

Asociación entre el diagnóstico de Tuberculosis Bovina por intradermorreacción, la anatomopatología, la bacteriología y la posible interferencia con micobacterias ambientales.

Oriani, D.S.¹; Dubarry, J.R.¹; Errea, A.L.¹; Vera, O.A.¹; Maria, A.E.¹; Cavagión, L.J.¹; Staskevich, A.S.¹; Tortone, C.¹; Buey, V.¹; dos Santos Sismeiro, M.I.¹; Mascaró, D.E.¹; Bernardelli, A.²

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa. Calle 5 y 116 (6360), General Pico. La Pampa.

²Facultad de Agronomía y Veterinaria Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta Nacional 36, Km. 601 (X5804BYA), Río Cuarto, Córdoba.

orianids@yahoo.com.ar

Resumen

Si bien la tuberculinización es la prueba diagnóstica oficial de la tuberculosis bovina, es reconocida la existencia de resultados falsos positivos y falsos negativos, instalándose entonces el interés por las micobacterias ambientales como responsables de las reacciones interespecíficas. Los objetivos del presente trabajo fueron: por un lado evaluar la asociación entre la intradermorreacción utilizada en el diagnóstico de la tuberculosis bovina, empleando PPD bovino y aviar, con los hallazgos anatomopatológicos y bacteriológicos, y por el otro, valorar la posible reacción cruzada con micobacterias ambientales empleando PPD elaboradas con *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium phlei* (PPDs) aisladas de suelos pampeanos (República Argentina). En este trabajo se tuberculinizaron 50 bovinos en el tercio medio de la tabla del cuello con tuberculina bovina, aviar y dos sensitinas elaboradas con dos cepas de micobacterias ambientales (*M. fortuitum* y *M. phlei*), a las 72 hs. se efectuó la lectura y la posterior necropsia de los reaccionantes positivos y dos animales no reaccionantes por cada bovino positivo a cualquiera de las PPD. El 6% reaccionó positivamente al PPD bovino, el 2% reaccionó al PPD aviar y el 16% reaccionaron en forma sospechosa a las micobacterias ambientales. De los tres animales que reaccionaron positivamente al PPD bovino, en dos de ellos se aisló *M. bovis* y se observó correlación con la histopatología. No se observó asociación en el diagnóstico por intradermorreacción y los parámetros establecidos al aplicar PPD aviar. Aquellos animales que mostraron

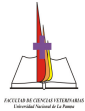
reacción sospechosa leve a los PPDs ambientales tanto a la necropsia como a los estudios anatomopatológicos y bacteriológicos no mostraron asociación con tuberculosis o micobacteriosis.

Palabras claves: Micobacterias, PPD, PPDs, Intradermorreacción, Reacción cruzada

Abstract

Association between the diagnosis of bovine tuberculosis by intradermal reaction, the anatomopathology, bacteriology and possible interference with environmental mycobacteria.

Although the tuberculin test is the official diagnosis of bovine tuberculosis, the existence of false positives and false negatives is recognized; then, the interest in environmental mycobacteria as responsible for interspecific reactions is established. The objective of this study was to evaluate the association between the intradermal reaction used in the diagnosis of bovine tuberculosis employing bovine and avian PPD with pathological and bacteriological findings and, on the other hand, assess the possible cross-reaction with environmental mycobacteria using PPD prepared with *Mycobacterium fortuitum* and *M. phlei* (PPDs) isolated from soils from La Pampa (Argentina). Fifty (50) bovines were inoculated in the neck with bovine and avian tuberculin and two sensitines made with two strains of environmental mycobacteria (*M. fortuitum* and *M. phlei*); 72 hs later the reading and the subsequent necropsy of positive reacting and two non-reacting animals for each positive bovine to any of the PPD were made. 6% of the



animals reacted positively to bovine PPD, 2% reacted to the avian PPD and 16% did suspiciously to environmental mycobacteria. Of the 3 animals which reacted positively to bovine PPD, in two of them *M. bovis* was isolated and histopathological correlation was observed. No association in the diagnosis of intradermal reaction and in the parameters established by applying avian PPD was found. Although some animals displayed a mild suspicious reaction to environmental PPDs, both necropsy and histopathological and bacteriological studies showed no association with tuberculosis or mycobacteriosis.

