

## INVESTIGACION DEL MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EN ALGUNOS PRODUCTOS LACTEOS \*

por

Dra. MARTA RIVAS R. y Dr. RAUL VALENZUELA C. \*\*

Los resultados obtenidos en el Laboratorio de Tuberculosis, del Instituto de Investigaciones Veterinarias, al investigar la presencia del *Mycobacterium tuberculosis* en el queso Chanco (1) y la comprobación posterior de que su ausencia es debida, en gran parte, al contacto prolongado del bacilo con el ácido láctico presente en el queso (2), nos indujeron a buscar el bacilo en productos lácteos en que el contacto del germen con el ácido láctico ocurriese por corto tiempo y en productos en que el ácido referido esté ausente; fué así que elegimos como material de investigación al quesillo (por su elaboración y ventas rápidas) y la mantequilla, entre cuyos componentes no está el ácido mencionado.

Nuestro interés en detectar el *M. tuberculosis variedad bovis* en productos lácteos se debe al conocimiento de la presencia de este germen en la glándula mamaria, no sólo en vacas con lesiones en este órgano, sino también, en aquellos animales que poseen lesiones abiertas de tuberculosis en órganos alejados y cuyos bacilos pasan temporalmente a la circulación (3). Las investigaciones realizadas inyectando bacilos por vía hemática a vacas en producción han demostrado la aparición de bacilos en la leche a las tres semanas y la eliminación ha persistido durante más de cien días. Es pues evidente que la leche puede contener bacilos aun cuando no existan lesiones aparentes en la glándula mamaria.

Kerr, Lamont y Mc. Girr. (4) en 1949, demostraron que, de 201 vacas con distintas formas de lesión tuberculosa, aproximadamente el 7,5% eliminaban bacilos por la leche.

Geddoelst citado por Pehu y Dufourt dá una cifra de 14 a 19% de eliminación bacilar por la leche en vacas reaccionantes a la tuberculina.

\* Recibido para su publicación el 12 de Junio de 1955.

\*\* Funcionarios de la Sección Tuberculosis. Instituto de Investigaciones Veterinarias, Ministerio de Agricultura.

Pullinger (6) demostró que el *M. tuberculosis* está casi siempre presente en la mezcla de leches crudas de diversas procedencias.

Las mantequillas, aun saladas y mantenidas a muy bajas temperaturas conservan por largo tiempo bacilos virulentos. Schroeder y Cotton citados por Pehu y Defourt han encontrado bacilos virulentos hasta 99 días después.

J. Smith citado por Pullinger (7) encontró cinco veces el bacilo al examinar 51 muestras de mantequillas.

Grolier y Voiculesco (8) encontraron un 18% de contaminación por el *M. tuberculosis* en 22 muestras de mantequilla.

En Chile el Dr. Hugo K. Sievers (9) encontró un 20% de contaminación en muestras de mantequilla tomadas al azar (1934).

Norambuena (10), en 1943, encontró un 4,16% de contaminación en la mantequilla.

Schroeder y Brett citados por Hammer (11) encontraron un 3,2% de contaminación en muestras de requesón recién elaboradas: en este mismo tipo de muestras, Harrison citado por Hammer (11), encontró el bacilo en tres muestras de un total de cinco.

En aquellos países con un alto porcentaje de tuberculosis bovina y en especial en aquellos en que aún no se ha descartado totalmente el consumo de leche cruda, coexiste una alta incidencia de tuberculosis humana de origen bovino. Es así como en Irlanda con un porcentaje de tuberculosis en el ganado de un 33%, McMurray citado por Reilly (12), en 1941, da una cifra aproximada a un 20% de tuberculosis humana por bacilos bovinos.

En Inglaterra, entre los años 1943 y 1945, con un porcentaje de tuberculosis en el ganado de un 20%, más o menos el 26% de las tuberculosis no pulmonares del hombre eran debidas a la variedad bovina (12).

