

TOMO LIX

**ACADEMIA NACIONAL
DE AGRONOMIA Y VETERINARIA**

ISSN 0327-8093

BUENOS AIRES

REPUBLICA ARGENTINA

**Progresos en las técnicas de
diagnóstico de la Tuberculosis
bovina y su importancia para la lucha
contra esta zoonosis**

**Dres. B. J. Carrillo, J. J. Pereira
y S. Garbaccio**



Sesión Pública Extraordinaria
del
13 de Octubre de 2005

Presentación por el Académico de Número Dr. Bernardo J. Carrillo.

Progresos en las técnicas de diagnóstico de la Tuberculosis bovina y su importancia para la lucha contra esta zoonosis

**Señores Académicos
Señoras y Señores.**

Ante todo agradezco vuestra amable presencia en nombre propio y de los coautores acompañantes, esperando que esta presentación sea de vuestro interés.

Han aparecido en los últimos diez o quince años una serie de enfermedades que afectan al ser humano denominadas emergentes o reemergentes y muchas de estas tienen su origen en los animales por lo cual se caracterizan como "zoonosis emergentes" (6). Este es un tema que está muy de actualidad y que está impulsado por las condiciones o factores de un mundo globalizado, con el aumento de la población mundial, el movimiento de personas, animales y productos de un continente a otro, disturbios ambientales y también cambios de los sistemas productivos para obtener mayor eficiencia, etc.; ejemplos de ellas las tenemos en las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (TSE) (6), o en la actual epidemia de la especie humana. Es así que la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) está organizando una conferencia internacional para el año 2006 dedicada al análisis y propuestas para la prevención y control de las zoonosis emergentes y reemergentes (9).

Algunas enfermedades tradicionalmente endémicas como es el caso de la Tuberculosis pueden en determinadas circunstancias aumentar su incidencia debido a la aparición de cepas antibioticomultiresistentes o al establecimiento de reservorios silvestres, etc. y así se convierten en enfermedades reemergentes exigiendo un esfuerzo conjunto de los sistemas de Salud Pública y de Sanidad Animal (1)

Al respecto se estima, según Abalos y asociados, que entre los años 2002 y 2020 aproximadamente 1000 millones de personas se infectarán de tuberculosis, más de 150 millones desarrollarán la enfermedad y 36 millones podrían morir de tuberculosis (1).

Esta enfermedad, conocida desde antaño, es producida por el *Mycobacterium tuberculosis* que afecta principalmente al ser humano y ahora que su incidencia está en aumento es considerada como una enfermedad reemergente (4) (11) (12).

El *Mycobacterium bovis* que produce la enfermedad en el bovino, puede también afectar a otras especies y entre ellas a la especie humana, ello nos hace considerarla como una zoonosis clásica ya que se transmite naturalmente

entre los animales y el hombre. Es así que el bacilo bovino es capaz de infectar un espectro muy amplio de huéspedes lo que puede generar nuevos reservorios y entorpecer el control de la enfermedad. (3) (7).

La pasteurización de la leche y la inspección veterinaria en principio disminuyen el riesgo para la salud humana, pero en los países donde no existen medidas efectivas de control la enfermedad bovina aún causa pérdidas importantes en la producción y trabas al comercio exterior. (7)

El control de la tuberculosis bovina está basado en un diagnóstico oportuno y la eliminación de los animales reactivos como así también complementarse con un seguimiento y vigilancia de los animales contactos, expuestos en el rebaño. (1) (2) (5).

Como desafíos para los programas de control se encuentra el desarrollo de nuevas técnicas para el diagnóstico de la infección en las poblaciones y la aplicación de modernas técnicas biotecnológicas, especialmente cuando la prevalencia de la enfermedad ha llegado a niveles mínimos. (1) (3).

Es así que la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria ha apoyado el desarrollo de este Proyecto por una parte como estímulo para la investigación diagnóstica de esta importancia zoonosis y además como una modesta contribución para el diagnóstico y control de la enfermedad en los bovinos. Con la intención de aportar nuevos resultados y complementar información de otros grupos de investigación del país que trabajan y producen información de progresos sobre esta enfermedad. (7) (8) (10).

