sedimento en 1ml de agua destilada estéril
- Mezclar en Vortex.
- Pipetear 0,1ml y sembrar en 3 tubos de medio de cultivo sólido (LJ u OK).
- Incubar a 37°C.
- Observar diariamente por 60 días
- Si es negativo al crecimiento, realizar ZN y si es negativo descartar el cultivo y reportarlo como negativo.

NOTA: Debido a que con este procedimiento los cultivos se contaminaron demasiado se procedió a realizar decontaminación con NaOH al 4% (5ml) + Ceftriaxona al 2% (2ml) luego de descartar el sobrenadante con las nuevas muestras tomadas.

ANEXO 3:

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR⁴¹

⁴⁰ FORDHAM C. Isolation of *Mycobacterium avium* complex from water in the United States, Finland, and Kenya, Journal of clinical Microbiology, Vol 31, No 12, Dec 1993, p.3227-3230.

⁴¹ Rapid identification of Mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis, Journal of clinical microbiology, Feb 1993 vol 31 No 2 and <http://app.chuv.ch/prasite/index.html>.

Materiales y equipos:

- medio sólido de cultivo (Lowenstein-jensen) ó agar 7H10 ó el hincado en cada caso.
- TE (10ml de Tris + 1ml de EDTA, PH 8)
- Centrifuga de 13.000 rpm
- Microcentrifuga Eppendorf
- Tubos de amplificación para PCR
- Aparato Mickle
- PRA (tubos amplificadores para la restricción enzimática)
- Iniciadores: tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT) Y Tb12 (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT)
- Gel buffer de lectura (0,25% bromofenol, 40% sucrosa, agua)
- Termociclador (I Cycler, Bio-Rad®)
- Bandejas para preparación de geles (Bio-Rad®)
- Cámaras de electroforesis horizontales (Bio-Rad® Maxicell)
- Cámara de flujo laminar Tipo IIB (Labconco)
- Documentador de geles (Syngene)
- Fuente de poder (Bio-Rad®)
- Micropipetas (Bio-Rad®)
- Incubadora 37°C (Presision scientific)
- Microscopio (Nikon)
- Congelador Revco
- Papel parafilm

- Gel para electroforesis (Seakem®, Cambrex BIO science)
- Agarosa de bajo punto de fusión (Cambrex BIO science)
- Bromuro de etidio

Metodología:

Preparación de la muestra:

- Del cultivo que creció se toma con un asa, parte de las colonias y se suspenden en TE y se inactivan a 80°C por 10 minutos
- centrifugar a 13.000 rpm durante 15 minutos.
- Eliminar sobrenadante y el sedimento se suspende en TE
- Colocarlo en la máquina de Mickle durante 2 minutos para desintegrar las células.
- Centrifugar para separar ADN (sobrenadante)
- Transferir sobrenadante a un nuevo tubo (lisado).

Amplificación:

- Adicionar 5 µl de lisado a cada tubo de reacción
- Alistar la composición "PCR (mezcla)" que contiene: 50mM de KCL + 10mM de Tris-HCL (PH 8,3) + 1,5mM MgCl₂ + 200µM glicerol 10% + trifosfato deoxinucleósido (50 µM) + 1,25 U de polimerasa Taq.
- La reacción se realiza a 45 ciclos de amplificación (1 min a 94°C, luego por 1 min a 60°C y luego por 1 min a 72°C) "En termociclador"
- Seguido por 10 min. De extensión a 72°C

- Se trabajan con 2 Iniciadores Tb11 y Tb12, amplificados a 439 bp (pares bases), con una posición entre fragmentos de 398 836 en la secuencia genética.

Análisis de la restricción enzimática (PRA):

- 10 μ L del producto de la amplificación de PCR son añadidos directamente a una mezcla que contenga 0,5 μ L de enzima (BstII) + 2,5 μ L de solución buffer de restricción correspondiente + 11,5 μ L de agua.
- Incubar por 60 min a 60°C
- Realizar el mismo procedimiento pero con la enzima (HaeIII) e incubar a 37°C por 60 min.

NOTA: Las enzimas y soluciones buffer ya están estandarizadas.

Evaluación de patrones de restricción:

- Adicionar 4 μ L de gel buffer de lectura a los 10 μ L de la mezcla del procedimiento anterior.
- Leer los fragmentos que se visualizan por medio de coloración con bromuro de etidio y luz ultra violeta.
- Para la interpretación de PRA se ha diseñado un programa en Excel, Microsoft para convertir la distancia de electroforesis (mm) en patrones de tamaño molecular (se hace con ayuda del algoritmos) que representan un dendograma.
- Identificar género y especie de micobacteria según su tamaño molecular.
- Anotar resultados.

