



Elaboración y prueba de potencia de sensitinas correspondientes a *Mycobacterium phlei* y *Mycobacterium fortuitum* aisladas de suelos pampeanos en la República Argentina

Production and potency of PPDs *Mycobacterium phlei* and *Mycobacterium fortuitum* isolated soils from La Pampa-Argentina

Bernardelli, A.²; Oriani, D.S.¹; Alonso, B.³

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa. Calle 5 y 116 (6360), General Pico. La Pampa. ²Ceva Salud Animal-Perú 1655-CP 1141-Buenos Aires-República Argentina. ³SENASA, Dirección de Laboratorio y Control Técnico (DILAB). Martínez Buenos Aires
amelia.bernardelli@ceva.com

Resumen

En países que han logrado erradicar la tuberculosis bovina, se ha comprobado que ciertas MNT interfieren en el diagnóstico de la tuberculosis, cuando se aplica la intradermorreacción con el derivado proteico purificado de *Mycobacterium bovis* (PPD). Además se ha establecido que algunas especies de MNT pueden invadir y replicar en el interior de parásitos tales como *Acanthamoeba* y *Dictyostelium discoideum* pudiendo actuar estos protozoarios como reservorios de MNT en los mamíferos parasitados.

Existen MNT en el ambiente natural de lagos, aguas de alcantarillas, suelos, polvo ambiental, etc y en los ambientes artificiales construídos por el hombre tales como : agua potable, acuarios, ya sea en forma planctónica o formando biofilm.

Los objetivos del proyecto consistieron en elaborar las sensitinas (PPD) a partir de las cepas de MNT aisladas de los suelos de la provincia de La Pampa y comprobar la posible reacción cruzada con el PPD bovino. Se elaboraron dos series de sensitinas una correspondiente a *M. fortuitum* y otra a *M. phlei*, con una concentración de proteína en ambas de 1.5mg/mL. Se sensibilizaron cobayos con polvo de *M. phlei*, *M. fortuitum* y *M. bovis* juntamente con vaselina estéril y piedra pómez. A los 120 días se efectuaron las pruebas de potencia en los flancos de los cobayos. La actividad relativa en cobayos sensibilizados con *M. bovis* fue de 2.18% con el PPD de *M. phlei* y de 0.4% para el PPD de *M. fortuitum* lo cual demuestra que las micobacterias ambientales no presentaron un

accionar relevante en la reacción intradérmica tuberculínica en cobayos.

Palabras claves: Sensitivas -Micobacterias no tuberculosas-Derivado Proteico Purificado PPD- Reacciones cruzadas- *Mycobacterium bovis*-*Mycobacterium phlei*-*Mycobacterium fortuitum*.

Abstract

In countries that have managed to eradicate bovine tuberculosis, has been shown to interfere with certain MNT tuberculosis diagnosis, when applied to the intradermal purified protein derivative *Mycobacterium bovis* PPD. It has also been established that some species can invade and replicate MNT inside *Acanthamoeba* parasites such as *Dictyostelium discoideum*, these protozoa may act as reservoirs of MNT mammals parasitized. Exist in mammals in the natural environment of lakes, sewage, soil, environmental dust, etc., and manmade artificial environments such as drinking water, aquariums, plactonica and biofilms.

The objectives of the project were to develop the sensitines (PPD) from the isolates of NTM isolated from soils of the province of La Pampa and check possible cross-reaction with PPD bovine. Two sensitines series of *Mycobacterium fortuitum* corresponding to and another *Mycobacterium phlei*, with protein concentration of 1.5 mg/mL. Guinea pigs were sensitized with *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium bovis* power with sterile vaseline and pumice. After 120 days tests potency were carried out on the flanks of guinea pigs. The relative activity in guinea pigs sensitized with



Mycobacterium bovis was of 2.18% with *M. phlei* and of 0.4% for the PPD *Mycobacterium fortuitum*, which shows that the environmental mycobacteria had no relevant actions in guinea pigs tuberculin intradermal reaction.

Key words: Sensitines-Nontuberculous Mycobacteria-Protein Purified Derivative PPD-Cross reactions-*Mycobacterium bovis*-*Mycobacterium phlei* -*Mycobacterium fortuitum*.

