

Comparación de técnicas diagnósticas de tuberculosis porcina en dos establecimientos de cría confinada en Argentina

MAGNANO, G.G.¹; SCHNEIDER, M.O.¹; URBANI, C.E.¹; AMBROGI, A.¹; ZAPATA, L.¹; JORGE, M.C.²

Resumen

El diagnóstico de tuberculosis en animales vivos se realiza casi exclusivamente mediante la prueba intradérmica tuberculínica (IDR), aunque en los porcinos son escasos los reportes de resultados utilizando dicha técnica. El objetivo de este trabajo fue comparar resultados obtenidos realizando la IDR en porcinos con hallazgos patológicos y microbiológicos. Se tuberculinizaron 307 hembras con DPP aviar y DPP bovino. Del total, 171 se inspeccionaron a la faena tomando muestras para exámenes bacteriológicos e histopatológicos. Los resultados de la IDR fueron: 14.4% (44) positivos a DPP aviar, 1.9% (6) a DPP bovino, 3.9% (12) a ambos DPP y 79.8% (245) negativos. Cuatro muestras fueron positivas al cultivo, tipificándose como *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, *M. flavescens* y *M. scrofulaceum*. En la observación macroscópica e histopatológica no se hallaron lesiones compatibles. Concluimos que la IDR sería útil para indicar una infección predial aunque tendría limitaciones en el diagnóstico individual y en el estudio comparativo con la presencia de lesiones y aislamiento del agente.

Palabras clave: (diagnóstico), (porcinos), (tuberculosis).

¹Departamento de Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36 km. 601, CP: 5800, Río Cuarto, Córdoba, Argentina. gmagnano@ayv.unrc.edu.ar. ²Área Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Pcia. De Buenos Aires, Paraje Arroyo Seco s/n, CP: 7000, Tandil, Buenos Aires, Argentina
Recibido: 18-05-2010 - Aceptado: 21/09/2010

Summary

The diagnosis of tuberculosis in live animals is carried out using primarily by the tuberculin test (TT), however only few reports only show the results of this diagnostic test in swine. The objective of this study was to compare the TT with pathological and microbiological findings in swine. A total of 307 sows were injected with avium PPD and bovine PPD following the standard technique. Tissues samples for bacteriological tests and histological exams were collected from 171 animals after slaughter. The following results were obtained: 14.4% (44) tested positive to avium PPD, 1.9% (6) to bovine PPD, 3.9% (12) to both PPD and 79.8% (245) were negatives. Only 4 samples were culture positives typified by *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, *M. flavescens* y *M. scrofulaceum*. Neither macroscopic nor histological examinations revealed lesions compatible with TB. .

Key words: (diagnostic), (pig), (tuberculosis).

Introducción

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa, de curso crónico, ocasionada por especies del género *Mycobacterium* que afecta a la casi totalidad de las especies animales^{1,4}.

La técnica de diagnóstico que se acepta internacionalmente para declarar libre de tuberculosis un establecimiento es la prueba de intradermorreacción (IDR)¹⁷.

Estudios realizados con esta técnica en cerdos han presentado diversos resultados. Para algunos autores, es un procedimiento útil si se aplica en una piara pero presenta dificultades en el análisis individual, ya que tiene limitantes en la sensibilidad y especificidad^{16, 24, 28}.

La prueba debe realizarse utilizando derivado proteico purificado de tuberculina (DPP) bovino y DPP aviar simultáneamente dado que los porcinos son susceptibles a *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) y *Mycobacterium avium* (*M. avium*)²⁵.

Investigaciones realizadas en nuestro país y orientadas a identificar la especie de micobacteria que predomina en las lesiones observadas en la inspección de la faena de cerdos, demostraron entre 72% y 100% de aislamiento de *M. bovis*^{11, 15, 18, 19}.

En Argentina, en el año 2009, el Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) aprobó

la Resolución 145/09 para la certificación de Predios Libres de Tuberculosis Porcina. Con los antecedentes del tema se hace necesario investigar que sucede con la IDR en los cerdos y más aun en sistemas de cría confinada de nuestro país, cuyos propietarios periódicamente plantean la posibilidad de declarar sus establecimientos libres de tuberculosis.

El objetivo del presente trabajo fue utilizar la técnica de IDR para el diagnóstico de tuberculosis en porcinos y comparar los resultados con la inspección posmortem, los hallazgos histopatológicos y el cultivo de micobacterias.

Materiales y métodos

El trabajo se desarrolló en dos establecimientos de cría porcina en confinamiento ubicados en la provincia de Córdoba, Argentina. Para el presente estudio fueron identificados como criadero A con aproximadamente 500 madres y criadero B con 1.000 madres.

