

Aislamiento de *Mycobacterium scrofulaceum* en peces silvestres de Caicara del Orinoco, Venezuela

**Aldeima T. Pérez T.¹, Carmen Ramírez², Albina Vázquez²
y Amelia Moronta²**

¹Instituto Limnológico de la Universidad de Oriente (UDO).
Caicara del Orinoco, Venezuela. Telef: (0284) 6667746, Fax: (0284) 6667474.

Correo electrónico: aldeimaperez@hotmail.com

²Hospital "José Ignacio Baldó", Laboratorio de Referencia Nacional de la Tuberculosis, Servicio de Bacteriología. El Algodonal, Caracas, Venezuela, Telef: (0212) 4728106, Fax: (0212) 4724258.

Resumen

Se aislaron cinco cepas de *Mycobacterium scrofulaceum* de ejemplares silvestres de *Semaprochilodus laticeps* y *Prochilodus mariae* procedentes de caños y lagunas de Caicara del Orinoco, estado Bolívar, Venezuela. Las bacterias ácido-resistentes se detectaron en cinco ejemplares de *Semaprochilodus laticeps* (12,5%) y en uno de *Prochilodus mariae* (5%). Se tomaron muestras de heces, riñón, hígado y bazo y se trataron por el método de Petroff. Los extendidos en láminas (frotis) se realizaron con el sedimento centrifugado y se colorearon mediante la técnica modificada de Ziehl-Neelsen. El sedimento se cultivó en el medio de Löwenstein-Jensen, y sólo se tomaron los cultivos puros para la identificación de las cepas. Las pruebas para la identificación incluyeron el tiempo de crecimiento, pigmentación, producción de niacina, actividad de catalasa e hidrólisis del Tween 80. Se aislaron cinco cepas de *Mycobacterium scrofulaceum* a partir de las heces de los peces infectados. La ausencia de masas granulomatosas en los peces infectados sugiere que éstos podrían actuar como reservorio de *Mycobacterium scrofulaceum*.

Palabras clave: Aislamiento, Caicara del Orinoco, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Prochilodus mariae*, *Semaprochilodus laticeps*, Venezuela

Isolation of *Mycobacterium scrofulaceum* in fishes from Caicara del Orinoco, Venezuela

Abstract

Five strains of *Mycobacterium scrofulaceum* were isolated in fish (*Semaprochilodus laticeps* and *Prochilodus mariae*) collected from creeks and lagoons at Caicara del Orinoco, Bolivar State, Venezuela. Acid-resistant bacteria were detected in five (12.5%) specimens of *S. laticeps* and one (5%) specimen of *P. mariae*. Samples taken from feces, kidney, liver and spleen were treated by using the Petroff method. Smears were prepared from centrifuged sediment and stained by using a modified Ziehl-Neelsen technique. Sediment was cultured on Löwenstein-Jensen medium, and only pure cultures were identified. Identification parameters included: growth rate, pigmentation, niacin production, catalase activity and the Tween hydrolysis test. Five strains of *M. scrofulaceum* were isolated from feces of infected fish. Absence of granular masses suggests the infected fish may act as reservoirs for *Mycobacterium scrofulaceum*.

Key words: Caicara del Orinoco, isolation, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Prochilodus mariae*, *Semaprochilodus laticeps*, Venezuela

Recibido: 03 Diciembre 2004 . Aceptado: 15 Febrero 2006

La tuberculosis en peces es una infección diseminada que se ha reportado en más de 150 especies (Nigrelli y Vogel 1963). Es una enfermedad sistémica, generalmente crónica, causada por bacterias del género *Mycobacterium*, observada en peces marinos y dulceacuícolas de ambientes naturales y en sistemas de cultivos intensivos y acuarios (Gomez 1998). Las especies comúnmente asociadas con tuberculosis en peces son *Mycobacterium fortuitum*, *M. chelonae* y *M. marinum* (Belas et al. 1995).

Othman (1980) obtuvo un cultivo de *Mycobacterium* en *Mugil auratus* de aguas mediterráneas de Libia. Pérez et al. (2001) colectaron y examinaron 40 individuos de *Mugil curema* de la Laguna La Restinga, Isla de Margarita y de los estanques que componen la Granja de Piscicultura del Instituto de Investigaciones Científicas, de la Universidad de Oriente, UDO, Boca de Río, Isla de Margarita, Venezuela detectando la presencia de *Mycobacterium* en un 25% de los peces examinados.

