

**Primer aislamiento de *Mycobacterium bovis*
de búfalo del nordeste argentino*****Guanziroli Stefani, María C. - Cicuta de Gallardo, María E.***Cátedra de Microbiología, Sgto. Cabral 2.139, 3400 Corrientes.**Tel/Fax 03783- 425753 – 420854, Interno 165.**E-mail: celesteguanziroli@yahoo.com.ar - cicuta@vet.unne.edu.ar***ANTECEDENTES**

El búfalo es susceptible a la tuberculosis (tb) bovina, una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium bovis*, habiendo sido reportada en esta especie en Italia, Brasil, India y Australia (Roxo & Amara, 1998; Haagsma, 1995; Vaccaro *et al.*, 1982; Portugal *et al.*, 1971; Vannamaya *et al.*, 1987; Lau, 1994; Mota *et al.*, 2001/2; Mello *et al.*, 1965; Freitas *et al.*, 2001). Esta enfermedad crónica adquiere relevancia frente a la longevidad de los bubalinos, que se puede extender a veinte años de vida productiva, proporcionando mayores posibilidades de desarrollo y transmisión de la misma. (Roxo *et al.*, 1997; Kanameda *et al.*, 1999).

Los signos clínicos pueden estar ausentes en los primeros estadios de la enfermedad que, siendo una zoonosis, se transforma en riesgo ocupacional para quienes trabajan con animales, como veterinarios, tamberos, trabajadores rurales, personal de frigoríficos, etc. (SENASA, 1993; WHO, 1993; O'Reilly & Daborn, 1995).

En el animal vivo es diagnosticada por examen clínico y por medio de reacciones de hipersensibilidad retardada (prueba tuberculínica) efectuada con derivado proteico purificado (*purified protein derivate*, PPD, OMS, 1968) derivados de cepas aviarias (PPD-A) o bovinas (PPD-B). Los tests tuberculínicos presentan una sensibilidad entre 72 y 96% y una especificidad de 70 y 99% para los bovinos, estos índices no parecen ser válidos para los bubalinos dado que reaccionan en forma más específica a las micobacterias (Vanamaya *et al.*, 1987; Nain & Kaushik, 1985; OPS, 1992). Francis *et al.* (1978) demostraron que la prueba caudal simple posee sensibilidad de 81.8% y especificidad de 93.3% en bovinos y que, con el aumento de la dosis a 0.4 mg, la sensibilidad alcanzó a la especificidad; concluyeron que, entre los tests simples, el cervical proporciona el máximo de sensibilidad y el caudal el máximo de especificidad. Algunos animales pueden no responder a la tuberculina (tb) debido a diversos factores como infección reciente, fin de gestación o desnutrición que pueden ocasionar resultados falsos negativos como en avanzado estado de infección, pueden manifestar el fenómeno de anergia, o ausencia de reactividad cutánea, cuyo mecanismo aún no está bien dilucidado (Monaghan *et al.*, 1994). La respuesta de los bovinos comúnmente se inicia a los 30 a 50 días post-infección.

Debido a que las reacciones de los bubalinos muestran mayor intensidad que en los bovinos, la lectura de la induración no debe seguir los mismos parámetros de los últimos (Lau, 1994; Nicoletti, 1994; Mohan, 1968). Haagsma (1995) al referirse a la prueba comparativa, que utiliza simultáneamente PPD aviar y bovino en el mismo animal, sostiene su utilidad para diferenciar animales infectados por *M. bovis* de aquellos expuestos a otras micobacterias o géneros afines. En presencia de mayor reactividad a la tb aviar (que representa sensibilidad inespecífica) las reacciones a la tb bovina se consideran poco significativas (CPZ, 1989). El test es considerado positivo en bovinos cuando la respuesta al PPD-B es 4 mm igual o mayor que el PPD-A, de 1 a 4 mm es sospechoso. La concentración recomendada para bovino es de 2000 UI de PPD-B (usualmente 0.1 mg/ml) determinadas por ensayo biológico frente a un patrón de referencia internacional (OIE, 1992). El test tuberculínico no es efectivo en todas las especies, Nain & Kaushik (1985) afirman que no es un buen método de diagnóstico para utilizar en rodeos bubalinos debido a que en muchos animales reactivos no se ha podido confirmar la infección a la necropsia.