Key words: mycobacteria, PPD, PPDs, intradermal reaction, cross-reaction

Introducción

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa, de curso crónico ocasionada por especies del género *Mycobacterium*, que afectan a casi la totalidad de las especies animales, siendo además una importante zoonosis distribuida en todo el mundo. En nuestro país las pérdidas económicas provocadas por la tuberculosis animal se calculan en 22,5 millones de dólares anuales. El género *Mycobacterium* contiene aproximadamente 100 especies incluyendo especies patógenas y saprófitas, que pueden ordenarse en tres grupos sobre la base de su significancia clínica y sin valor taxonómico (Portaels, 1995). El primer grupo comprende especies patógenas obligadas para humanos y animales tales como el complejo tuberculosis: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti* y *M. pinnipedii* y complejo lepra: *M. leprae* y *M. lepraemurium*. Estas especies generalmente no se encuentran en el ambiente. El segundo grupo comprende micobacterias potencialmente patógenas para humanos y animales, se aíslan tanto de ambientes terrestres como acuáticos pudiendo, bajo ciertas circunstancias, causar enfermedades en individuos que padecen afecciones crónicas o trastornos en el sistema inmune. Ejemplo de estos son: el complejo *Mycobacterium avium* (MAC) y el complejo *Mycobacterium avium* –

intracellulare – scrofulaceum (MAIS). El tercer grupo comprende especies saprófitas que no son patógenas o lo son esporádicamente. A las especies del segundo y tercer grupo se las denomina comúnmente como micobacterias no tuberculosas (MNT), micobacterias atípicas, *mycobacteria other than tuberculosis* (MOTT) o simplemente micobacterias ambientales (MA), cabe destacar que no presentan huésped animal primario, se encuentran en el polvo, suelo y agua, se transmiten por inhalación, ingestión e inoculación. No existe evidencia de transmisión directa entre individuos, las afecciones que producen se conocen como micobacteriosis (Falkinham III, 1996; Falkinham III, 2002).

En la práctica veterinaria la identificación de animales tuberculosos o sensibilizados con *Mycobacterium bovis*, se basa en la inoculación intradérmica de derivado proteico purificado (PPD bovino). Aquellos animales sensibilizados, en el término de 72 hs. posteriores a la intradermoinoculación, desarrollan en dicha zona eritema con tumefacción, producto de la vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, reacciones éstas que están mediadas por los linfocitos T. En contraposición en los animales no sensibilizados, no se produce una respuesta inflamatoria del tipo mencionado. Si bien la tuberculinización es la prueba diagnóstica oficial en el marco del plan de control y erradicación de la tuberculosis bovina, es reconocida la existencia de resultados falsos positivos y falsos negativos instalándose entonces el interés por las micobacterias ambientales (Jorge et al., 2005).

Desde un punto de vista aplicado, existe entre las especies de micobacterias, *Nocardia asteroides* y *Corynebacterium pyogenes* antígenos compartidos que posibilitan una respuesta celular inespecífica (Chávez and Fernández, 1976; Chávez and Guerra, 1981; Bernardelli et al., 1983; Harboe et al., 1992; Bernardelli et al., 2006). Los suelos de la provincia de La Pampa albergan especies de micobacterias ambientales de crecimiento rápido y lento que cuando fueron inoculadas en modelo animal murino mostraron capacidad para provocar lesiones de tipo granulomatoso lo

que indicaría la posible interferencia en los diagnósticos inmunológicos (Oriani and Sagardoy, 2002; Oriani and Sagardoy, 2007).

Nuestro objetivo fue establecer la relación entre el diagnóstico de tuberculosis utilizando PPD y las alteraciones macroscópicas – microscópicas junto a los hallazgos bacteriológicos, así como determinar la posible interferencia diagnóstica ocasionada por micobacterias ambientales.