Se realizó un estudio epidemiológico descriptivo observacional de corte transversal con posterior seguimiento y observación de los animales en faena y procesamiento de las muestras en laboratorio. El cálculo estadístico se basó en el tamaño de la muestra requerida para detectar al menos un animal positivo en

una población con una prevalencia del 2%, con un nivel de confianza del 95%²⁷. Los animales seleccionados para el estudio fueron 307 hembras entre 2 y 4 años de edad, de las cuales 134 pertenecían al criadero A y 173 al B.

Las técnicas diagnósticas utilizadas fueron:

1.- Prueba de IDR comparada empleando DPP bovino (cepa AN5 de *M. bovis*) y DPP aviar (cepa D4 de *M. avium*). Los DPP se inocularon en la zona dorsal de la oreja; la lectura se realizó a las 48 horas posinoculación. Para la interpretación del resultado se siguió la reglamentación vigente establecida por el SENASA de Argentina, donde “toda reacción en el tejido, comprobada por palpación, se clasifica como reaccionante, registrando si la misma se debe a la tuberculina bovina o aviar”²³. Se procedió además a la medición del tamaño de la respuesta inflamatoria.

2.- La inspección posmortem en frigorífico se realizó sobre 171 (36 reaccionantes positivos y 135 negativos) de los animales tuberculinizados. Los tejidos seleccionados para la observación y toma de muestra se decidieron sobre la base de trabajos que indican los principales sitios de ubicación de las lesiones en los cerdos^{3, 13, 20, 25}. Los animales se enviaron a faena, según razones económicas, periódicamente durante 8 meses.

3.- Para el diagnóstico bacteriológico de cada animal inspeccionado (n = 171), se tomaron muestras en condiciones asépticas de los linfonodos retrofaríngeos, mediastínicos, mesentéricos y gastrohepáticos. El material procesado pertenecía a 167 animales debido a que 4 se descartaron por no estar en condiciones adecuadas. Previa decontaminación con el método de Petroff, se sembraron en los medios de Löwenstein-Jensen y de Stonebrink, incubándose en aerobiosis, a 37°C durante 60 días¹².

Se realizó la tinción de Ziehl Neelsen del sedimento de la muestra previo a la siembra y de la superficie del medio de cultivo antes de la eliminación de cada tubo concluidos los 60 días de incubación.

La tipificación de micobacterias aisladas se realizó por pruebas bioquímicas clásicas.

4.- Para el diagnóstico histopatológico se recolectaron 56 muestras de ganglios linfáticos de 14 animales del estudio, 13 de ellos positivos a la IDR (11 a DPP aviar y 2 a ambos DPP) y el animal restante negativo. Las muestras fueron fijadas en formaldehído al 10%, deshidratadas y coloreadas con hematoxilina-eosina y Ziehl Neelsen.

Resultados

En el cuadro I se observan los resultados de la IDR en ambos establecimientos en números absolutos y porcentajes. En la última columna se presentan el promedio y el rango de los tamaños en milímetros de todas las reacciones a cada DPP.

En todos los casos las reacciones que se consideraron positivas presentaron eritema e induración (Figura 1) pero en ninguna de ellas se observó necrosis o hemorragia en el lugar de la inoculación.

En los 171 animales inspeccionados durante la faena, ninguno presentó lesiones macroscópicas compatibles con tuberculosis.

No se observaron bacilos ácido-alcohol resistente en las muestras coloreadas con Ziehl Neelsen previo a la inoculación del material en los medios de cultivo.

Del total de animales a los que se les realizó el cultivo de micobacterias, solamente en el 2,4% (n = 4) se logró aislamiento. De ellos tres pertenecían al establecimiento A y uno al B.

En el cuadro II se comparan los resultados de la IDR con los de laboratorio (cultivo bacteriano en cada uno de los medios utilizados y tipificación bioquímica) de los cuatro animales (denominados N°: 83, 125, 129, 166) que presentaron bacteriología positiva.

En ninguna de las 56 muestras examinadas por histopatología se observaron lesiones compatibles con tuberculosis. Tampoco se encontraron bacilos ácido-alcohol resistente en las muestras de tejidos coloreadas con Ziehl Neelsen.