Kantor *et al.* (1984) observan sensibilidad del 75% en la prueba comparativa contra 87.5% en la simple cervical y una sensibilidad semejante en la caudal. Aumentándose la dosis de tuberculina aplicada, la sensibilidad aumenta, manteniéndose la especificidad, aún así no se puede alcanzar el 100% de sensibilidad debido a la presencia de animales anérgicos en el rebaño. La sensibilidad y especificidad pueden ser alteradas modificándose la dosis inyectada, la concentración en unidades internacionales (UI) o los valores límites de respuesta o puntos de corte de reacción (Francis *et al.*, 1978; Kantor *et al.*, 1984; OPS, 1992). Según Ronswurm & Konhya (1973) citados por Roxo, 1998, no hay interferencia estadística cuando el test cervical comparativo es realizado en un periodo dentro de los siete días luego de la aplicación del test caudal simple.

*Corresponde al tema de Beca **Tuberculosis bovina en la especie bubalina**. (SGCYT/UNNE Res. N° 586/2004-CS)

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE
Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2006

Roxo (1998) recomienda la lectura por medición en la prueba ano-caudal del búfalo, considerando reacción positiva cuando es mayor o igual a 10 mm, sospechosa cuando sus valores se sitúan entre 6.4 y 9.9 mm y negativa menor a 6.3 mm. También sugiere que en la prueba cervical comparativa, la media aritmética de las reacciones específicas en bubalinos sea de 13.07 mm y en bovinos 7.81 mm. Así la relación entre las medias de las dos especies es igual a 1.69. En Brasil, aplicándose este valor como factor de corrección para bovinos, la interpretación de las reacciones de los bubalinos en el diagnóstico de tuberculosis pasan a ser positivos por encima de 5 mm, sospechosos entre 3 y 4.9 mm y negativos debajo de 3 mm. Agrega que en bubalinos la reactividad cutánea en el pliegue ano-caudal fue 1.8 veces más intensa que la observada en la región cervical. Los tests caudal simple y cervical comparativo en bubalinos naturalmente expuestos a *M. bovis* no fueron capaces de detectar todos los animales infectados y también fueron positivos en animales no comprobadamente infectados. Esta autora utilizó la técnica de *PCR* para la identificación de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* aisladas de linfonódulos de bubalinos naturalmente infectados, visto que, debido al crecimiento muy pobre en medios de cultivo, no fue posible la confirmación de la especie de micobacteria a través de pruebas bioquímicas y de cultivo.

A la necropsia, se confirma a través de exámenes histopatológicos y bacteriológicos, a los que se suman las modernas técnicas de biología molecular (sondeos de ADN y *PCR*, Haagsma, 1995). La técnica de *PCR* está siendo considerada como el avance más promisorio en el diagnóstico rápido de tuberculosis, capaz de reducir las 4 a 8 semanas necesarias para el desarrollo del cultivo, a 1 o 2 días para la obtención de resultados, siendo aplicada en la identificación de micobacterias directamente, a partir de muestras clínicas o de cultivos puros, con una sensibilidad y especificidad muy elevadas, ya que es capaz de detectar menos de 10 bacilos en la muestra (Forbes & Hicks, 1993; Claridge *et al.*, 1993; Díaz *et al.*, 1994; Beige *et al.*, 1995)