En un condado danés donde el porcentaje de tuberculosis en el ganado era alto, el 50% de los niños de 7 años y el 75% de los de 14 años, dieron reacción tuberculínica positiva (13).

En los últimos años la incidencia de tuberculosis de origen bovino ha disminuído en esos países debido a las campañas de erradicación realizadas por los gobiernos respectivos y al incremento constante de la pasteurización de la leche.

En Gran Bretaña, en 1949 (13), se estimaba que el ganado bovino estaba afectado de tuberculosis en un 18%. En 1952 el porcentaje ha disminuído a 10-12%. No hemos encontrado cifras que indiquen el porcentaje de tuberculosis de origen bovino en el hombre en los últimos años, pero es muy probable que ésta haya disminuído paralelamente a la tuberculosis en el ganado.

En Irlanda, ha disminuído la tuberculosis de origen bovino en el hombre de 19,4 a un 4% (12).

En nuestro país, a pesar del porcentaje elevado de tuberculosis en el ganado (20%), la infección de tipo bovino en el hombre es baja según Darricarrere (14), que dá una cifra de un 2%. Después de esta investigación, realizada en 1942, carecemos de datos al respecto. Es probable que esta cifra se mantenga baja debido a que en Chile no existe la costumbre de consumir leche cruda.

De Besch, citado por Pehu y Dufourt (5) encontró el bacilo bovino en el 11% de los lactantes tuberculosos. En Edinburgo, Mitchell, citado por Pehu y Dufourt (5) ha aislado el bacilo bovino en el 90% de las adenitis tuberculosas, y Fraser (5), en el 60% de las tuberculosis osteo-articulares. Es evidente que el *M. tuberculosis* no ofrece tanto peligro para el hombre adulto como para el niño. Park y Krumwiede, citados por Pehu y Dufourt (5) han dado el siguiente cuadro en que puede verse las diversas localizaciones de la tuberculosis infantil cuando es producida por el *Mycobacterium tuberculosis variedad bovis*:

CUADRO Nº 1

LOCALIZACIONES DE LA TUBERCULOSIS INFANTIL

	Individuos de más de 16 años	Individuos de 5 a 16 años	Individuos de 0 a 5 años
Tuberculosis pulmonar	0	0	4,1
" ganglionar	3,6	36	58
" abdominal	22	46	59
" meníngea	0	0	13,6
" osteoarticular	3,5	7,3	0
" generalizada	2,7	40	23

La observación de este cuadro nos indica que a medida que el niño crece, va disminuyendo paulatinamente el número de lesiones por bacilo bovino; en las lesiones en el adulto, éstos son muy raros. Según los trabajos y documentos publicados en el mundo entero, podemos dar la cifra aproximada de un 5 a 20%, según los países, para los casos de tuberculosis infantil de origen bovino.

Los datos anotados de nuestra revisión bibliográfica nos indican el peligro a que está expuesto el consumidor por la ingestión de productos lácteos no controlados sanitariamente. En nuestro país sólo en las ciudades principales como Santiago, Concepción, Valparaíso y recientemente en la ciudad de Talca, se ha implantado la pasteurización de la leche y productos lácteos; sin embargo, la reglamentación al respecto no es todo lo drástica que debiera ser, ya que actualmente se permite la venta de mantequilla cruda; agreguemos a ésto los fraudes que cometen los comerciantes inescrupulosos al colocar indistintamente la etiqueta

“pasteurizada” tanto al producto sometido a este procedimiento como al producto crudo. Consideremos también a los pequeños industriales, cuyos productos no son en absoluto sometidos a la pasteurización y cuya producción es llevada en cantidad no despreciable a los grandes centros urbanos, aumentando así las probabilidades de infección a que se encuentra expuesta la población.