La tuberculosis en peces es una enfermedad crónica (Gomez 1998), caracterizada por la presencia de reacciones granulomatosas en los órganos viscerales y generalmente está acompañada por emaciación y muerte en la población de peces infectados (Talaat et al. 1999). La presencia de *Mycobacterium* en las instalaciones de cultivo y demás cuerpos de agua, representa un alto riesgo ya que estos microorganismos pueden ocasionar mortalidades superiores al 90% (Zarzuelo 1981). Esta enfermedad se trasmite de un pez a otro y también de estos organismos a humanos, donde produce cuadros clínicos potencialmente serios (Belas et al 1995).

El objetivo de esta investigación es obtener el aislamiento de *Mycobacterium scrofulaceum* en peces dulceacuícolas silvestres, procedentes de caños y lagunas, de Caicara del Orinoco, Venezuela.

Se examinaron 150 peces silvestres colectados en las áreas denominadas "Las Piedritas", "Los Manguitos" y "Pele El Ojo", ubicadas en Caicara del Orinoco, Municipio Cedeño, estado Bolívar, de los cuales 40 correspondieron a *Semaprochilodus laticeps* (sapoara), 20 *Prochilodus mariae* (coporo), 20 *Semaprochilodus kneri* (bocachico), 5 *Colossoma macropomus* (morocoto), 5 *Colossoma brachypomus* (cachama), 15 *Aequidens* spp. (mochoroca), 20 *Microgeophagos ramirezi* (ramirensis), 20 *Leporinus* spp. (mije) y 5 *Pseudoplatystoma* spp. (bagre). Los peces se sometieron a un examen clínico externo e interno con la finalidad de detectar anomalías que se pudieran relacionar con la presencia de micobacterias. Se determinó el peso y la longitud total de los ejemplares; se extrajeron los órganos y se procedió a la separación del hígado, bazo, riñón y tracto digestivo, empleando instrumentos quirúrgicos estériles. Cada porción de los órganos se trató con el método de Petroff (1915), que consiste en la homogenización y aislamiento de las micobacterias.

Los extendidos en láminas (frotis) se realizaron tomando una porción del homogenizado con un asa de platino. Se empleó la técnica de coloración de Ziehl-Neelsen modificada por Bullock (1971) para detectar la presencia de los microorganismos en los frotis. Al determinar la presencia de las micobacterias en los frotis, se realizó la siembra en el medio de cultivo de Löwenstein-Jensen, tomando con una pipeta estéril 0,1 mL de la muestra homogenizada y aislada. Los tubos inoculados se mantuvieron en incubación por 8-12 semanas entre 26-32°C.

Se realizaron las pruebas para la clasificación y la identificación diferencial, una vez confirmada la presencia de las micobacterias en el medio de cultivo, entre las cuales se incluyeron: tiempo de crecimiento, pigmentación (Runyon 1955), morfología de las colonias en el medio de cultivo Löwenstein-Jensen (Marks y Trollope 1960), temperatura de crecimiento y tolerancia al cloruro de sodio (Kestle *et al.* 1967), producción de niacina (Runyon *et al.* 1959), reducción de nitratos (Kubica 1964), actividad de catalasa (Kubica *et al.* 1966), hidrólisis del Tween 80 (Wayne *et al.* 1964), reducción del telurito (Kilburn *et al.* 1969), actividad de arilsulfatasa (Jones *et al.* 1966), ureasa (Gordon y Mihm 1959) y crecimiento en agar MacConkey (Jones y Kubica 1965).

Se determinó la presencia, por primera vez, de *Mycobacterium scrofulaceum* en cinco ejemplares silvestres de sapoara (*Semaprochilodus laticeps*) y en un individuo de coporo

(*Prochilodus mariae*), constituyen los primeros casos de aislamiento de bacterias ácido-alcohol-resistentes de estos géneros de peces dulceacuícolas. Se ha reportado un caso análogo, a partir de peces marinos de las costas venezolanas (Pérez *et al.* 2001).