Cuadro 1: resultados obtenidos con la técnica de IDR realizada en cerdos pertenecientes a dos establecimientos de cría en confinamiento de la provincia de Córdoba, Argentina

Positivos a:	Establecimientos (A + B)	Establecimiento A	Establecimiento B	Tamaño reacciones (mm)	
				Promedio	Rango
DPP aviar	44 (14.4%)	21 (15.7 %)	23 (13.3 %)	15.7	5-32
DPP bovino	6 (1.9%)	2 (1.5 %)	4 (2.3 %)	14.9	5-30
DPP aviar y bovino	12 (3.9%)	8 (6.0 %)	4 (2.3 %)	15.9 /15.2	5-23
Negativos	245 (79.8%)	103 (76.8 %)	142 (82.1 %)		
Total	307 (100.0%)	134 (100 %)	173 (100 %)		

Cuadro 2: resultados comparativos de la técnica de IDR, cultivo bacteriano y tipificación obtenidos de los cuatro animales que presentaron resultados bacteriológicos positivos

N° Animal	IDR		Cultivo		Tipificación
	DPP Aviar	DPP Bovina	L-J	St.	Bioquímica
83	Neg	Neg	Pos	Pos	<i>M. flavescens</i>
125	Neg	Neg	Pos	Neg	<i>M. avium</i>
129	Neg	Neg	Neg	Pos	<i>M. bovis</i>
166	Pos	Neg	Pos	Pos	<i>M. scrofulaceum</i>

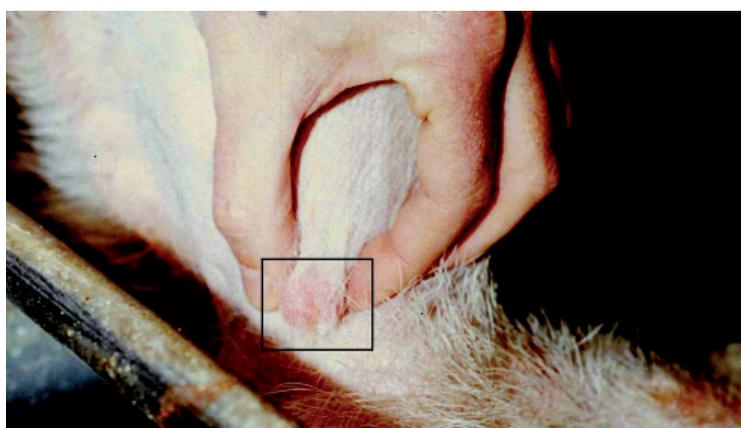


Figura 1: reacción positiva a DPP aviar en el animal identificado con el N° 166. Se observa eritema e induración en la superficie dorsal de la oreja.

Discusión

Los resultados del presente estudio demostraron la presencia de tuberculosis en ambos criaderos, no obstante existió dificultad al intentar relacionar los resultados de la IDR con la presencia de lesiones y con el aislamiento de micobacterias.

En este trabajo se observa un porcentaje global del 14,4% de animales positivos a DPP aviar siendo similares para los establecimientos A y B. Este valor se podría considerar alto aunque en granjas intensivas de Italia⁵ y República de Croacia⁷ se hallaron porcentajes levemente superiores (17,5% y 21,1%) en algunas categorías de animales.

Los animales que presentaron reacción positiva a DPP bovino fueron menores a los de DPP aviar; los resultados arrojaron 1,5% y 2,3% para establecimiento A y B respectivamente.

Si comparamos nuestros resultados con los obtenidos por Andrada y col.² en la provincia de Santa Fé, Argentina, quienes hallaron una prevalencia de 5,74% de animales reaccionantes a la tuberculina aviar, 0,27% a la tuberculina bovina y 0,18% a ambas, podemos señalar que el número de reaccionantes en nuestro estudio fue más alto, coincidiendo en que los reaccionantes a la tuberculina aviar fue mayor.

La bibliografía mundial menciona reacciones cruzadas a la IDR en cerdos infectados tanto con *M. avium* como con micobacterias no tuberculosas (MOTT)^{3, 9, 22, 24} y observaron que las reacciones en todos los casos fueron mayores a DPP aviar que a DPP bovino. Los resultados de las pruebas de IDR, estarían indicando que en ambos establecimientos hay predominio de *M. avium* o de MOTT, entre ellas *M. flavescens* y *M. scrofulaceum*, aisladas en nuestro trabajo.

Hird y col.⁸, aislaron *M. avium* en el 6,4% de linfonodos de cerdos que no presentaban lesiones macroscópicas, estos resultados coinciden con nuestros hallazgos al identificar micobacterias de tejidos sin lesiones. Los resultados histopatológicos fueron negativos en correspondencia con ausencia de lesiones macroscópicas.