#### MATERIAL Y METODOS

Se emplearon en esta investigación 60 muestras de mantequilla y 60 muestras de quesillo obtenidas al azar en el comercio y en plantas productoras. De las 60 muestras de mantequilla, 38 ostentaban la etiqueta “Pasteurizada”. En cuanto a las muestras de quesillo siempre se nos informó, sin que el vendedor tuviera constancia de ello, que eran pasteurizadas.

El método empleado para detectar el *Mycobacterium tuberculosis* fué la inoculación experimental en cuyes previamente tuberculinizados.

No empleamos el cultivo porque teníamos antecedentes sobre la alta contaminación de los medios cuando se siembran muestras de productos lácteos (1). Por otra parte el método de inoculación es reconocido universalmente como el más sensible para la búsqueda del *M. tuberculosis* (15).

Por factores de orden económico sólo se inoculó un cobayo por muestra. Por esta razón las cifras de 50 muestras de mantequilla y 50 de quesillo que habíamos fijado primitivamente fueron aumentadas a 60 para cada caso, con el objeto de prevenir la disminución del número fijado al comienzo por fallecimiento de los animales por causas intercurrentes.

*Procedimiento.* — Cada muestra de mantequilla de 20 grs. más o menos era calentada a 40° al B.M. en un vaso de precipitado estéril con el objeto de licuarla, se homogenizaba en seguida con 5 ml. de agua destilada estéril agregada gota a gota y agitando con varilla de vidrio también estéril, se sometía después, la muestra a la centrifugación (5.000 r.p.m.) durante 30 minutos. Tomábamos después 5 ml. de mantequilla, en una proporción de 4 ml. de materia grasa y 1 ml. de sedimento. Esta muestra se sometía a la acción de 5 U. O. de penicilina por ml. durante 24 horas a temperatura ambiente con el objeto de inhibir en lo posible la flora agregada. Para proceder a la inoculación se licuaba la muestra nuevamente a 40° y esta cantidad se inoculaba en la región inguinal izquierda de cada cuy. Desde los 20 días de inoculados, los cuyes fueron controlados por la prueba de tuberculinización cada 15 días.

Cada muestra de queso de 30 grs. era homogenizada con hidróxido de sodio al 4% en un mortero estéril. La soda se agregaba lentamente hasta obtener la consistencia apropiada para la inoculación. Cada homogenización de queso demoraba alrededor de 15 minutos, por lo que no consideramos conveniente someterlas a la acción de la estufa a 37°. Obtenida la consistencia requerida se neutralizaba la muestra con ácido sulfúrico al 6% y se inoculaba 5 ml. en la región inguinal izquierda de cada animal; del mismo modo que los animales inoculados con muestras de mantequilla, estos cuyes eran controlados cada 15 días por el test tuberculínico. Los animales fueron sacrificados cinco meses después de la inoculación.

RESULTADOS

De los 60 cuyes inoculados con muestras de mantequilla, 54 permanecieron vivos hasta el término de la experiencia. De las 54 muestras correspondientes a estos cuyes, 32 provenían de mantequillas pasteurizadas y 22 de mantequillas crudas. El test tuberculíneo de estos 54 cuyes dió los siguientes resultados:

CUADRO Nº 2

RESULTADOS DE LA TUBERCULINIZACION CADA 15 DIAS EN CUYES INOCULADOS CON MUESTRAS DE MANTEQUILLA

Cuy corresp. a la muestra Nº	PRUEBAS DE TUBERCULINA							
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª
1 a 4	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)
5	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	S	S	+
6 a 46	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)
47	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	S	S	+
48 a 54	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)

Las muestras números 5 y 47 procedían de mantequilla cruda.

Cada cuy sacrificado después de cinco meses era sometido a una necropsia minuciosa. Los 52 cuyes cuyas pruebas tuberculínicas repetidas dieron resultado negativo no presentaron a la necropsia ningún signo anatomopatológico digno de mención; no obstante todos los casos fueron controlados por el examen microscópico directo a partir de frotos de bazo teñidos por el método de Ziehl-Neelsen. Los dos cuyes que en el último test tuberculínico dieron resultado positivo, presentaron alteraciones en sus órganos que se resumen como sigue:

*Cuy N° 5:* Ganglios inguinales, lumbo-aórticos, tráqueo-bronquicos y axilares aumentados de volumen.