Introducción

Es conocido que las micobacterias no tuberculosas (MNT) juegan un rol importante en la salud humana, aumentando año tras año su prevalencia en aislamientos clínicos, con el agravante de la resistencia que presentan esas micobacterias a la terapia antimicrobiana, especialmente en pacientes inmuno deprimidos (Weitzul et al., 2000; Bercovier y Vincent, 2001). Además de la importancia creciente de las MNT en patologías humanas, estas cobran interés en la interferencia diagnóstica de la tuberculosis animal, cuando se aplican los planes de control y erradicación de la tuberculosis bovina, ya que en diversos países, al producirse una disminución de *Mycobacterium bovis* en los rodeos, comienza a detectarse la aparición de otras micobacterias, capaces de producir estados alérgicos en los mismos, con y sin lesiones que indiquen el desarrollo de un estado progresivo de la enfermedad (Chavez y Fernandez, 1976; Wayne, 1984). En la práctica existe controversia respecto a la importancia de las micobacterias ambientales no tuberculosas como fuente de reacciones cruzadas cuando se realiza el diagnóstico de la tuberculosis bovina por intradermoreacción, utilizando el derivado proteico purificado de *M. bovis* (PPD bovino). Corner y Pearson (1978) aceptan que las MNT ambientales originan respuesta inmune detectable por intradermoreacción, así como otros investigadores que observaron reacciones cruzadas con MNT de crecimiento lento, pero no con cepas de rápido crecimiento (Cooney et al., 1997; Chávez y Guerra, 1981) consideran que las MNT son causa de reacciones de sensibilización cruzada en áreas declaradas libres de tuberculosis bovina.

En nuestro país y sobre la base de los antecedentes existentes en otras regiones acerca de la existencia de un incremento de las reacciones inespecíficas debidas a MNT, Bernardelli et al., (1983) estudiaron la especificidad de algunas sensitinas micobacterianas, sensibilizando cobayos con tres grupos de micobacterias: a) complejo *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. scrofulaceum* (MAIS), b) grupo IV de Runyon: *M. fortuitum* y *M. chelonae* y c) Grupo I de Runyon: *M. marinum* y *M. kansasii*. A las tres semanas de realizada la sensibilización de los cobayos, los autores efectuaron las pruebas de sensibilidad y especificidad de las sensitinas, inoculando en ambos flancos de cada animal las sensitinas homólogas y PPD patrón de *M. tuberculosis* y *M. avium*. Los resultados indicaron que seis de las 10 sensitinas preparadas con el complejo MAIS y las tres sensitinas de *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. kansasii* mostraron un aceptable grado de especificidad.

Se ha comprobado la distribución de micobacterias ambientales en suelos, lodos, lagos, agua potable, etc (Chul Soon Choi, 1981; Covert et al., 1999); así también es reconocido que *M. avium*, *M. fortuitum* y *M. marinum* pueden invadir y replicar en el interior de especies de *Acanthamoeba* (Miltner y Bermudez, 2000; Steinert et al., 1998). *M. avium* también invade y replica en *Dictyostelium discoideum*, sirviendo los protozoarios como posibles vectores en la transmisión oral de las micobacterias (Sriwan et al., 2002).

En la provincia de La Pampa hemos demostrado, en muestras de suelos y en diferentes sitios de la provincia, el predominio de tres especies de MNT : *M. fortuitum*, *M. kansasii* y *M. phlei* (Oriani y Sagardoy, 2002).

Materiales y Métodos

Cepas empleadas: Se utilizaron dos aislamientos de los suelos de la provincia de La Pampa., tipificadas como: *M. fortuitum* y *M. phlei* pertenecientes a la región oriental de la provincia (Oriani y Sagardoy, 2002) . La elaboración de las sensitinas consiste en la preparación del cultivo semilla, luego el cultivo de producción en medio de Dorset Henley (Foto 1 y 2). Después de 4 semanas