En base a estudios realizados en diversos países se considera necesario establecer parámetros específicos para los búfalos, tomándose en cuenta las diferencias de respuesta inmune entre bovinos y bubalinos. Algunos investigadores (Nicoletti *et al.*, 1994; O'Reilly & Dabron, 1995; Nain & Kaushik, 1985; Lau *et al.*, 1998; Benson 2000.; Vale 1994; Kanameda *et al.*, 1999) afirman que es posible extrapolar los resultados de investigaciones sobre diagnósticos de bovinos a bubalinos, aún así, debe considerarse las posibles diferencias inmunológicas entre las especies visto que muchas veces se toman valores de bovinos, que no pueden necesariamente presentar la realidad incurriendo en sacrificios innecesarios y en pérdidas económicas. Dada la importancia de que el control de la tbc sea aplicado a todas las especies susceptibles, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la prueba tuberculínica en búfalos, acompañada de diagnóstico histopatológico y bacteriológico.

MATERIALES y MÉTODOS

Se realizó la prueba tuberculínica intradérmica simple ano-caudal (AC) a 402 búfalos de raza Murrah, con un rango de edad de uno a 20 años, de la provincia de Corrientes, a los cuales previamente se les tomó la medida del grosor cutáneo del pliegue externo con calibre milimetrado. Se utilizó 0,1 ml de *PPD-B* con una concentración proteica de 1mg/ml (=32.500 UI/ml), provistos por *DILACOT/SENASA* y *Centro de Diagnóstico Veterinario*. Las lecturas se realizaron a las 72 h +/- 6 interpretando la induración de acuerdo con Roxo (1998) de la siguiente manera: positivos un diámetro = $\phi > 10$ mm, sospechosos entre 6 y 9.9 mm y negativos = $\phi < 5,9$ mm.

A los animales positivos y sospechosos se les repitió la prueba cervical comparada (CC) en un plazo de 60 días, interpretándose como positivos una diferencia de *PPD-B* con respecto a *PPD-A* = $\phi > 5$ mm, sospechosos entre 3 y 4.9 mm y negativos debajo de 3 mm. (Roxo, 1998).

Se realizó la necropsia de dos animales enviando linfonódulos y órganos afectados a histopatología (HP) y bacteriología. La metodología utilizada fue la habitual, realizándose tinciones con hematoxilina-eosina, de Grocott, PAS y coloración de Ziehl-Neelsen (ZN), para observación de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) y procesamiento bacteriológico para aislamiento de micobacterias: decontaminación de la muestra utilizando el método de Petroff con hidróxido de sodio al 4%, centrifugación, neutralización y siembra en los medios de Stonebrink y Löwenstein-Jensen.

DISCUSIÓN de RESULTADOS

De los 402 animales tuberculinizados se obtuvieron los siguientes resultados:

A la prueba ano caudal simple fueron positivos 4 (0,99%) con reacciones de 11 a 17 mm y 6 (1,49%) sospechosos con rangos de 6 a 8 mm, totalizando 10 reaccionantes (2,48%).

De los 10 animales positivos y sospechosos a la prueba AC que se les efectuó la cervical comparada (CC) resultaron reaccionantes 5 con predominancia de respuesta al *PPD-B* con rangos de diferencias entre 7 y 31 mm con respecto al *PPD-A* , 2 sospechosos y 3 negativos.

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE
Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2006

Se realizaron dos necropsias: a una hembra de 9 años, que había reaccionado a la AC 17 mm y a la CC 16 mm y a un animal macho de 18 meses de edad que arrojó 11 mm a la prueba AC y 8 mm a la CC..

A la necropsia de la primera se observó sólo un ganglio retromamario afectado con necrosis caseosa, el resto de los órganos sin lesiones compatibles con tbc. El diagnóstico HP del ganglio retromamario fue compatible con tbc, presentando el resto (retrofaringeo, preescapulares, submaxilares, mesentéricos y poplíteos) hiperplasia linfoide difusa. Se obtuvo una cepa de *M. bovis* sólo a partir del ganglio retromamario cuyo análisis genético por *spoligotyping* realizado en el *Instituto de Biotecnología del INTA* de Castelar, Buenos Aires, arrojó que pertenece al espoligotipo 34, que abarca al 54,7% de *M. bovis* del ganado bovino de la zona (Cicuta, 2002). Es de destacar que los campos lindantes donde habitan los búfalos se encuentran poblados de bovinos que circunstancialmente invaden el establecimiento.