Material y Métodos

En un rodeo con antecedentes de tuberculosis bovina se inocularon con los cuatro PPD, 50 animales en la tabla del

cuello, con una dosis de 0,1 mL para cada una de ellos. Los PPD fueron elaborados en el DILAB SENASA con cepa de *M. bovis* AN5 (PPD bovino), PPD aviar con la cepa DR 4 de *M. avium*, PPDs *M. fortuitum* y PPDs *M. phlei* (DILAB – SENASA, 2002). Las dos últimas cepas corresponden a aislamientos de suelos pampeanos (Oriani and Sagardoy, 2002). A las 72 h +/- 6 h se efectuó la lectura valorando el engrosamiento y la induración en el sitio de inoculación, clasificándolos en tres categorías: positivo cuando la diferencia de lectura es igual o superior a 5 mm, sospechosos cuando la diferencia oscila entre 3 y menos de 5 mm y negativo cuando es inferior a 3 mm (Jorge et al., 2005).

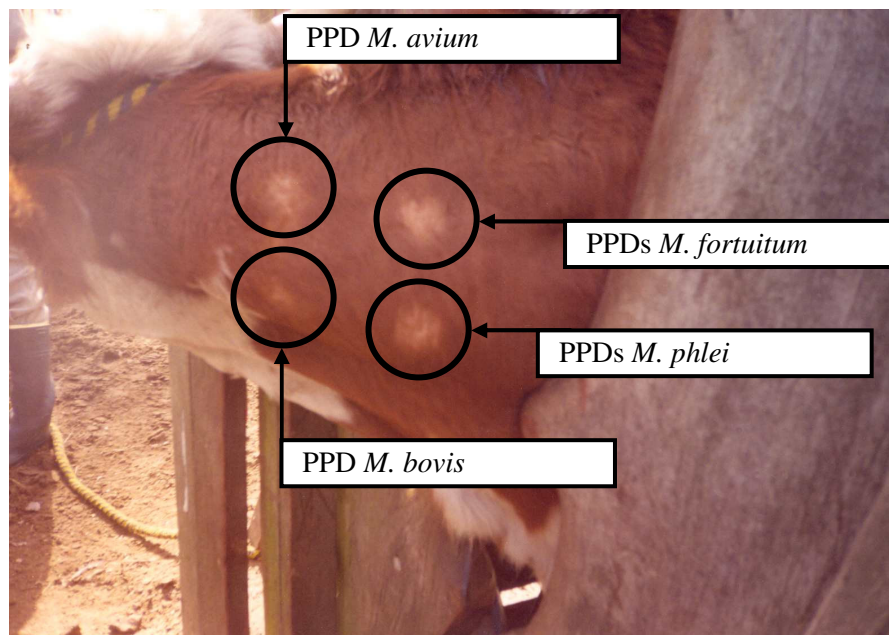


Foto 1: Sitios de inoculación en el tercio medio de la tabla del cuello

Se realizó la necropsia de los reaccionantes positivos y sospechosos a los diferentes PPD (*M. bovis*, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. phlei*) así como a 2 animales no reaccionantes por cada bovino reactivo. En aquellos animales que se observaron lesiones compatibles con tuberculosis se recolectaron las mismas, mientras que en aquellos animales que no presentaron lesiones macroscópicas se recolectaron los linfonodos de drenaje: cervicales profundos craneales, cervicales profundos medios o caudales y mediastínicos (Pellegrino et al., 1996). Las muestras para

histopatología fueron fijadas en formol al 10%, procesadas por la técnica de inclusión y corte en parafina y coloreadas con hematoxilina – eosina y tinción de Ziehl Neelsen. Por otra parte se recolectaron en forma aséptica y en recipientes estériles las muestras destinadas a bacteriología. El procesamiento incluyó la decontaminación de Petroff y posterior siembra en medios de Stonebrink y Löwenstein Jensen incubando durante 60 días a 35°C, 22°C y 42°C en presencia y ausencia de luz (Jorge et al., 2005).