de incubación, se lleva a cabo la muerte bacilar por calor (autoclave, 3 horas a vapor fluente) posteriormente se procede a la filtración del cultivo a través de una malla metálica de 180 μm de apertura y se clarifica por membranas de 2 μm . La precipitación de las proteínas: se realiza con ácido tricloroacético 40% p/v. Se continúa con la separación, lavado y disolución del precipitado con el agregado del solvente alcalino de Huitema ($\text{PO}_4\text{HNa}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$ 17,8 g; NaOH 45% 2mL; AD 1000 mL). La purificación del preconcentrado se logra por centrifugación a 2500 a 3000 rpm durante 20 min. El preconcentrado se trata con solución reguladora 3 Molar (PO_4HNa_2 28,9 g; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 18,1g; AD 1000 mL), solución antibacteriana 5 veces concentrada (ClNa 25g; Fenol 25g ; glicerina 400mL; AD 1000 mL) y agua destilada para lograr la dilución final. Los controles consisten en: a) Determinación de proteína: reacción de Biuret y método de Kjeldahl; control de fenol, método de Folin-Ciocalteus (Dilab-SENASA, 2002). b) Esterilidad: cultivo para aero-anaerobios, determinación de pH, ausencia de gérmenes: mediante tinciones de Ziehl-Neelsen y Gram, control de toxicidad mediante inoculación en cobayos. c) Prueba de valoración biológica: se realiza empleando cobayos entre 400 y 600 gramos de peso, los que son sensibilizados antes de realizar el ensayo con *M. phlei*, *M. fortuitum* y *M. bovis* AN5. La suspensión se preparó con 100 mg. de bacilos, 100 mg. de polvo de piedra pómez y 25 mL de vaselina líquida. A cada cobayo se los sensibiliza inyectándoles 0,5 mL de la suspensión por vía intramuscular. Transcurridas entre 5 a 7 semanas post inoculación se realiza la prueba de potencia inoculando distintas diluciones (1/200, 1/1000 y 1/5000) de PPD bovino y PPDs .

Resultados

Las sensitinas elaboradas a partir de *M. fortuitum* (serie 68) y *M. phlei* (serie 67) aislados de los suelos pampeanos presentaron una concentración de proteína de 1.5mg/mL. Se emplearon un total de 7 cobayos por lote, los resultados de la valoración biológica se realizó mediante el programa informático de

cálculo de actividad relativa (IMPAZ-SENASA). La potencia estimada según la Farmacopea Europea para el PPD bovino debe estar entre el 66% y 150%, mientras que para el PPD aviar no debe ser inferior al 75%, ni superior al 133.

Las lecturas obtenidas de la prueba biológica se muestran en las tablas 1, 2 y 3

La actividad relativa en cobayos sensibilizados con *M. bovis* fue de 2.18% con el PPD de *M. phlei* y de 0.4% para el PPD de *M. fortuitum* lo cual demuestra que las micobacterias ambientales no presentaron un accionar relevante en la reacción intradérmica tuberculínica en cobayos.

Discussion y Conclusiones

Existe controversia respecto a la importancia de las micobacterias ambientales no tuberculosas como fuente de reacciones cruzadas con el diagnóstico de la tuberculosis bovina por intradermorreacción con derivado proteico purificado de *M. bovis* (PPD bovina). Nuestros resultados permiten inferir que si bien los animales se sensibilizan con micobacterias ambientales, la antigenicidad que ellas presentan no es suficiente para ocasionar reacciones cruzadas al PPD bovino. Con el fin de corroborar los datos obtenidos en cobayos es necesario efectuar ensayos en rodeos de bovinos con y sin historia de tuberculosis y aplicar en ellos los PPD de *M. bovis*, *M. fortuitum* y *M. phlei* en la tabla del cuello, con posterior necropsia y estudios bacteriológicos e histopatológicos de animales reaccionantes y no reaccionantes a cualquiera de los PPD.