En la segunda necropsia y a pesar de la corta edad, se observaron la mayoría de los ganglios examinados aumentados de tamaño, con exudado purulento y focos hemorrágicos. A la HP no hubo lesión compatible con tbc, observándose hiperplasia folicular paracortical, microabsesos y abundantes colonias basófilas bacterianas, abundante tejido fibroso en cápsula engrosada y necrosis folicular. Sin embargo se obtuvieron cultivos positivos a *M. bovis* a partir de todos los ganglios sembrados (retrofaringeos, inguinales, preescapular, mediastínicos, precurales, parotídeos y del inspector). Estas cepas están siendo tipificadas por métodos moleculares en el *Instituto de Biotecnología del INTA* de Castelar, Buenos Aires.

CONCLUSIONES

La tuberculinización en el búfalo presenta inconvenientes tales como la inexistencia del pliegue ano-caudal interno, heterogeneidad en la morfología del pliegue ano-caudal externo, en el cual el tamaño y grosor de la piel es muy variable. Presenta mayor cantidad de tejido laxo con diferente conformación histológica debido a mayor número de fibras elásticas por lo que es esperable que haya mayor reacción cutánea. El bubón intradérmico que se forma puede observarse fácilmente o no, dependiendo si el animal presenta la piel más gruesa o más fina en la zona, por eso es de suma importancia la medición con calibre milimetrado.

Nuestras mediciones de las induraciones obtenidas corrobora trabajos realizados con anterioridad (Nain & Kaushik, 1985; Benson *et al.*, 2000; Roxo & Amaral, 1998; Lau, 1998; Nicoletti, 1994; Mello *et al.*, 1965; Vanamayya *et al.*, 1987; OPS, 1992), donde se comprueba que la reacción es más pronunciada en la especie bubalina que en la bovina, por lo que los parámetros de medición de las pruebas también deberían considerarse. A la necropsia se confirmó la infección en los dos animales reaccionantes al PPD-B, notándose infección generalizada en el animal de menor edad.

La diseminación clonal de una cepa está indicando una activa transmisión y tiene un gran significado epidemiológico. El aislamiento de una estirpe perteneciente al tipo genético predominante en la región (espilgotipo 34) nos está comprobando que existe transmisión entre el bovino y el búfalo a diferencia de lo que ocurre en Brasil donde las cepas de *M. bovis* aisladas de búfalos tienen sus espilgotipos exclusivos diferentes a los del bovino (Zumárraga *et al.*, 1998). Esto sirve de alerta ya que nos está demostrando que la fuente de infección para el búfalo de esta zona serían los bovinos infectados. La permanencia de estas enfermedades limita las posibilidades del sector pecuario y la comercialización internacional, influyendo negativamente en la rentabilidad de las explotaciones, en la calidad de los productos, en el consumo y la salud humana, de allí la importancia de que *Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina*, implementado por el SENASA en 1994 sea llevado a cabo.