Resultados

De los 50 animales tuberculinizados el 6% reaccionó positivamente al PPD bovino (3 animales). El 2% (1 animal) reaccionó positivamente al PPD aviar y el 16% (8 animales) reaccionaron en forma sospechosa a las micobacterias ambientales. De los tres animales reaccionantes positivos al PPD bovino solamente en uno de ellos (diferencia de 12 mm), se observaron lesiones compatibles con tuberculosis tanto macroscópicas como microscópicas, el hallazgo bacteriológico confirmó el diagnóstico, aislándose *Mycobacterium bovis*. De los dos animales restantes que resultaron positivos al PPD bovino, en uno de ellos se aisló una colonia compatible con *M. bovis*, la histopatología mostró reacción celular incipiente de inflamación crónica. Tanto la necropsia como la histopatología y la bacteriología correspondiente al animal que reaccionó positivamente al PPD bovino (diferencia de 5 mm) como aquel que había

presentado reacción positiva al PPD aviar (diferencia de 7 mm) no arrojaron resultados compatibles con infección por micobacterias.

De los ocho animales que mostraron leve reacción a los PPDs ambientales, 6 de ellos reaccionaron al PPD de *M. phlei* y 2 al PPD de *M. fortuitum*. La diferencia en la lectura no superó los 3 mm y en ninguno de los casos se observó induración. La necropsia de estos animales, no mostró lesiones compatibles con micobacteriosis; la histopatología y la bacteriología resultaron negativas.

Respecto a las necropsias de aquellos animales no reaccionantes, tanto la histopatología como la bacteriología de los animales no mostraron lesiones compatibles con las provocadas por micobacterias.

En ninguno de los 8 animales que presentaron reacción leve al PPDs de las micobacterias ambientales se observó reacción al PPD bovino y aviar.

Tabla 1: Datos más relevantes tras la aplicación de las cuatro PPD y posteriores estudios anatomopatológicos y bacteriológicos

Animal	Diferencia en mm/ PPD	Lesiones macroscópicas	Bacteriología	Histopatología
332	5 mm/PPD bovino	NO	<i>M. bovis</i>	Incipientes manifestaciones de inflamación crónica en ganglios mesentéricos
23	7 mm/PPD aviar	NO	NEGATIVO	NEGATIVO
264	12 mm/PPD bovino	SI	<i>M. bovis</i>	Infiltrados celulares, granulomas múltiples
274	5 mm/PPD bovino	NO	NEGATIVO	NEGATIVO
380	3,3 mm PPD fortuitum	NO	NEGATIVO	NEGATIVO
390	3,3 mm PPD phlei	NO	NEGATIVO	NEGATIVO

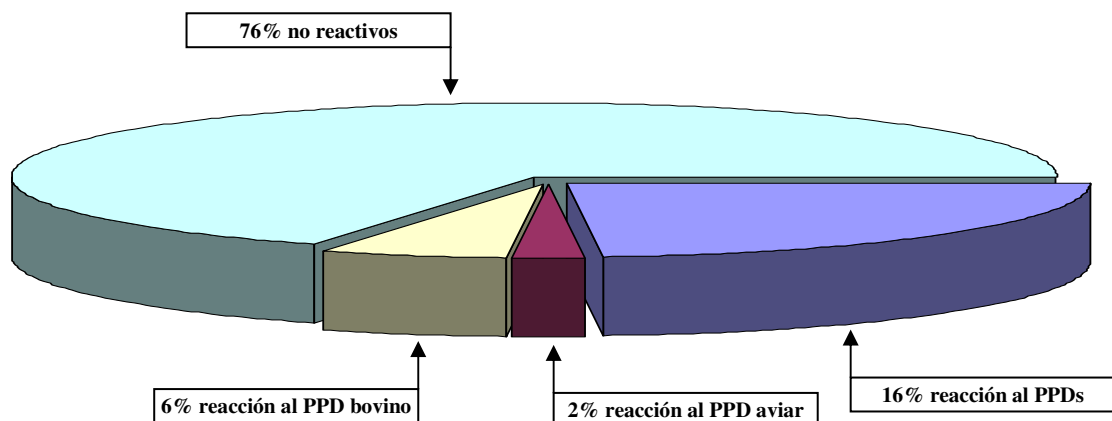
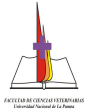


Grafico 1: Resultado de las lecturas de las inoculaciones expresados en porcentaje



Los datos fueron analizados por el EPIDAT 3.0 y arrojaron valores de sensibilidad 100% y especificidad de 97,92%. Es oportuno indicar que el alto grado de sensibilidad puede explicarse teniendo en cuenta el N empleado y la no presencia de animales falsos positivos. El índice de Youden obtenido (0,98), representa un buen valor referenciado a los datos logrados de sensibilidad y especificidad del PPD bovino.