Este Proyecto se desarrolló en el Instituto de Patobiología del INTA, Castelar, interactuando con los investigadores del Instituto de Biotecnología del citado Centro, siendo el investigador responsable el Dr. Sergio G. Garbaccio, que a continuación presentará los resultados obtenidos y mencionará la nómina del personal técnico y auxiliar que tuvo responsabilidad en las diversas áreas del Proyecto.

Actuaron como consultores de la AIEA los Dres. G. Adems, Mo. Salman y J. Poliock.

Dejaré ahora en uso de la palabra al Dr. Jorge Pereira quien informará sobre la gestión y coparticipación institucional de este Proyecto.

Muchas gracias.

Presentación de las investigaciones realizadas

Dr. M.V. Jorge J. Pereira

**Sr. Presidente,
Sres. Académicos,
Señoras y Señores:**

Para iniciar esta Reunión Técnica deseo hacer mención a lo expresado por el Biólogo Norteamericano de origen ruso Dr. Selman Abraham Waksman al recibir el Premio Nóbel de Medicina en el año 1952 como consecuencia de haber sido el descubridor de la Estreptomicina – en esa oportunidad dijo textualmente “LA VIEJA ENFERMEDAD DE LA HUMANIDAD CONOCIDA COMO TISIS, LA GRAN PESTE BLANCA, TUBERCULOSIS O CUALQUIER OTRO NOMBRE QUE LA IDENTIFIQUE , ESTÁ POR SER CONTROLADA Y SER UN PROBLEMA IRRELEVANTE PARA EL HOMBRE.

EL FUTURO SERA BRILLANTE Y LA COMPLETA ERRADICACIÓN DE ESTA ZOONOSIS, PERMITIRA VER UN HORIZONTE DESPEJADO EN LO QUE HACE A LA SALUD HUMANA”. Esto lo dijo hace medio siglo.

Nuestra realidad hoy y la de otras sociedades están indicando lamentablemente otra cosa.

Basta con recordar que 1/3 de la población humana es TB latente, que el 27% de los enfermos tuberculosos son HIV positivos y que es la primera CAUSA INFECCIOSA de muerte en el hombre adulto para comprender que nuestra realidad al día de hoy no acompaña la esperanza del Dr. Waksman.

Al respecto la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria viene demostrando una permanente preocupación que ha puesto de manifiesto en todo aquello que hace a la problemática de la Sanidad Animal y Salud Pública en el país, basta con retrotraernos a un hecho puntual acontecido en la década de los 90, cuando invita entre otras organizaciones al INTA a compartir una reunión cuyo OBJETIVO SUSTANTIVO fue el de instrumentar un “Mecanismo de Coordinación Inter-Institucional” que permitiera crear un Comité Técnico Permanente para contribuir al conocimiento de la Epidemiología, Prevención y Control de las Enfermedades Zoonóticas.

A partir de esa iniciativa es que un equipo de Investigadores del Centro Nacional que el INTA posee en Castelar conjuntamente con la ANAV, inician un proyecto específico sobre la búsqueda de nuevas “Técnicas Complementarias” para el Diagnóstico de una de esas Zoonosis como es la Tuberculosis Bovina.

Es así como se inició una línea de investigación permanentemente asistida por la Academia hasta la fecha probando y comparando técnicas directas e indirectas como fue el caso de Elisa, Gamma Interferón, bacterioscopía e histopatología entre otras en Bovinos.

En ese incesante sondeo de actividades de investigación y gracias a una “Extensión” de la temática sustantiva inicial, es que a principios de esta década el INTA conjuntamente con la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria (ANAV) y la participación decisiva de la Agencia Internacional de Energía

Atómica (IAEA) de Viena , ponen en marcha un Proyecto de Investigación relacionado con el “ MEJORAMIENTO DEL DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA. DESARROLLO DE NUEVAS TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS”. En este caso utilizando PCR.