Se aislaron cinco cepas en cultivo puro clasificadas en el grupo II de Runyon (1955) como escotocromógenas, de crecimiento lento, e identificadas como *Mycobacterium scrofulaceum*. Los microorganismos se aislaron a partir de las heces de cuatro ejemplares machos de sapoara de 277,8 g y 25,2 cm de peso y longitud total promedio. El otro cultivo se obtuvo de las heces de un individuo macho de coporo de 38 cm de longitud total y 962,3 g de peso. Asimismo, se observó la presencia de un microorganismo ácido-alcohol-resistente que no se pudo aislar, proveniente de las heces de un ejemplar de sapoara hembra de 338,5 g de peso y 27 cm de longitud total. En la Tabla 1 se mencionan y enumeran las pruebas que permitieron la clasificación e identificación diferencial de la micobacteria aislada.

La morfología de *Mycobacterium scrofulaceum* es semejante a la observada en otras especies de este género. Prissick y Masson (1957) describen las colonias como usualmente lisas y de color amarillo o naranja cuando crecen en un medio a base de huevo (como Löwenstein-Jensen) en cuatro o cinco semanas de incubación a 37°C; las colonias con morfología rugosa se encuentran con poca frecuencia.

Las cepas aisladas de *Mycobacterium scrofulaceum* no presentaron diferencias en los caracteres comparados con los correspondientes provenientes de infecciones de humanos. La similitud de los resultados de las reacciones enzimáticas, tales como arilsulfatasa, nitrorreductasa, ureasa, la capacidad para hidrolizar un substrato de Tween 80 y la tolerancia al cloruro de sodio, corroboraron la plena identificación de este microorganismo (Tabla 1).

TABLA 1. Clasificación e identificación diferencial de la bacteria ácido-alcohol resistente aislada de

Semaprochilodus laticeps y *Prochilodus mariae*. Grupo II: Escotocromógenos.

	Ziehl-Neelsen	Morfología de las colonias	Pigmento		T (°C) crecimiento			Niacina	Reducción de Nitratos
			Luz	Oscuridad	25	37	42		
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	+	L	N	N	+	+	-	-	+
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	+	L	N	N	+	+	-	-	+
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	+	L	N	N	+	+	-	-	+
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	+	L	N	N	+	+	-	-	+
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	+	L	N	N	+	+	-	-	+

TABLA 1. Continuación

	Catalasa		Tween 80	Telurito	CINA (5%)	Arilsulfatasa		Ureasa	Agar MacConkey sin cristal
	45mm	68°C				3 días	14 días		
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	>45 mm	+	-	-/+	-	-/+	+	-	-
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	>45 mm	+	-	-/+	-	-	-/+	-	-
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	>45 mm	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	<45 mm	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	<45 mm	+	-	+	-	-	-	-	-

L= Colonias lisas, N= Anaranjado. -/+ = 50-85% de las muestras son positivas.

Los síntomas de la tuberculosis pisciaria, no son específicos (Couch 1985). Sin embargo, algunas investigaciones señalan la presencia de nódulos blanquecinos en los órganos internos, branquias y musculatura unida a la columna vertebral, inflamación de la piel y exoftalmia (Dulin 1979). Los ejemplares de sapoara y coporo donde se detectó la presencia de micobacterias no mostraron síntomas de la enfermedad descritas por los citados autores. Se observaron algunas anomalías en los peces que se consideraron consecuencias de la manipulación durante la captura, tales como pérdida de escamas y aletas deshinchadas.

La ausencia de masas granulomatosas en los ejemplares infectados de sapoara (*Semaprochilodus laticeps*) y coporo (*Prochilodus mariae*) sugiere que estas especies podrían actuar como reservorio de *Mycobacterium scrofulaceum*.

AGRADECIMIENTOS

A Fundacite-Guayana por el apoyo económico brindado para la realización de esta investigación. Al Hospital "José Ignacio Baldó" y al Laboratorio de Referencia Nacional de la Tuberculosis, Servicio de Bacteriología, El Algodonal, por el apoyo material y científico.

LITERATURA CITADA

1. BELAS R., P. FALON y A. HANNAFORD. 1995. Potential applications of molecular biology to the study of fish mycobacteriosis. Annu. Rev. Fish. Dis. 5:133-173
2. BULLOCK G. L. 1971. Diseases of fishes. Libro II B. Identification of fish pathogenic bacteria. T. F. H. Publications Inc. Neptune Cytte, EUA, 41 pp.
3. COUCH J. A. 1985. Prospective study of infections and non-infections diseases in oysters

and fishes in three Gulf of Mexico estuaries. Dis. Aquat. Org. 1: 59-82.