Bibliografía

- Bercovier H. y Vincent V.** 2001. Mycobacterial infections in domestic and wild animals due to *Mycobacterium marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. porcinum* *M farcinógenes* *M .smegmatis*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *Mkansasii*, *Msimiae* and *M. genavense*. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 20 (1) ,265-290
- Bernardelli A., Navarro N. y Kantor I.N. de** 1983. Especificidad de algunas sensitinas micobacterianas. *Rev. Arg. Tub. Enf. Pulm. Sal. Publ.* 44:5-10.
- Chávez P.R. y Fernández A.** 1976. Sensibilidad inespecífica a la tuberculina mamífera en los bovinos en Cuba. *Rev. Cub. Cienc. Vet.* 7:75-82.
- Chávez P.R. y Guerra A.** 1981. Causas de nuevos reactores a la tuberculina mamífera en un área libre de tuberculosis bovina. *Rev. Cub. Cienc. Vet.* 12:107-112.
- Chul Soon Choi** 1981.-*Mycobacterium* isolated for man, animals and soil in Korea, 1968-1980, a review. *Korean J. vet. public. Hlth*, 5, 49-54.
- Cooney R., Kazda J., Quinn J., Cook B., Müller K. y Monaghan M.** 1997. Environmental mycobacteria in Ireland as a source of non-specific sensitisation to tuberculins. *Irish Vet. Times* 50:370-373.
- Corner L.A y Pearson C.W.** 1978. Pathogenicity for cattle of atypical mycobacteria isolated from feral pigs and cattle and the correlation of lesions with tuberculin sensitivity. *Aust. Vet. J.* 54:280-286.
- Covert T.C., Rodgers, M.R. Reyes A.L. y Stelma G.N.Jr.** 1999.- Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2492-2496.
- DILAB - SENASA** 2002. Manual de Procedimientos Técnicos-Producción y Control de Tuberculina Bovina-Derivado Proteico Purificado (D.P.P.) .*Manual MP22.*
- Miltner, E.C., y L.E. Bermúdez.** 2000. *Mycobacterium avium* grown in *canthamoeba castellanii* is protected from the effects of antimicrobials. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44: 1990-1994.
- Oriani, D.S.; Sagardoy, M.A.** 2002. Nontuberculous mycobacteria in soils of La Pampa province (Argentina). *Rev. Arg. Microbiol.* 34:132-137.
- Sriwan, C., M. Fajardo, S. Hagele, M. Horn, M. Wagner, R. Michel, G. Krohne, M. Schleicher, J. Hacker, y M. Steinert.** 2002. Various bacterial pathogens and symbionts infect the amoeba. *Dictyostellium discoideum*. *Int. J. Med. Microbiol.* 291: 615-624.
- Steinert, M., K. Birkness, E. White, B. Fields y F. Quinn.** 1998. *Mycobacterium avium* bacillary growth saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within st. walls. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2256-2261.
- Wayne L.G.** 1984. Mycobacterial speciation. In *The mycobacteria A sourcebook* (G.P. Kubica & L.G. Wayne, eds). Marcel Dekker, New York, 25-66.
- Weitzul S., Eichhorn P. y Pandya A.** 2000. Nontuberculous mycobacterial infections of the skin. *Dermatol. Clin.* 18:359-377.

Mapa1: lugares de muestreo y aislamiento de distintas especies de MNT en suelos pampeanos

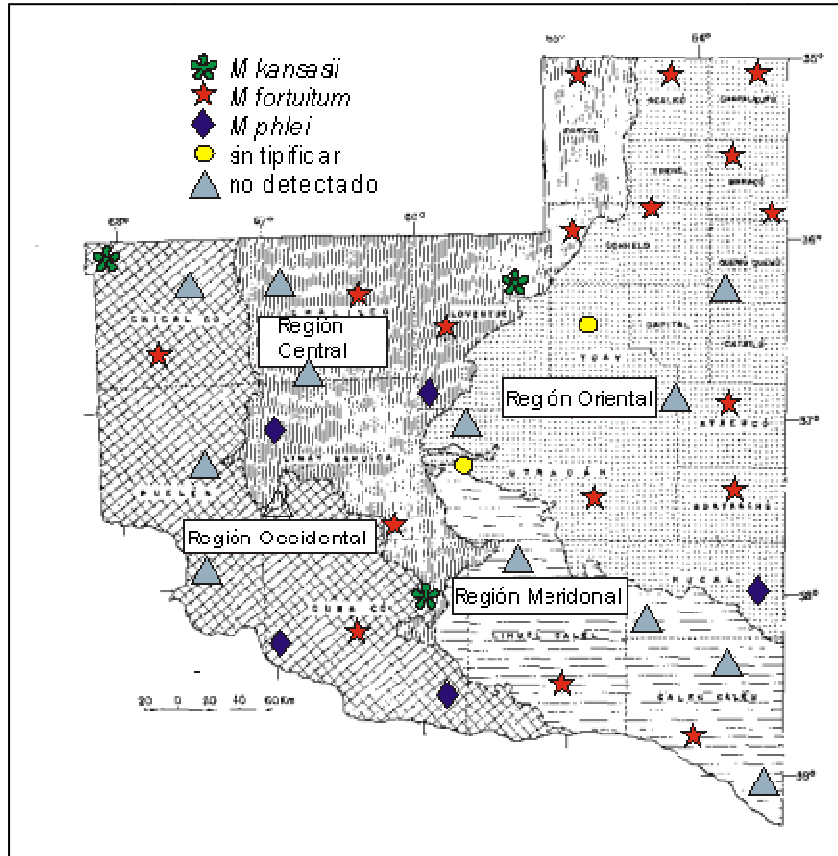


Foto 1. Desarrollo de *M. fortuitum*



Foto 2. Desarrollo de *M. phlei*



Tabla 1. Visualización de prueba de potencia en varios cobayos sensibilizado con *M. bovis*, posterior descarga de PPD bovino y PPDs *M. fortuitum*