Del total de animales positivos a la prueba de IDR (20,2%) se esperaba encontrar, al menos en algunos, lesiones compatibles con tuberculosis, pero estas no fueron observadas. Algunas de las posibles causas podrían ser: 1) la baja sensibilidad de la inspección en la fauna especialmente en lesiones muy pequeñas; 2) que *M. avium* provoca lesiones generalizadas solo en el 0,5-1% de los cerdos^{10, 12, 26}; 3) que la respuesta inmunitaria celular se mantuvo aún sin lesiones aparentes. Esta hipótesis esta sustentada por observaciones de Lucke¹⁴ quien considera que existe un porcentaje de error en la prueba tuberculínica realizada en los cerdos dada la sensibilidad residual de las lesiones tuberculosas curadas. Esto también sustentaría la falta de observación de lesiones histopatológicas en los cortes evaluados. Gardner and Hird (1989), coincidentemente con nuestras observaciones, plantean la hipótesis que la aparición esporádica de micobacteriosis en la granja estaría dada por una inconstante exposición a una fuente común medioambiental con baja contaminación. Los cerdos serían indicadores sensibles a bajos niveles de micobacterias patógenas en el ambiente y al ser criados en galpones no desarrollarían lesiones por una exposición a bajas dosis infectivas de *M. avium* Complex o a la falta de factores predisponentes; 4) reacciones cruzadas con micobacterias de bajo poder patógeno que no producen lesiones macroscópicas, pero si respuesta inmunitaria celular^{6, 21}.

Aunque la cantidad de animales positivos a las pruebas intradérmicas fue considerable, se registró un bajo número de aislamientos (2,4%) en los cultivos bacterianos.

Al comparar los resultados de las pruebas intradérmicas y los cultivos se observa que:

- En el caso del animal N° 166, con importante reacción a DPP aviar y aislamiento de *M. scrofulaceum* se podría interpretar como una respuesta cruzada del DPP aviar frente a esta MOTT. Una interpretación similar se podría realizar con el animal N° 83, del cual se aisló *M. flavescens*; aunque en este caso la reacción a DPP aviar solo presentaba una zona eritematosa sin induración.

• En el caso de los animales N° 125 y N° 129 que fueron negativos a la IDR y con aislamiento de *M. avium* y *M. bovis* respectivamente, podría interpretarse que se sucedieron infecciones entre el momento de la prueba y la faena o que se obtuvieron resultados falsos negativos.

Conclusiones

Sobre la base de los resultados obtenidos en el presente estudio se puede concluir que la técnica de IDR en los cerdos es útil para indicar una infección preial pero tiene sus limitaciones al momento de compararla con las lesiones y con el cultivo bacteriano en forma individual. Esto hace necesario dirigir las investigaciones futuras a dilucidar este tema teniendo en cuenta fundamentalmente la necesidad de la comercialización de ganado en pie.

