

Tuberculosis Bovina: Valoración de la Inmunohistoquímica Como Método de Diagnóstico Complementario

Dubarry, J.

Cátedra de Patología General, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam.

RESUMEN

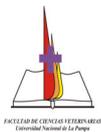
Se analiza el valor de la inmunohistoquímica como método para ajustar los datos estadísticos de la tuberculosis bovina en la provincia de La Pampa, estimados en base a los decomisos en frigorífico. Se aplicó la técnica de inmunohistoquímica a las muestras obtenidas en dos trabajos anteriores, fijadas en formol e incluidas en parafina. Se comparó la frecuencia de los diagnósticos efectuados en dicho estudio: anatomopatológico macroscópico, anatomopatológico microscópico y bacteriológico positivos para dicha enfermedad, con los que lo fueron aplicando la inmunohistoquímica. Las lesiones compatibles macroscópicamente con tuberculosis, se confirmaron por bacteriología en un 50,33%, por histopatología en un 69,80% y por inmunohistoquímica en un 72,49%. Esta diferencia positiva en cuanto a la inmunohistoquímica se atribuye a la presencia de granulomas tuberculosos con morfología atípica (abscesos inespecíficos). Este trabajo reafirma el gran valor de la inspección macroscópica, por sus características operativas, su carácter de irremplazable por otras técnicas más trabajosas y que necesitan mayor tiempo para su desarrollo, pero demuestra la importancia de la aplicación de la inmunohistoquímica para la corrección de estadísticas y el seguimiento de los planes sanitarios, a través de muestreos regionales.

Palabras clave: Tuberculosis, bovinos, prevalencia, inspección en la faena, inmunohistoquímica.

SUMMARY

On analysed the immunohistochemistry value as a method for adjusted the statistic of bovine tuberculosis in La Pampa province of Argentine which was estimated trough the macroscopic diagnosis in the slaughterhouse inspection. On applicated the immunohistochemistry technique to the formol-fixed and paraffin-embedded tissue samples obtained in two back works. The macroscopic compatible lesions as tuberculosis were confirmed by bacteriology in an 50,33%, by histopathology in an 69,80% and by immunohistochemistry in an 72,49%. This positive difference in order to immunohistochemistry is attributed to the atypical tuberculosis granuloma morphology (an specific abscess). This work enhances the grate value of the gross inspection, trough this easy and rapid operative condition, but demonstrate the importance of the immunohistochemistry technique for the stadistic correction and for the epidemiological vigilance, trough regional samples.

Key Words: Bovine tuberculosis, immunohistochemistry, slaughterhouse inspection, positive predictive value.



INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad zoonótica que afecta a un gran número de especies animales, causada por bacterias representantes del género *Mycobacterium* (Acha y Cifres, 1989). La Argentina cuenta con un plan de control y erradicación consistente en la eliminación de los animales reactivos a la prueba tuberculínica. La adopción de este plan se justificó por la importancia de la enfermedad en la Salud Pública como así también por su importancia económica ya que es considerada en la actualidad como una de las enfermedades más importantes, (aumento de la infección por *M. bovis* en el hombre). En la provincia de Santa Fe el 6% de los casos de tuberculosis en los seres humanos son debidos a *M. bovis* (Cantor y Bernardelli, 1987; Kantor y Ritacco, 1994; O'Reilly y Daborn, 1995). Su incidencia es negativa sobre la producción de carne y leche, así como sobre la inserción en mercados externos, que en la actualidad, exigen la ausencia de bacterias patógenas o fracciones de las mismas, para los productos y subproductos de origen animal.

En la Argentina se estima que la prevalencia de la enfermedad en el ganado bovino es del 6% (Cuando la estimación se hizo mediante la prueba de tuberculina comparativa fue del 4,3%.) y el porcentaje de rodeos infectados se eleva al 38%.

Los datos son parciales, referidos a determinadas provincias y en la mayoría de los casos las cifras corresponden a hallazgos en frigoríficos. Con referencia a estos últimos, la correlación entre al diagnóstico macroscópico y microscópico varió entre el 54 y el 90%.

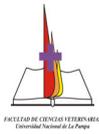
Para el Plan de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina uno de los aspectos más importantes es la vigilancia epidemiológica (Kantor y Ritacco, 1994; SENASA, 1999), cuyo punto de partida es la detección de animales enfermos mediante el diagnóstico anatomopatológico macroscópico en las plantas faenadoras. Para hacer confiables estos datos es necesario confirmarlos mediante estudios específicos.