La finalidad del mismo fue la de desarrollar Técnicas Complementarias a la PPD para el Diagnóstico de esta noxa en bovinos con el mayor grado de sensibilidad y especificidad posible, que ayuden a su control y posterior erradicación de los rodeos de nuestro País.

Fue así que se ejecutaron en el Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas en Castelar, acciones a nivel de laboratorio como así también de campo y en frigoríficos.

Esta extensión del Proyecto primario tuvo sus inicios en el año 2000 y permitió concretar 5 actividades sustantivas:

- * Adquisición de equipamiento de última generación indispensable para trabajos de investigación a nivel de laboratorios en los Institutos de Patobiología y Biotecnología.
- * Capacitación y actualización de Investigadores participantes de ese Proyecto tanto en EE.UU como en Europa.
- * Consultorias Internacionales, monitoreos técnicos y auditorías administrativo-contables durante el desarrollo de las actividades del Proyecto.
- * Concreción de trabajos específicos sobre animales vivos en establecimientos de leche y carne y seguimiento y obtención de muestras a nivel de frigoríficos.
- * Procesamiento, resultados, análisis e interpretación en laboratorios del material obtenido de animales vivos o faenados para tal fin.

BIBLIOGRAFIA

1. Abalos P. y Retamal, P.- Tuberculosis: ¿una zoonosis reemergente?. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2004, 23 (2), 583-594.
2. Adams, L. (2001) - In vivo and in vitro diagnosis Mycobacterium bovis infection. In fecciones micobacterianas en animales domésticos y salvajes (E.J.B. Manning & M.T. Collins, edit.). Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 20 (1), 304 - 324.
3. Anon. (2004) - Defining a new strategy on bovine TB - DEFRA takes the first step. Vet. Rec. 154, 186 - 187.
4. Collins, c. (2000) - The bovine tubercle bacillus. Br. J. Biomed. 57, 234 - 240.
5. Cousins, D. V. (2001) - Mycobacterium bovis infection and control in domestic livestock. En infecciones bacterianas en animales domésticos y salvajes (E.J.B. Manning & M.T. Collins, edit.). Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 20 (1), 71 - 85.
6. Brown, C. - Emerging zoonosis and pathogens of public health significance - an overview. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2004, 23 (2), 435 - 442.
7. Ritacco, V., Latini, M.D.S.; Torres, P.; Pérez, A. M.; Latini, O.; Kantor, I. N. de. - Tendencia de la infección por Mycobacterium bovis en ganado domestico y el hombre en la Argentina. Rev. Arg. Zoo. Vol. II, (2), 53 - 62, 2005.
8. SENASA - Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina. Resoluc. N° 115/99.
9. Vallat, B. - Zoonosis y Patógenos emergentes de importancia para la Salud Pública. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2004, 23, (2), 426 - 427.
10. Ritacco, V. - Mycobacteriosis transmitidas al hombre: Diagnostico. En Cacchione, R. A., Durlach, R., Larghi, O. P. Temas de Zoonosis, Bs. As. 2004, p. 228 - 234.
11. Schmitt, B., Henderson, L. - Diagnostic tools for animal diseases. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2005, 24 (1), 243 - 250.
12. Organización Mundial de la Salud (OMS) (2004) - Tuberculosis. Fact. Sheet N° 104 - <http://www.who.int>. Sitio accedido el 12 - 09 - 2004.

Mejoramiento del diagnóstico de la tuberculosis bovina a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Garbaccio S¹, Rodriguez L¹, Zumarraga M², Venzano A¹, Miquet J¹, Villa L¹, Pattini M¹, Funes D¹, Cataldi A², Samartino L¹, Pereira J¹.