ANEXO 4:

PRUEBA DE TUBERCULINA⁴²

Materiales:

- tuberculina PPD (derivado proteico purificado de *M. avium*)
- cutímetro.

Metodología:

- realizar inoculaciones intradérmicas a nivel del cuello, extremidad o pliegue de la cola.
- Observar si hay un incremento considerable en el tamaño de la piel (medición) a las 24 y 48 horas.
- Anotar resultado.

ANEXO 5:

IDENTIFICACIÓN DE *M. TUBERCULOSIS*.⁴³

⁴² Vadillo S, Op. Cit.

⁴³GARZÓN MARIA CONSUELO, Bacteriología del Mycobacterium tuberculosis y de micobacterias no tuberculosas, manual de procedimientos; Instituto Nacional de Salud, Bogotá 2001.

Para la identificación de *M. tuberculosis* se debe realizar la detección de niacina, la reducción de nitratos y la actividad de catalasas, con el fin de identificarlo correctamente.

a. Detección de Niacina:

Todas las micobacterias producen niacina, la cual la reutilizan en las reacciones de oxido-reducción durante la síntesis metabólica.

La prueba se fundamenta con la formación de cloruro de cianógeno por la reacción de cloramina T y tiocianato de potasio en presencia de ácido cítrico. El cloruro de cianógeno rompe el anillo de piridina de la niacina, formando un aldehído gammacarboxiglutámico que se une con la amina aromática (NA-PAS) produciendo un color amarillo.

a.1. Procedimiento:

- Adicione 1,5 ml de agua destilada estéril al cultivo por identificar y a los cultivos de control.
- Cierre completamente los tubos.
- Golpee suavemente los tubos contra la palma de la mano para permitir que el agua penetre al medio para extraer la niacina.

Coloque los tubos en posición inclinada y lleve a 37°C por dos horas como mínimo.

- Coloque los tubos en posición vertical por diez minutos a temperatura ambiente.
- Extraiga 0,6ml del sobrenadante y transféralo a un tubo de 13x75 mm taparroscas estéril.

- Inserte con una pinza estéril la tira reactiva en cada uno de los tubos, en la posición que indica la flecha.
- Tape inmediatamente
- Golpee suavemente los tubos sobre la palma de la mano.
- Deje en reposo durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Observe el color.

Controles:

Positivo: Cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv (cepa de referencia)

Negativo: Cultivo de *M. Avium intracellulare* o *M. Fortuitum*.

Reactivo: medio de cultivo OK sin sembrar

Resultados:

Compare los resultados con los controles positivo, negativo y reactivo.

Positivo: desarrollo de un color amarillo

Negativo: sin desarrollo de color

Reactivo: sin desarrollo de color.

ANTES DE DESCARTAR LOS TUBOS AGREGUE 1ML DE NaOH AL 4%
PARA NEUTRALIZAR LOS REACTIVOS, LOS CUALES SON ALTAMENTE
TÓXICOS.

b. Reducción de nitritos:

La prueba detecta la habilidad de algunas micobacterias para reducir nitratos a nitritos por medio de la enzima nitratorreductasa.

La nitrato reductasa producida por la micobacteria, reduce el nitrato de sodio (substrato) a nitritos, los cuales son detectados en medio ácido, por la acción de la sulfanilamida y de dihidrocloruro-N-naftiletilendiamina, formando un complejo de cloruro de diazonio de color fucsia.

b.1. Procedimiento:

- Coloque 0,5 ml de agua destilada estéril en un tubo estéril de 13x75 mm, taparroscas.

Con una espátula de madera estéril, emulsione en el agua abundantes colonias del cultivo por identificar y de los cultivos de control para obtener una suspensión concentrada.

- Agregue 2ml de sustrato de nitrato a cada tubo.

- Incube a 37°C durante 2 horas

- Adicione a cada tubo con pipeta de 1ml:

2 gotas de ácido Clorhídrico al 50%

2 gotas de sulfanilamida al 0,2%

2 gotas de dihidrocloruro-N-naftiletilendiamina al 0,1%

- Observe el desarrollo de color.

Controles:

Positivo: Cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv (cepa de referencia)

Negativo: Cultivo de *M. bovis* var. *BCG* o *M. avium intracellulare*

Reactivo: agua destilada estéril

Resultados:

Compare los resultados con los controles positivo, negativo y reactivo.

Positivo: desarrollo de un color fucsia de intensidad variable.

Negativo: sin desarrollo de color, toda prueba negativa se debe verificar mediante la adición de polvo de zinc, si existen nitratos aparecerá un color fucsia lo cual la confirma como negativa.