Para nuestra ganadería y por lo tanto para la salud pública, la enfermedad constituye un serio problema y al no haber zonas libres en las regiones más importantes de explotación bovina, los animales enfermos circulan sin restricciones manteniendo el ambiente contaminado y constituyendo una amenaza para el bienestar humano y animal.

La identificación del agente etiológico es considerado el diagnóstico definitivo, mientras que los otros utilizados son presuntivos. La inspección en matadero es un método operativo en el cual se basan las estadísticas con que contamos y su utilidad como diagnóstico de la tuberculosis varía de acuerdo con la calidad de la inspección y la prevalencia de la enfermedad, no obstante es un diagnóstico de carácter presuntivo (Adams, 2001). Por eso es preciso ajustar el diagnóstico con pruebas de mayor especificidad que permitan confirmar los verdaderos positivos y los falsos negativos, sin discutir la validez de la inspección en matadero como método diagnóstico de tuberculosis en todas las especies.

En un proyecto anterior: "Tuberculosis bovina: correlación entre los diagnósticos macroscópicos y microscópicos" se realizaron los estudios histopatológicos y bacteriológicos de las lesiones de los órganos decomisados por tuberculosis en un frigorífico de la zona norte de la provincia de La Pampa. La gran diferencia entre los datos obtenidos (50,33% cultivos positivos versus 69,04% positivos histopatológicos) planteó la duda respecto a la pérdida de viabilidad de los *mycobacterium* por diferentes causas.

Para confirmar o descartar esta hipótesis, se proyectó aplicar la técnica de inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos monoclonales para la detección de antígenos del *M. Bovis*.



El fundamento de la técnica de tinción por inmunohistoquímica (IHQ) es detectar los antígenos que se encuentren en los tejidos, evidenciados por la formación de un complejo antígeno anticuerpo que se visualiza con el uso de un microscopio estándar. La sensibilidad de las técnicas de inmunohistoquímica fue mejorada significativamente con el desarrollo de distintos métodos. Al comienzo se aplicaba el anticuerpo marcado con una enzima que por una reacción colorimétrica revelaba la presencia del antígeno. Luego se aplicaron distintos métodos indirectos que aumentaban notoriamente la posibilidad de ver esta reacción con el antígeno, haciéndolos más sensibles. La producción de anticuerpos monoclonales, aumentaron la especificidad de la prueba. Los resultados de esta publicación se obtuvieron aplicando la técnica donde un anticuerpo secundario formado por un polímero unido a varias moléculas de peroxidasa revelan la presencia del antígeno unido al anticuerpo monoclonal anti-Mycobacterium bovis, es decir es ampliamente sensible y específica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se aplicó la técnica de inmunohistoquímica para el diagnóstico de Mycobacterium bovis a todas las muestras de órganos con lesiones macroscópicas compatibles con tuberculosis, obtenidas para desarrollar un trabajo anterior, fijadas en formol e incluidas en parafina.

Se utilizó el método indirecto, que consiste en unir el antígeno tisular con el anticuerpo monoclonal anti-Mycobacterium bovis obtenido en conejo (anticuerpo primario) (Dako). Luego se enfrenta con un anticuerpo secundario anti inmunoglobulina de conejo unido a un polímero que contiene varias moléculas de enzima peroxidasa (Dako. Envision). Por último se revela con un reactivo cromógeno que contiene el agua oxigenada (Dako).

Los cortes teñidos y montados en bálsamo de Canadá se diagnosticaron con un microscopio óptico.

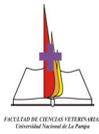
RESULTADOS

Las muestras positivas a la histopatología y a la bacteriología resultaron positivas a la inmunohistoquímica en un 100%. Las muestras positivas a la histopatología y negativas a la bacteriología resultaron positivas a la inmunohistoquímica en un 100%. Las muestras negativas a la histopatología fueron positivas por inmunohistoquímica en un 2,69%.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Cuando se propone un Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina, como el que comenzó a implementarse hace unos años en la República Argentina (Kantor y Ritacco, 1994; SENASA, 1999), se debe partir del conocimiento de la prevalencia inicial de la enfermedad, para la posterior evaluación del efecto de dicho proyecto.

Para esto se parte de muchas indefiniciones, como son la falta de relación entre los resultados de la prueba de tuberculina y los animales verdaderamente infectados, ya que algunos tuberculino positivos han tenido contacto con otras micobacterias sin estar infectados con el Mycobacterium bovis (Adams, 2001). Asimismo, no todos los



animales tuberculino negativos lo son realmente, como en el caso de las anergias por tuberculosis generalizadas.