Discusión

Respecto a la controvertida importancia de las micobacterias ambientales como responsables de reacciones cruzadas en el diagnóstico de la tuberculosis bovina por intradermoreacción utilizando PPD bovina, algunos autores consideran que las MA originan una respuesta inmune detectable por intradermoreacción (Corner and Pearson, 1978), otros consideran que solo las MA de lento crecimiento son las responsables de tales reacciones (Cooney et al., 1997), mientras que otros las responsabilizan solamente en áreas libres de tuberculosis bovina (Chávez and Guerra, 1981). Sin embargo hay quienes sostienen que las micobacterias ambientales tienen poca importancia como agentes sensibilizantes para-específicos a la PPD bovina (Kantor et al., 1978). Estas investigaciones se efectuaron sin emplear sensitinas homologas a las micobacterias residentes en el área de estudio y surgieron de comparaciones entre los resultados de DDP y el aislamiento de MA de distintos sitios del animal ya sea en ganglios linfáticos o en secreciones del sistema respiratorio.

Nuestros resultados coinciden con los presentados por Cooney et al (1997) debido a que la valoración de la posible reacción cruzada entre las MA y el PPD bovino se realizó utilizando PPDs de micobacterias de rápido desarrollo.

Nuestros datos referidos a la eficacia comparativa de los distintos métodos diagnósticos de la tuberculosis bovina coinciden con aquellos publicados por Sánchez and Remom (1981) y Kantor et al (1984).

La falta de concordancia en los animales (N° 23 y 274) que mostraron reacción

positiva ya sea al PPD aviar o al PPD bovino y los cuales no presentaron lesiones compatibles con inflamación crónica ni se aislaron MA, podemos explicarla sobre la base de la mayor sensibilidad diagnóstica de la prueba intradérmica cuando se aplica en la tabla de cuello que en pliegue anocaudal (Radostist et al., 1998).

Conclusiones

En nuestro estudio los resultados obtenidos respecto a la tuberculosis bovina concuerdan con los obtenidos en la zona por Dubarry et al (2003) donde evidencian una prevalencia del 4% sobre las alteraciones anatomopatológicas.

Se observó una asociación del 66,6% entre la prueba de intradermoreacción con PPD bovino y el aislamiento del agente etiológico y no hubo reacciones cruzadas con micobacterias ambientales.

La asociación entre la anatomopatología macroscópica con respecto a la intradermoreacción utilizando PPD bovina fue del 33,3% y del 50% con el aislamiento de *M. bovis*.

No hubo asociación entre el PPD aviar y los demás métodos de diagnóstico empleados en este estudio.

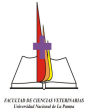
La falta de aislamiento y de lesiones tanto macroscópicas como microscópicas en uno de los reaccionantes positivos al PPD bovino como al PPD aviar pueden deberse a la mayor sensibilidad de la prueba cervical o a la presencia de bacilos en estado de latencia (Alito, 2008).

Es necesario aumentar el número de inoculaciones y continuar con los estudios anatomopatológicos y bacteriológicos de los animales reaccionantes a las mismas para poder establecer en la región pampeana la especificidad y sensibilidad de las tuberculinas empleadas en el diagnóstico de la tuberculosis bovina.

Bibliografía

Alito, A. 2008. Antígenos de latencia en la tuberculosis bovina. AAVLD XVII Reunión Científica Técnica pag 37.

Bernardelli, A.; Navarro, N.; Kantor, I. N. 1983. Especificidad de algunas sensitinas micobacterianas. *Rev. Arg. Tub. Enf. Pulm. Sal. Publ.* 44:5-10.