BIBLIOGRAFIA

- BEIGE, J; LOKIES, J; SCHABERG, T; FINCKH, U; FISCHER, M; MAUCH, H; LODE, H; KOHLER, B; ROLFS, A. **Clinical evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* PCR assay.** *Journal of Clinical Microbiology* 33 (1): 90 – 95 1995.
- BENSON, V **Water Buffalo may be sensitive to tuberculin tests**, Epidemiology Area Officer *USDA APHIS*, Florida, USA 2000.
- CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS **Tuberculosis: Guía para proyectos de Tuberculosis Bovina**, Organización Panamericana de la Salud, OPS, Oficina regional de la OMS, Nota Técnica N° 15 1989.
- CICUTA, M.E. **Epidemiología molecular de *Mycobacterium bovis* en la región nordeste argentina.** Tesis aprobada, Facultad de Ciencias Veterinarias (UNNE), Corrientes, 2002.
- CLARIDGE III, J.E.; SHAWAR, R.M.; SHINNICK, T.M.; PLIKAYTIS, B.B. **Largescale use of polimerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory .** *Journal of Clinical Microbiology*, 31 (8): 2049-2056 1993.
- DIAZ, R.; MONITORO, E; MAESTRE, J.L.; EHEMENDIA, M; VALDIVIA, J.A.; **Polimerase Chain reaction for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, Río de Janeiro. 89 (2): 211-212 1994
- FORBES, B.A; HICKS, K.E. **Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in a clinical laboratory by polymerase chain reaction.** *Journal of Clinical Microbiology* 31 (7): 1688-1694 1993

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE
Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2006