Para mejorar la estimación de la prevalencia, se consideraron los datos arrojados por los decomisos en los frigoríficos atribuidos a esta enfermedad. Y para acercarse más a la realidad se compararon estos datos con el diagnóstico anatomopatológico microscópico en distintas regiones del país, dando disparidad de relaciones.

Ante esto y en trabajos anteriores esbozamos y comprobamos la hipótesis que al realizar un mayor número de muestras de cada carcasa decomisada por tuberculosis, aumentamos la probabilidad de encontrar una lesión morfológicamente compatible (Jubb et al., 1990; SENASA, 1999; Dubarry et al., 2003). También relacionamos los diagnósticos anatomopatológicos tanto macroscópicos como microscópicos con los diagnósticos bacteriológicos positivos al cultivo en medio de Stone Brink (Kantor y Bernardelli, 1987). Los datos obtenidos arrojaron una diferencia importante entre los histopatológicamente positivos y los que lo fueron por bacteriología (aproximadamente un 19% menos en este último caso). Esto podría ser debido a la pérdida de viabilidad del *Mycobacterium bovis*, pero oscurecía la confiabilidad en el método histopatológico.

Así es que se decidió aplicar la técnica de inmunohistoquímica, que fue criticada en trabajos anteriores como poco específica, en los que se utilizaban anticuerpos policlonales que no diferenciaban entre las distintas especies de micobacterias (Coetsier et al., 2000) e incluso reaccionaba con antígenos del *Mycoplasma* spp. Pero la elegimos ya que se solucionó este inconveniente mediante la obtención de un anticuerpo monoclonal para *Mycobacterium bovis*. Además y a pesar que es un antígeno de gran tamaño, se mejoró la sensibilidad de la prueba mediante el uso de un anticuerpo secundario unido a un polímero de gran tamaño, que permite visualizar fácilmente la presencia del antígeno, aún cuando está en poca cantidad. Otra crítica que tenía en cuanto a su especificidad era que también se coloreaban tejidos como el cartílago, el conectivo y el endotelio, pero la ubicación intramacrofágica, así como en forma libre en las distintas regiones del interior del granuloma, nos permiten diferenciar claramente al antígeno.

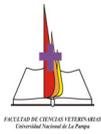
Los resultados obtenidos evidencian que la inmunohistoquímica es más sensible que los diagnósticos que utilizan técnicas tales como la tinción de los tejidos con Ziehl-Neelsen y que los cultivos bacterianos. También es más sensible que el diagnóstico histopatológico ya que detecta aquellas lesiones con morfología atípica para un granuloma tuberculoso, como en los casos de los abscesos inespecíficos (Jubb et al., 1990; SENASA, 1999; Dubarry et al., 2003).

Tiene la ventaja de ser un método rápido, de bajo costo y con mayor grado de bioseguridad con respecto a los cultivos.

La conclusión es que es una prueba recomendada para confirmar los casos diagnosticados macroscópicamente en la faena y así dar valor real a las estadísticas regionales.

BIBLIOGRAFÍA

- Acha, P.; Szyfres, B. 1989.** Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. OPSIOMS, Publicación Científica, 503, pág. 98.
- Jubb, S., Kennedy, K., Palmer, N. 1990.** Patología de los animales domésticos, 3ra. ed., Agropecuaria Hemisferio Sur, Montevideo, pag. 561.
- Kantor, L.; Bernardelli, A. 1987.** Identificación preliminar de micobacterias aisladas en muestras de origen humano o animal. Revista Medicina Veterinaria, 68: 86.



Facultad de Ciencias Veterinarias
General Pico - La Pampa, República Argentina

- Kantor, L.; Ritacco, V. 1994.** Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. *Veterinary Microbiology*, 40: 5.
- O'Reilly, M.; Daborn C. J. 1995.** The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle and Lung Disease* 76 (Suppl. 1) 1.
- SENASA. 1999.** Servicio Nacional de Sanidad Animal. Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina. Resolución N° 115/1999.
- Coetsier, C; Vannuffel, P.; Blondeel, N; Deneff, J. F.; Cocito, C.; Gala, J. L. 2000.** Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium* and *M. avium* subsp. *Paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 8: 3048-3054.
- Adams, L. G. 2001.** In vivo and in vitro diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection. *Review Science Technology*, 20 (1): 304-324.
- Kim, J. H; Sohn, H. J.; Kang, K. I; Kim, W. I; An, J. S and Jean, Y. H. 2002.** *Mycobacterium bovis* infection in a Farmed Elk in Korea. *Journal Veterinary Science*, 3: 163-166.
- 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 macroscópico y microscópico". "III Jornadas de Ciencia y Técnica", Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam. General Pico, 28 de Noviembre de 2003.