Reactivo: sin desarrollo de color.

c. Actividad de catalasas:

La catalasa es una enzima intracelular capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en oxígeno molecular y agua. Esta reacción se evidencia *in vitro* mediante la producción de burbujas de oxígeno. Todas las micobacterias sintetizan catalasas produciendo dos clases, las cuales se clasifican en termolábil y termoestable. La determinación de su estabilidad con respecto al calor, 68°C, se utiliza como una característica de indentificación.

c.1. Catalasa a temperatura ambiente:

- Coloque 0,5ml de agua destilada estéril en un tubo estéril de 13 x 75 mm taparroca.
- Con una espátula de madera estéril, emulsione en el agua varias colonias, del cultivo por identificar como el cultivo para control positivo, hasta obtener una suspensión concentrada.
- Adicione 0,5 ml de una mezcla de perhidrol al 30% y Tween 80 al 10%
- Lea

Controles:

Positivo: Cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv (cepa de referencia)

Negativo: no se hace, puesto que todas las micobacterias tienen actividad de catalasa a temperatura ambiente.

Reactivo: agua destilada estéril

Resultados:

Compare los resultados con los controles positivo, negativo y reactivo.

Positivo: formación de burbujas en la superficie de cantidad variable.

Reactivo: no hay formación de burbujas.

c.2. Catalasa a 68°C:

- Coloque 0,5ml de agua destilada estéril en un tubo estéril de 13 x 75 mm taparroscas.

- Con una espátula de madera estéril, emulsione en el agua varias colonias, del cultivo por identificar como el cultivo para control positivo, hasta obtener una suspensión concentrada.

- Incube los tubos a 68°C en baño de María por 20 minutos.

- Deje enfriar a temperatura ambiente.

- Adicione 0,5 ml de una mezcla de Perhidrol al 30% y tween 80 al 10%

- Lea

EL TIEMPO Y LA TEMPERATURA SON CRÍTICOS

Controles:

Positivo: *M. fortuitum*

Negativo: Cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv (cepa de referencia) ó *M. bovis* var. BCG.

Reactivo: agua destilada estéril.

Resultados:

Compare los resultados con los controles positivo, negativo y reactivo.

Positivo: formación de burbujas en la superficie de cantidad variable.

Negativo: no hay formación de burbujas. Las pruebas negativas se deben leer por segunda vez a los 10 minutos.

Reactivo: no hay formación de burbujas

Compare en un cuadro los resultados obtenidos para diferenciar entre una cepa de M: tuberculosis y otra micobacteria. M. tuberculosis produce estos resultados en un 99,9% de las pruebas.

ANEXO 6:

PROCEDIMIENTO DE DECONTAMINACIÓN:⁴⁴

a. Método del ácido Sulfúrico:

- Obtener sobrenadante en el caso de medios bifásicos, si es medio sólido omitir este paso.
- Colocar 1ml de H₂SO₄ (1N)
- Centrifugar durante 20 minutos a Temperatura ambiente a 2000 rpm.
- Lavar 3 veces con agua destilada estéril y en cada lavada centrifugar durante 10 minutos a 2000 rpm.
- Descartar el sobrenadante en recipiente con Hipoclorito de sodio

⁴⁴ Laboratorio microbiología U, Nacional y GARZÓN MARIA CONSUELO, Op. Cit.

- Agregar de 0,5 a 1ml de agua destilada estéril
 - Y sembrar 0,2ml nuevamente en un tubo nuevo con el mismo tipo de medio.
- b. Método del escobillón de Kudoh (método directo):
- Impregne con una capa delgada y homogénea la totalidad del algodón de un escobillón estéril, con la partícula útil de la muestra.
 - Introduzca el escobillón en un tubo que contenga 3ml de NaOH al 4% durante 2 minutos como máximo.
 - Saque, sin escurrir, el escobillón y siembre con movimientos de rotación y presión utilizando las partes laterales del escobillón. Use un escobillón para cada uno de los tubos de medio OK.
 - Incube los tubos a 37°C en posición horizontal con un mínimo de inclinación, con las tapas sin ajustar.
 - Lea los cultivos a la primera semana; observe la presencia o no de contaminación y ajuste las tapas.
 - Lea los cultivos a la cuarta, octava y duodécima semana según la escala semicuantitativa.
 - En caso de presentar crecimiento, realice una coloración de ZN para verificar la pureza del cultivo.
 - Si el cultivo es puro, identifique e informe.
 - Si el cultivo no es puro, descontamine por el método de ácido sulfúrico al 10% y siembre nuevamente.

- Si al cabo de la duodécima semana no se observa crecimiento, descarte e informe.