- FRANCIS, J; SEILER, R.J; WILKIE, I.W.; O'BOYLE, D; LUMSDEN, M.J.; FROST, A.J. **The sensitivity and specificity of various tuberculin test using bovine PPD and other tuberculin.** *Veterinary Record*, 4: 4205 1978.
- FREITAS, J; GUERRA, J.L.; PANETTA, J.C. **Characteristics of the tuberculosis in slaughtered water buffaloes.** *Braz. J.Vet. Res. Anim. Sci.*, Sao Paulo, Brasil, 38 (4): 170-176 2001.
- HAAGSMA, J. **Bovine Tuberculosis.** *OIE Manual* (Amendment 2), Iip. 1995.
- KANTOR, I; ODEON, A.C; STEFAN, P.E; AZA, M.J.; MADRID, C.R.; MARCHEVSKY, N. **Sensitivity of the cervical and the caudal fold tuberculin testes with *Mycobacterium bovis* in infected cattle of Argentina.** *Rev.Sci.Tech.Office Intenational des Epizooties*, 3 (1): 137-150 1984.
- KANAMEDA, M. EKGATAT, S. WONGKASEMJIT, SIRIVAN, C.; ACHIMASIRI, T.P; KONGKONG, C.; BUCHAPHAN, K.; BOONTARAT, B. **An evaluation of tuberculin skin tests used to diagnose tuberculosis in swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*),** *Preventive Veterinary Medicine*, 39 (2): 129-135, National Institute of Animal Health, Kasentklang, Bangkok, Bangkok 10900, Thailand 1999.
- LAU, H.D., **Acerca de Tuberculosis y reacciones al test de tuberculinización**, *Pesquisador III da Embrapa Amazonia Oriental*, Belem de Para, Brasil. 1998.
- LAU, H.D. **Important economic diseases in buffaloes**, *Proceedings IVth World Buffalo Congreso*, S.Paulo, Brasil, pp. 209220 1994.
- MELLO, D; QUEIROZ, J.C.; GALVAO, T.B. **Reacciones positivas a la prueba de tuberculina en búfalos, *Bubalus bubalis*, var. *bubalis* (LINNE 1758).** *Rev.Med.Vet.* 1: 115-16 1965.
- MOHAN, R.N. **Diseases an parasites on buffaloes.** *Veterinary Bulletin*, 38 (10): 647-59 1968.
- MONAGHAN, M.L., DOHERTY, M.L., COLLINS, J.D.; KAZDA, J.F., QUINN, P.J. **The tuberculin test.** *Veterinary Microbiology*, 40: 111-124 1994.
- MOTA, P.M.P.C.; LOBATO, F.C.F.; ASSIS, R.A.; LAGE, A.P.; PARREIRAS, P.M.; LEITE, R.C. **Ocorrência de tuberculosis en rebaños bubalinos (*Bubalis* var. *bubalis* –linneus, 1758) en Municipio de Parintis, Amazonas,** *Arq. Bras.Med.Vet.Zootec.* 54(4) 2002
- MOTA, P.M.P.C.; LOBATO, F.C.F.; ASSIS, R.A.; LAGE, A.P.; PARREIRAS, P.M. ***Mycobacterium bovis* isolation in a dog.** *Arq.Braz. Med. Vet. Zootec.* 53 (4) , Belo Horizonte 2001.
- NAIN, S.P., KAUSHIK, R.K. **Examination of Tuberculin–positive animals.** *Indian J. Animal Science.*, 55 (10): 877-878 1985.
- NICOLETTI, P. **An update on selected diseases wich affect buffaloes.** *Proceedings IV th World Buffalo Congress*, S. Paulo, Brasil, 1: 221-228 1994 .
- OPS **Plan de acción para la erradicación de la tuberculosis bovina en las Américas.** OPS/OMS. HPV/TB. N.113, 1992.41 p.
- O'REILLY, L.M.; DABORN, C.J. **The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review.** *Tubercle and Lung disease*, 76: 1-46 1995.
- PORTUGAL, M.A.; GIORGI W; SIQUEIRA, P.A. **Ocorrência da tuberculose em bubalinos (*Bubalus bubalis* var. *Bubalis linneus*, 1758) no Estado de Sao Paulo.** *Archivos del Instituto Biológico*, Sao Paulo,4.(38): 231-8, 1971
- ROXO, E. **Tuberculose e Brucelose em bufalos** Instituto de investigación Sao Paulo Brasil, pp 185-192 1997.
- ROXO, E. & AMARAL, X. **Surto de tuberculose em bufalos no Estado de Sao Paulo.** *Instituto Biológico, Laboratorio de Tuberculose, Centro de Sanidade Animal*, 65 (supl.): 92 1998.
- SERVICIO NACIONAL de SANIDAD ANIMAL (SENASA) **Plan Nacional de Control y erradicación de la Brucelosis y Tuberculosis bovina – Etapa 1998 – 2001**, Resolución N° 1287, 1993.
- SERVICIO NACIONAL de SANIDAD ANIMAL (SENASA), SECRETARÍA de AGRICULTURA, GANADERÍA, PESCA y ALIMENTOS (SAGPyA), INSTITUTO NACIONAL para la PROTECCIÓN de ALIMENTOS y ZONOSIS (INPPAZ), **Tuberculosis Bovina, Pruebas tuberculínicas (inoculación, lectura e interpretación), Preguntas y Respuestas**, Buenos Aires 2000.
- VACCARO, A; CAPUANO, G; DAMIANO, N. **Ricerche sulla prevalenza della tuberculosi nell'allevamento bufalino della province di Caserta e Salerno.** In: *CONGRESO INTERNATIONAL SULL'ALLEVAMENTO BUFALINO NEL MONDO. ATTI DEL CONVEGNO*, 2, CASERTA, p. 191 1982.
- VALE, W. **Water Buffalo world uptake. Prospects of buffalo production in Latin America**, *Proceedings IV World Buffalo Congress*, S. Paulo, Brasil, pp. 75-87 1994.
- VANAMAYYA, P; SHARMA, A.K.; PARAI, T.P.; PALIWAL, O.P; PARIHAR, N.S. **Evaluation of tuberculin and johnin tests with pathological lesions in buffaloes.** *Indian Journal of Animal Science*, 3 (57): 189-90 1987 .
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of the WHO meeting on zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*).** WHO/CDS/VPH Monograph Series (130): 27 (1993)
- ZUMÁRRAGA, M.; MARTÍN, C.; SAMPER, S.; ALITO, A.; LATINI, O.; BIGI, F.; ROXO, E.; CICUTA, M.E.; ERRICO, F.; CASTRO RAMOS, M.; CATALDI, A.; VAN SOOLINGEN, D. & ROMANO, M.I. **Usefulness of spoligotyping in the molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* -related infections in South American countries.** *J. Clin. Microbiology*, 60: 251 – 257 1998.