4. DULIN M. P. 1979. A review of tuberculosis (mycobacteriosis) in fish. Vet. Med./ Small Animal Clinician. 735-737.
5. GOMEZ S. 1998. Unusual morphopathological features in a case of fish tuberculosis. J. Fish Dis. 21 (3): 237-239.
6. GORDON R. E y J. M. MIHM. 1959. A comparison of four species of micobacteria. J. Gen. Microbiol. 21: 736-748.
7. JONES W. D y G. P. KUBICA. 1965. The differential grouping of slowly growing mycobacteria based on their susceptibility to various dyes. Am. Rev. Resp. Dis. 91: 613-615.
8. JONES W. D., V. D. ABBOTT, A. L. VESTAL y G. P. KUBICA. 1966. A hitherto undescribed group of nonchromogenic mycobacteria. Am. Rev. Resp. Dis. 94: 790-795.
9. KESTLE D. G., V. D. ABBOTT y G. P. KUBICA. 1967. Differential identification of mycobacteria. II. Subgroups of groups II and III (Runyon) with different clinical significance. Am. Rev. Resp. Dis. 95: 1041-1052.
10. KILBURN J. O., V. A. SILCOX y G. P. KUBICA. 1969. Differential identification of mycobacteria. V. The tellurite reduction test. Am. Rev. Resp. Dis. 99: 94-100.
11. KUBICA G. P. 1964. A combined niacin-nitrate reduction test for use in the identification of mycobacteria. Acta Tuberc. Scand. 45: 161-164.
12. KUBICA G. P., W. D. JONES, V. D. ABBOTT, R. E. BEAM, J. O. KILBURN y J. C. CARTER. 1966. Differential identification of mycobacteria: I. Test on catalase activity. Am. Rev. Resp. Dis. 94: 400-402.
13. MARKS J. y D. R. TROLLOPE. 1960. A study of the "anonymous" mycobacteria. I. Introduction: colonial characteristics and morphology; growth rates; biochemical tests. Tubercle 61: 51-57.
14. NIGRELLI R. F. y H. VOGEL. 1963. Spontaneous tuberculosis in fishes and other cold-blooded vertebrates with special referente to *Mycobacterium fortuitum* Cruz from fish and human lesions. Zoologica, N. Y. 48: 131-144.

15. OTHMAN K. 1980. The isolation of mycobacteria from some species of marine fish. *Libyan J. Sci.* 10 (A): 1-5.
16. PÉREZ A. T., C. DAVID y L. QUIÑONES. 2001. Presence of acid-fast bacteria in wild and cultured silver mullets (*Mugil curema* VAL., 1836) from Margarita Island, Venezuela. *Interciencia* 26 (6): 252-256.
17. PETROFF S. A. 1915. Some cultural studies on the tubercle bacillus. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 26: 276-279.
18. PRISSICK F. H. y A. M. MASSON. 1957. Yellow-pigmented pathogenic mycobacteria from cervical lymphadenitis. *Can. J. Microbiol.* 3: 91-100.
19. RUNYON E. H. 1955. Veterans Administration National Tuberculosis Association Cooperative Study of Mycobacteria. *Am. Rev. Tuberc. Pulmonary Dis.* 72: 866-868.
20. RUNYON E. H., M. J. SELIN y H. W. HARRIS. 1959. Distinguishing mycobacteria by the niacin test: A modified procedure. *Am. Rev. Tuberc. Pulmonary Dis.* 79: 663-665.
21. TALAAT A. M., M. TRUCKSIS, A. S. KANE y R. REIMSCHUESSEL. 1999. Pathogenicity of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium smegmatis* to goldfish, *Carassius auratus*. *Vet. Microbiol.* 66: 151-164.
22. WAYNE L. G., J. R. DOUBEK y R. L. RUSSELL. 1964. Classification and identification of mycobacteria. I. Tests employing Tween 80 as substrate. *Am. Rev. Resp. Dis.* 90: 588-597.
23. ZARZUELO P. E. 1981. Principales enfermedades infecciosas de los peces. Editorial Aedos, Barcelona, España, pp. 14-174.