Pulmón izquierdo: muy escasos nódulos del tamaño de una cabeza de alfiler, transparentes, grisáceos.

Bazo: tamaño normal, aspecto granuloso.

*Cuy N° 47:* Ganglios tráqueo-bronquicos y axilar derecho aumentados de volumen.

Pulmones: escasos nódulos grisáceos de mayor tamaño que una cabeza de alfiler.

Bazo: ligeramente aumentado de volumen y de aspecto granuloso.

El frote hecho a partir del bazo en ambos cuyes dió resultado positivo (muy escasos bacilos ácido-alcohol resistentes).

De los 60 cuyes inoculados con muestras de quesillo, 50 permanecieron vivos hasta el término de la experiencia, los test tuberculínicos realizados en estos cuyes dieron los siguientes resultados:

CUADRO N° 3

RESULTADOS DE LA TUBERCULINIZACION CADA 15 DIAS EN CUYES  
INOCULADOS CON MUESTRAS DE QUESILLO

Cuy corresp. a la muestra N°	PRUEBAS DE TUBERCULINA							
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª
1 a 22	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)
23	(—)	(—)	(—)	(—)	S	S	S	+
24 a 50	(—)	(—)	(+)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)

Del mismo que en los cuyes inoculados con mantquilla se procedía a hacer la necropsia y el control por examen microscópico directo de frote del bazo en cada cuy inoculado con quesillo, una vez completado el período de cinco meses de inoculados.

Los 49 cuyes, cuyo test tuberculínico dió siempre resultado negativo, dieron también a la necropsia resultado negativo. Del mismo modo los frotos del bazo de estos animales no evidenciaron bacilos ácido-alcohol resistentes.

El único cuy de este grupo cuyo test tuberculínico fué positivo (cuy N° 23) presentaba ligero infarto de sus ganglios inguinales y tráqueo-bronquicos, escasos nódulos grisáceos pulmonares y bazo aumentado de volumen y granuloso. El frote hecho a partir del bazo de este animal evidenció escasos bacilos ácido-alcohol resistentes.

### DISCUSION

Los resultados expuestos nos señalan un 3,7% de muestras de mantequilla (9% si se consideran sólo las crudas) y un 2% de muestras de queso como portadoras del *Mycobacterium tuberculosis*.

El escaso número de lesiones que presentaban los cuyes correspondientes a las muestras positivas se explica por el número pequeño de bacilos que seguramente contenía cada muestra, ya que la mezcla de diferentes leches aumenta las posibilidades de contaminación pero disminuye el número de bacilos por ml. Además la porción de cada muestra que puede inocularse a un cuy es relativamente pequeña. Aunque el cuy es un excelente reactivo biológico para el *M. tuberculosis* (la presencia de 1 a 10 bacilos determina en él, el desarrollo de la enfermedad), la introducción de un número pequeño de bacilos le produce la forma paucibacilar de tuberculosis.

La inoculación en conejo de las 3 cepas obtenidas nos demostró que en todos los casos se trataba de la variedad bovis de *M. tuberculosis*.

Comprobado el hecho de que las mantequillas y los quesillos (de pasteurización no bien controlada) pueden ser una peligrosa fuente de infección por *M. tuberculosis* para el consumidor, se hace imprescindible la dictación de normas rígidas para el saneamiento de las leches destinadas a la elaboración de estos productos, especialmente en aquellas zonas del país de más densa población ganadera, ya que a mayor número de leches mezcladas, mayor es el peligro de presencia del *Mycobacterium tuberculosis* en la mezcla.