INTA, CICVyA, Instituto de Patobiología¹, Instituto de Biotecnología² CC 25 (CP 1712), Castelar, Buenos Aires, Argentina. sgarbaccio@cicv.inta.gov.ar

**Sr. Presidente,
Sres. Académicos,
Colegas,
Señoras y Señores:**

Resumen del proyecto

La tuberculosis es una de las enfermedades infectocontagiosas de mayor relevancia a nivel mundial. *Mycobacterium bovis* es el agente causal de la tuberculosis bovina, la cual presenta una importante implicancia en salud pública al tratarse de una zoonosis. Además causa pérdidas económicas en el sector ganadero, ocasionando una disminución en la producción (leche y carne) y restricciones de carácter comerciales en la exportación de productos y subproductos.

Actualmente el diagnóstico se basa en la prueba tuberculínica (PPD), mientras que a nivel de laboratorio se lleva a cabo la confirmación del material remitido por intermedio de cultivos, coloración específica y posteriormente pruebas bioquímicas para la tipificación del agente etiológico. Esta labor insume al menos entre 4 y 8 semanas. El diagnóstico a través de pruebas moleculares tal como PCR (reacción en Cadena de la Polimerasa), puede proveer un rápido y confiable resultado, disminuyendo de manera significativa el tiempo de confirmación (de 2 meses a 2 días), brindando así la posibilidad de tomar medidas inmediatas de control para evitar la difusión de la enfermedad en los rodeos.

Introducción:

La tuberculosis bovina, cuyo agente etiológico es el *Mycobacterium bovis*, es una enfermedad infecciosa de carácter zoonótico, que ocasiona serios problemas en salud pública. Una estimación global realizada por PAHO/WHO (1) describe que, 7000 nuevos casos de tuberculosis humana debido a *Mycobacterium bovis*, son esperados en América Latina por año; un promedio aproximado de 2/100.000 habitantes.

En el sector ganadero también se convierte en un grave problema de salud y pérdida en la capacidad de producción de carne y leche; convirtiéndose además en una barrera comercial en relación a la exportación de productos y subproductos.

El diagnóstico de la tuberculosis bovina es motivo de numerosos trabajos científico- técnicos, cuyo fin es mejorar el entendimiento de esta temática

y obtener nuevas metodologías en pos de un efectivo control de la enfermedad. Desde el año 1999 y a través de la resolución 115/99, se estableció el “Programa Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis y Brucelosis”. Cabe mencionar que en el caso de la tuberculosis, la prueba de referencia tanto internacional (utilizada por países libres como Estados Unidos y Canadá) como nacional, es la intradermo-reacción o prueba tuberculínica PPD. De esta manera, se propone el saneamiento con esta metodología identificando y eliminando animales reactivos, sumado a medidas correctivas en el manejo de los rodeos.

Un estudio sugiere que dicha técnica posee una sensibilidad y especificidad del 72% y 98.8% respectivamente (2).

El cultivo tradicional de *Mycobacterium bovis* es usado rutinariamente como apoyo en el diagnóstico de la tuberculosis bovina en el laboratorio a partir de diferentes muestras clínicas siendo considerada como técnica “gold standard” para la confirmación. Sin embargo, el diagnóstico microbiológico de *M. bovis* es un proceso extremadamente lento, pudiendo tomar entre 2 y 3 meses para posibilitar un resultado. Es también conocido, que la sensibilidad del cultivo no es 100%, pudiendo mostrar resultados falsos negativos. Además esta sujeta a la calidad de la muestra remitida ya que en caso de la presencia de microorganismos no-viables (por falencias de transporte o en la remisión y acondicionamiento del material), el resultado será negativo.

El estudio histopatológico es rápido lo cual permite aportar un valioso dato diagnóstico, pero cuenta con la desventaja de que otros agentes etiológicos son capaces de inducir cuadros semejantes a aquellos vistos en la tuberculosis bovina (3).

Diversos estudios han demostrado que la PCR a partir de muestras clínicas, es capaz de diagnosticar tuberculosis bovina con resultados comparables al cultivo, pero en un tiempo menor (2-3 días para PCR versus 2-6 semanas necesarias para el desarrollo en cultivos) (4-5), sin ser una limitante la viabilidad del agente etiológico en la muestra a analizar.