PPD	1PPD bovino	2 PPD bovino	3 PPD bovino	
Lectura mm	21	17	14	
Dilución	1/200	1/1000	1/5000	
PPD	6 PPD <i>fortuitum</i>	5 PPD <i>fortuitum</i>	4 PPD <i>fortuitum</i>	
Lectura mm	4	6	7	
Dilución	1/200	1/1000	1/5000	
PPD	2 PPD bovino	3 PPD bovino	6 PPD <i>fortuitum</i>	
Lectura mm	17	13	8	
Dilución	1/1000	1/5000	1/5000	
PPD	4 PPD <i>fortuitum</i>	5 PPD <i>fortuitum</i>	6 <i>fortuitum</i>	
Lectura mm	16	12	10	
Dilución	1/200	1/1000	1/5000	
PPD	1PPD bovino	4 PPD <i>fortuitum</i>	5 PPD <i>fortuitum</i>	
Lectura mm	22	8	6	
Dilución	1/200	1/200	1/5000	
PPD	5 PPD <i>fortuitum</i>	1 PPD bovino	4 PPD <i>fortuitum</i>	
Lectura mm	-	23	9	
Dilución	1/1000	1/200	1/200	
PPD	4PPD <i>fortuitum</i>	1 PPD bovino	5 PPD <i>fortuitum</i>	
Lectura mm	12	18	10	
Dilución	1/200	1/200	1/1000	

Tabla 2. Visualización de prueba de potencia en varios cobayos sensibilizado con *M. bovis*, con posterior descarga de PPD bovino y PPDs *M. phlei*.

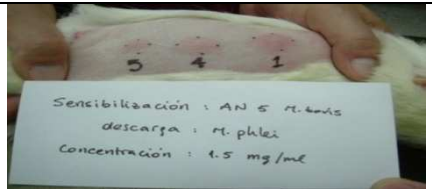
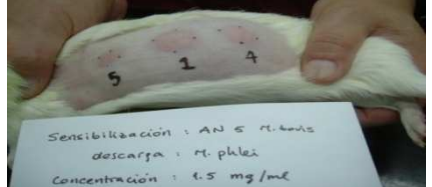


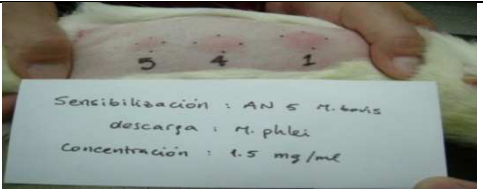
PPD	5 PPD <i>phlei</i>	4 PPD <i>phlei</i>	1 PPD bovino	
Lectura mm	9	22	12	
Dilución	1/1000	1/200	1/200	
PPD	5 PPD <i>phlei</i>	1 PPD bovino	4 PPD <i>phlei</i>	
Lectura mm	5	20	10	
Dilución	1/1000	1/200	1/200	

Tabla 3. Visualización de prueba de potencia en varios cobayos sensibilizado con *M. phlei*, con posterior descarga de PPDs *M. phlei* y PPDs *M. fortuitum* y PPD bovino

PPD	4 PPD <i>fortuitum</i>	5 PPD <i>fortuitum</i>	1 PPD bovino	
Lectura mm	17	16	15	
Dilución	1/200	1/1000	1/200	
PPD	6 PPD <i>fortuitum</i>	4 PPD <i>fortuitum</i>	5 PPD <i>fortuitum</i>	
Lectura mm	8	20	16	
Dilución	1/5000	1/200	1/1000	
PPD	5 PPD <i>phlei</i>	4 PPD <i>phlei</i>	1 PPD bovino	
Lectura mm	9	22	12	
Dilución	1/1000	1/200	1/200	