### CONCLUSIONES

1ª En muestras de mantequilla que incluían 32 pasteurizadas y 22 crudas, se encontraron 2 muestras contaminadas con *Mycobacterium tuberculosis*, variedad bovis lo que corresponde a 3,7% si consideramos el total de muestras, y un 9% si consideramos sólo las mantequillas crudas.

2ª De un total de 50 muestras de queso, se encontró una contaminada con *M. tuberculosis*, variedad bovis, lo que corresponde a un 2%.

3ª No se encontró el *M. tuberculosis* en las 32 muestras de mantequilla pasteurizada.

4ª Las dos primeras conclusiones hacen necesaria la creación de normas sanitarias estrictas que obliguen al saneamiento de las leches destinadas a la elaboración de ambos productos.

## SUMMARY

*M. tuberculosis* was detected in two samples of butter from a lot of 54 samples, by inoculation of guinea pigs. Thirty two samples were of pasteurized butter and twenty two of crude butter. The two cases of contamination with tubercle bacillus came from crude samples. All the pasteurized samples gave negative results.

One sample of small cheese presented *M. tuberculosis* when fifty samples of small cheese were examined.

These results indicate the need for stricter sanitary rules in connection with milk used in the manufacture of butter and cheese.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.—BARRIA, V. — Investigación del *M. tuberculosis* en el queso chanco. Tesis. Esc. Med. Vet. U. de Chile. 1950.
- 2.—RIVAS, M.; BARRIA, V. y GAZMURI, G. — Efecto del ácido láctico sobre el *M. tuberculosis* var. bovis y su relación con la acidez láctica del queso chanco (trabajo enviado al Congreso Veterinario de Brasil). En prensa. 1953.
- 3.—MAREK, J. — Tratado de Diagnóstico Clínico de las Enfermedades Internas de los Animales Domésticos. Edit. Labor. 3ª Edición. 1947.
- 4.—KERR, W. R.; LAMONT, H. G. and Mc. GIRR, J. L. — Control of Infection with the Bovine Tubercle Bacillus. *Lancet*. 1:34-39, 1950.
- 5.—PEHU, M. et DUFOURT, A. — La tuberculosis médica de la infancia. Edit. Labor. 2ª Edición. Madrid, 1934.
- 6.—PULLINGER, E. J. — The incidence of tubercle bacilli and *Brucella abortus* in milk. *Lancet*. 1:967, 1934.
- 7.—PULLINGER, E. J. — Examination of milk products for tubercle bacilli and *Brucella abortus*. *Lancet*. 1:1342, 1935.
- 8.—GROLIER, A. et VOICULESCO, TH. — Recherches sur la presence du bacille tuberculeux dans le lait et ses produits derivées. *Ann. Inst. Pasteur*. 63:145, 1939.
- 9.—SIEVERS, H. K. — El problema de la leche higiénica. *Bol. Min. Agricultura. Imp. Universitaria. Stgo.*, 1934.
- 10.—NORAMBUENA, M. — Investigación del bacilo de Koch en la leche y derivados. Tesis. Esc. Med. Vet. U. de Chile. 1934.
- 11.—HAMMER, B. — Dairy Bacteriology. 2ª Edición. 1938.
- 12.—REILLY, L. — Human tuberculosis of bovine origin in Northern Ireland. *Journal of Hygiene*. 48:464-471, 1950.
- 13.—SEMINAR o ZOONOSES, Viena. Bovine Tuberculosis and Man. *J. Am. Vet. Med. As.* 124:309, 1954.
- 14.—DARRICARRERE, T. — Bacilo tuberculoso bovino. Su rol en la patología humana. *Bol. Inst. Bact. de Chile*. 3:102, 1942.
- 15.—COWAN MAITLAND, M. — The rapid detection of *M. tuberculosis* by microscopic examination of milk from individual cows and from groups of ten cows. *J. of Hygiene*. 48:401, 1950.