La finalidad de esta investigación fue optimizar y evaluar la técnica PCR a partir de muestras de hisopado nasal y leche, provenientes de animales positivos y negativos a PPD. Determinar además, la asociación entre los hallazgos de PCR y los resultados de cultivo tradicional, histopatología y presencia o ausencia de lesiones compatibles con esta enfermedad.

De esta manera se intenta contribuir de forma significativa al dinámico trabajo de saneamiento de nuestros rodeos a partir de la generación de una “herramienta” útil para enfrentar las dificultades diagnósticas de la Tuberculosis bovina.

Materiales y métodos:

La primera etapa del trabajo de campo tuvo como eje central la realización de encuentros y reuniones técnicas con profesionales Médicos Veterinarios de la actividad privada, ganaderos y otros actores del quehacer agropecuario que hicieron posible el muestreo.

Se estableció así la recolección de muestras de 100 animales provenientes de campos con algún grado de compromiso con la enfermedad y

50 bovinos provenientes de campos libres. Este parámetro fue determinado por los resultados a la prueba tuberculínica PPD obtenidos por el Veterinario acreditado en cada rodeo.

Posteriormente se procedió a individualizar cada animal reactor y a efectuar, en primer término el muestreo a campo seguido luego de la colecta de material en frigoríficos.

Trabajo de campo:

Se obtuvieron muestras por duplicado de hisopado nasal (hisopos resuspendidos en PBS1X) y leche (dos tubos tipo falcon de 50cc cada uno, comprendido de una alícuota proveniente de cada cuarto mamario). El destino de las mismas fue PCR y bacteriología. También se colectaron muestras de sangre (con y sin heparina), para conservarlas con vista a ensayos futuros.

Necropsia o frigorífico:

Los animales fueron seguidos a los distintos frigoríficos, colectando diversos tejidos involucrados en el ensayo. De esta manera, previa descripción de la presencia o ausencia de lesiones compatibles con la enfermedad en el momento de la faena, los tejidos obtenidos fueron divididos principalmente en tres mezclas diferentes de muestras:

- **Aparato Respiratorio:** Pulmón, ganglios mediastínicos y traqueobronquiales.
- **Aparato Digestivo:** Hígado, ganglio hepático y ganglios mesentéricos.
- **Cabeza:** Ganglios retrofaringeos, submandibulares y parotídeos.

Asimismo, se obtuvo material de aquel tejido que presentó a la inspección ocular lesiones compatibles con tuberculosis bovina.

De esta manera cada animal tuvo al menos seis muestras de tejidos provenientes de la necropsia y tomadas por duplicado. El destino de las mismas fue: histopatología y aislamiento bacteriológico.

El acondicionamiento del material, tanto a campo como en frigorífico fue con refrigeración a 4°C (bacteriología) y formol al 10% (histopatología).

PCR: Previa extracción del ADN, el producto fue amplificado utilizando como cebadores (Primers) la secuencia de inserción IS6110, que flanquea una región específica del «Mycobacterium Complex».

Las condiciones de amplificado se realizaron de acuerdo a lo descrito por Zumárraga y col.(6-7).

El revelado de la amplificación se realizó por medio de corrida electroforética, utilizando geles de agarosa al 2% junto a de bromuro de etidio, a voltaje constante.

Posteriormente, bajo el estímulo de la luz ultravioleta (transiluminador) se reveló el resultado, observando la disposición de las bandas caracterizadas, en relación a su peso molecular.

Bacteriología: El material recibido fue sometido al método de decontaminación indicado para micobacterias «Petroff» y posteriormente sembrado en medios

de cultivo específico: Stonebrink y Lowestein-Jensen (ambos por duplicado). Todo crecimiento, fue estudiado por microscopía a través de la tinción de Ziehl Neelsen.

Resultados:

Para la descripción de los resultados obtenidos se tuvieron en cuenta los siguientes análisis: Tuberculina - PPD, bacteriología (leche, hisopado nasal y tejidos), histopatología, presencia o ausencia de lesiones y finalmente la reacción en Cadena de la Polimerasa-PCR (hisopado nasal y leche).