Bibliografía

1. Álvarez Sánchez, J. Micobacteriosis porcina por miembros del complejo *avium*: Importancia, diagnóstico e identificación de las posibles fuentes de infección. <http://www.vigilanciasanitaria.es/es/articulos/mycobacterium-avium-porcino.php> consultado 27 de enero de 2009
2. Andrada, M.; Noste, J.; Desposito, R.; et al. Relevamiento sanitario-productivo en la población porcina del área de influencia de Arteaga. Estudio de prevalencia de tuberculosis porcina. // Congreso Nacional de Producción Porcina y VII Jornadas de Actualización porcina. 24-26 de septiembre de 1992, Rosario, Santa Fé, Argentina.
3. Balian, S.; Riveiro, P.; Vanconcellos, S.; et al. Linfadenitis tuberculoides em suínos abatidos no Estado de Sao Paulo, Brasil: aspectos macroscópicos, histopatológicos e pesquisa de micobactérias. *Rev. Saude Pública*, 1997; 31(4):391-397.
4. Beer J. Infecciones por micobacterias. Tuberculosis. En *Enfermedades infecciosas de los animales domésticos*. Tomo II. Editorial Acribia, Zaragoza, España, 1981.
5. Cavirani, S.; Guadagnini, P.; Alborali, L.; Donofrio, G.; Scatozza, F. Intradermal tuberculin test (IDT), ELISA and Western blot in pigs naturally infected with *Mycobacterium avium*. *14 th IPVS Congress, 7-10 de Julio de 1996*, Bologna, Italy.
6. Corner, L. Postmortem diagnostic of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Microbiol.*, 1994; 40:53-63.
7. Cvetnic, Z.; Oceppek, M.; Kovacic, H.; Mitak, M. Environmental source of *Mycobacterium avium* complex in pig breeding farms. *Zb.Vet.Fak.Univ. Ljubljana*, 1996; 33(2):181-189.
8. Gardner, I.; Hird, D. Environmental source of mycobacteriosis in a California swine herd. *Can. J. Vet. Res.*, 1989; 53:33-37.
9. Hird, D.; Lamb, C.; Lewis, R.; Utterback, W. Isolation of mycobacteria from California slaughter swine. *United States Animal Health Association*, 1983; 87:559-565.
10. Jubb, K.; Kennedy, P.; Palmer, N. Patología de los animales domésticos. 3er Ed. Editorial Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay, 1990:561-572.
11. Kantor, I.; Lesslie, I. Aislamiento y clasificación de micobacterias de ganglios de cerdos en la Argentina. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. Centro Panamericano de Zoonosis*, Argentina, 1974; 77:495-499.
12. Kantor, I.; Bernardelli, A. Manual de instrucciones. Procesamiento y cultivo de muestras para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* y *M. bovis*. Dirección de diagnóstico y control técnico. *DILACOT- SENASA*, Buenos Aires, Argentina, 1986:3-12.
13. Komijn, R.; Haas, P.; Schneider, M.; et al. Prevalence of *Mycobacterium avium* in slaughter pigs in The Netherlands and comparison of IS1245 restriction fragment length polymorphism patterns of porcine and human isolated. *J. Clin. Microbiol.*, 1999; 37(37):1254-1259.
14. Lucke, D. The intradermal tuberculin test in the pig. *Vet. Rec.* 1953; 65(34):533-535.
15. Martínez Vivot, M.; Saez, G.; Reniero, A.; Torres, P.; Insua, A.; Ritacco, V. Epidemiología molecular de la transmisión del *Mycobacterium bovis* de los bovinos a los cerdos en Buenos Aires. *VII Congreso Latinoamericano de Especialistas en Cerdos y V Congreso Nacional de Producción Porcina*. 5-8 de octubre de 1997, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
16. Mores, N.; Amaral, A.; Ventura, L.; Silva, R.; Silva, V.; Baroni, W. Comparação entre métodos de tuberculização no diagnóstico da infecção por agentes do complexo *Mycobacterium avium* ou *M. bovis* em suínos. *Arq.Bras.Med.Zootec.* 2006; 58(5):708-717

17. Organización Mundial de Sanidad Animal. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animal. www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00054.htm; consultado 12 abril del 2007.
18. Ottavianoni, L.; Bernardelli, A.; Dubarry, R. Aspectos sobre la tuberculosis porcina en la provincia de La Pampa. *Veterinaria Argentina*, 1986; 3(25):456-462.
19. Pérez, A.; Andrada, M.; Torres, P.; Riart, G.; Sarradel, J.; Gomez, E.; Martínez Vivot, M. Estudio de prevalencia de tuberculosis en porcinos de consumo estimada por inspección en matadero de animales procedentes de la zona de influencia de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNR. *2do. Congreso Argentino de Zoonosis y 1er. Congreso Argentino y Latinoamericano de Enfermedades Emergentes*, 14-17 de abril de 1998, Buenos Aires, Argentina.
20. Pérez, A.; Ritacco, V. Diagnóstico de la tuberculosis porcina en frigoríficos. *Jornadas de divulgación científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 10 de septiembre del 2001, Universidad Nacional de Rosario, Casilda, Argentina.
21. Popluhar, L.; Vrtiak, O.; Meltre, J. Atypical mycobacteria, their pathogenicity and diagnostic in swine. *Folia Veterinaria*, 1986; 30(2):9-17.
22. Savov, N.; Pavlov, N. Swine infected with atypical micobacteria. *Vet. Med. Nauki*, 1976; 13:83-90.
23. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. "Procedimiento para la certificación de Predios Libres de Tuberculosis Porcina". Resol: 145/2009 SENASA, Argentina
24. Songer, J.; Bicknell, E.; Thoen, C. Epidemiological investigations of swine tuberculosis in Arizona. *Can. J. Comp. Med.*, 1980; 44:115-120.
25. Thoen, C. Tuberculosis. En *Enfermedades del cerdo*. 8va. Ed. Editorial Intermédica, Colombia, 1999: 515-522.
26. Thorel, M.; Huchzermeyer, H.; Weiss, R.; Fontaine, J. Mycobacterium avium infections in animal. Literature review, *Vet. Res.*, 1997; 28:439-447.
27. Thrusfield, M. *Epidemiología Veterinaria*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España, 1990:191-205.
28. Tizard, I. Type IV hypersensitivity: delayed hypersensitivity. En *Veterinary Immunology: an introduction*. 6ta. Ed. W.B. Saunder Company, USA, 2000:343-347.