- Bernardelli, A.; Oriani, D. S.; Alonso, B. 2006.** Elaboración y prueba de potencia de sensitinas correspondientes a *Mycobacterium phlei* y *Mycobacterium fortuitum* aisladas de suelos pampeanos. AAVLD, Mar del Plata.
- Chávez, P. R.; Fernández, A. 1976.** Sensibilidad inespecífica a la tuberculina mamífera en los bovinos en Cuba. *Rev. Cub. Cienc. Vet.* 7:75-82.
- Chávez, P. R.; 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.
- Cooney, R.; Kazda, J.; Quinn, J.; Cook, B.; Müller, K.; Monaghan, M. 1997.** Environmental mycobacteria in Ireland as a source of non-specific sensitisation to tuberculin. *Irish Vet. Times* 50:370-373.
- Corner, L. A.; 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.
- Cotrina, N. 1987.** Epizootiología de la tuberculosis bovina. Ed Científica y Técnica. La Habana, Cuba. P 1-134
- DILAB – SENASA. 2002.** Manual de Procedimientos Técnicos – Producción y Control de Tuberculina Bovina – Derivado Proteico Purificado (DPP) *Manual MP22.*
- Dubarry, J. R.; Alvarez, A. R.; Errea, A. L.; Hierro, J. A.; Medina, A.; Pechín, G.; Risi, R.; Vera, O. A.; Véspoli Pucheu, M. V. 2003.** Tuberculosis Bovina: Relación de Proporciones entre los Diagnósticos Anatomopatológicos Macroscópicos y Microscópicos. IIIº Jornada de Ciencia y Técnica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa pág. 18.
- Falkinham III, J. O. (1996) Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 9:177-215.
- Falkinham III, J. O. 2002.** Nontuberculous mycobacteria in the environmental. *Clin. Chest. Med* 23 (2002) pp529-551.
- Harboe, M.; Wiker, H.; Nagai, S. 1992.** Protein Antigens of Mycobacteria Studied by Quantitative Immunologic Techniques. *Clin. Infect. Dis.* 14:313-319.
- Jorge, C.; Alito, A.; Bernardelli, A.; Canal, A.; Cataldi, A.; Cicuta, M.; Gentile, F.; Kistermann, J.; Magnano, G.; Martínez Vivot, M.; Oriani, D. S.; Paolicchi, F.; Romano, I.; Schneider, M.; Torres, P.; Zumárraga, J. 2005.** Manual de Diagnóstico de Micobacterias de Importancia en Medicina Veterinaria. Ed. AAVLD.
- Kantor, I., Bioch, D., Roswurm, J.D. 1978.** Mycobacteria isolated from nasal secretions of tuberculin test reactor cattle. *Am. J. Vet. Res.* 39:1233-1234..
- Kantor, I.; Odeón, A.; Steffan, P.; Auza, M.; Madrid, C.; Marchevsky, N. 1984.** Sensitivity of cervical and caudal fold tuberculin tests with *Mycobacterium bovis* in infected cattle of Argentina. *Rev. sci.tech. Off.int.Epiz.* 3(1):137-150.
- Oriani, D. S.; Sagardoy, M. A. 2002.** Nontuberculous mycobacteria in soils of La Pampa province (Argentina). *Rev. Arg. Microbiol.* 34:132-137.
- Oriani, D. S.; Sagardoy, M. A. 2007.** Lesiones en *Mus musculus* inoculados con *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium kansasii* y *Mycobacterium fortuitum* aislados de suelos pampeanos (República Argentina). *In Vet.* 9(1):43-51.
- Pellegrino, F.; Oliva, G.; Carfagnini, J.; Kantor, I.; Pinto, S.; Underwood, S.; Reiniero, A.; Puentes, A.; Torres, P.; Alvarez Peralta, E. 1996.** Bases Anatómicas para los Criterios de Decomiso Parcial por Tuberculosis en Bovinos. *Rev. Med. Vet.* 77(4):241-246.
- Portaels, F. 1995.** Epidemiology of mycobacterial diseases. *Clin. Dermatol.* 13:207-222.
- Radostist, D.; Blood, D.; Gay, C. 1998.** Veterinary Medicine. 8ª. Ed. Ed Bailliere Tindal. London UK.1763 p.
- Sánchez, I.; Remom, S. 1981.** Eficacia comparativa entre diferentes métodos diagnósticos de la tuberculosis bovina. *Rvta. Cub. Cienc. Vet.* 12:245-248.