Fueron analizadas 110 muestras provenientes de animales Tuberculino - positivos (Buenos Aires, Santa Fe Córdoba) y 63 bovinos provenientes de establecimientos libres (Buenos Aires).

Se evaluaron 110 muestras de hisopado nasal de las cuales, en 20 casos el resultado a PCR fue positivo, mientras que en 10 casos se obtuvo aislamiento bacteriológico. En tres bovinos hubo coincidencia entre ambos ensayos y en otros tres hubo coincidencia entre PCR de hisopado nasal y PCR en muestras de leche.

Con respecto a las muestras de leche, sobre un total de 70 muestras en 11 casos fueron los resultados positivos a PCR mientras que los aislamientos se obtuvieron en 2 casos. En 1 caso se registro coincidencia entre PCR y Bacteriología.

La histopatología coincidió en su resultado positivo con 1 bovino positivo a PCR-Hisopado nasal y otro con PCR-Leche. Asimismo, la presencia de lesiones se observaron en 2 casos junto a PCR Hisopado nasal positivo y en 4 casos coincidentemente con PCR leche.

Se obtuvieron 3 aislamientos pertenecientes a muestras de hisopado nasal, cuya correspondencia fue con micobacterias atípicas.

Cabe mencionar finalmente que en un animal proveniente de un campo libre se obtuvo un aislamiento identificado como *Mycobacterium bovis*

Resultados positivos a distintos análisis:

| Total de muestras | PCR + | BACT + | PCR+ y BACT+ | HISTO | LESIONES |
|-------------------|-------|--------|--------------|-------|----------|
| 70 Leches | 10 | 1 | 1 | 1 | 3 |
| 110 Hisop. nasal | 17 | 7 | 3 | 1 | 1 |

Discusión y Conclusiones:

Se debe considerar que los animales positivos obtenidos en su mayoría provenían de establecimientos con baja prevalencia (0.5%-3%).

La cantidad de aislamientos registrados a partir de las muestras de leche tendría una correlación con lo ya descrito en diversos trabajos en los que se

describen bajos porcentajes de excreción de *Mycobacterium bovis* a partir de este material (8-9).

Asimismo y al igual que lo sugerido en la bibliografía consultada al respecto, la mayor cantidad de animales positivos a PCR sobre la bacteriología podría estar dado por una sensibilidad superior de la técnica.

Los resultados obtenidos estarían señalando la necesidad de continuar con el trabajo utilizando PCR, investigando mejorar su sensibilidad para ser tenida en cuenta como técnica complementaria de diagnóstico y así colaborar en el trabajo de control y erradicación de esta zoonosis de los rodeos del País.

Referencias:

- 1) Cosivi O, et al. 1998. Synopses: Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Developing Countries. *Emerging Infectious Diseases*. 4:59-70
- 2) Francis J, et al. 1978. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. *Vet Rec*. 103:420-425
- 3) Wards BJ, et al. 1994. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol*
- 4) Leibana E, et al. 1994. Simple and Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Organisms in Bovines tissues sample by PCR. *J Clin Microbiol* 35(1):33-36.
- 5) Antognoli, MC, 2001. A one tube Nested PCR for the detection of *Mycobacterium bovis* in Spiked milk samples: an evaluation of different concentration and lytic techniques for *M. bovis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13:111-116.
- 6) Zumarraga, et al. 2001. "Aplicación de la PCR en la detección de *Mycobacterium bovis* en muestras de tejidos de terneros». *Vet. Arg.* Vol XVIII. Nº179. 668-676
Noviembre de 2001.
- 7) Zumárraga, et al. 1999. Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la detección de micobacterias en leche. *Rev. Arg. De Microbiol.* 31 (Supl.1):4-5.
- 8) Schalm, et al. 1971. Less common forms of mastitis. In: Lea & Febiger, ed. *Bovine mastitis*. Philadelphia. 249-282.
- 9) O'Reilly et al. 1995. Tuberculin skin test: Sensitivity and Specificity. In: Thoen C.O, and Steele, ed *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. First Ed. Ames Iowa State University Press. 85-91