

# Influencia de realizar sucesivas intradermorreacciones en ganado caprino infectado de forma natural por *Corynebacterium pseudotuberculosis*

**Acosta Hernández B., Real Valcárcel F., León Vizcaino L., Santana González P., Ferrer Quintana O., Déniz Suárez S.**

Facultad de Veterinaria de LPGC, C/ Fco. Inglot Artiles - LPGC, TFN 451107, Fax 451102-451199

## Resumen

Sometimos a intradermorreacciones sucesiva a un grupo de 5 cabras infectadas de forma natural por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Procedentes de una explotación, en la cual no existen antecedentes clínicos de tuberculosis ni de positividad a la prueba de la tuberculina. Realizamos cuatro intradermorreacciones sucesivas a cada uno de los animales separadas por un período de intertuberculinización de una semana. Inoculando la PPD en las caras laterales del cuello derecha (PPD bovina) e izquierda (PPD aviar). La técnica fue leída a las 48 h postinoculación, interpretando como resultados dudosos aquellos en los que la diferencia del grosor de la antes y 48 h postinoculación fue igual o mayor a 2 y como positivos cuando dicha diferencia fue igual o mayor a 4 mm de grosor. Obtenemos en nuestro estudio que intradermorreacciones sucesivas en cabras infectadas de forma natural por *C.pseudotuberculosis*, respetando un período mínimo de intertuberculinización de 7 días, no induce a falsos resultados positivos. No obstante tras estas sucesivas tuberculinizaciones se produce en algunos casos un aumento en la inmunidad humoral que puede detectarse con el método ELISA indirecto con los antígeno MPB70 y A60.

## 1. Introducción

La intradermorreacción tuberculínica es la técnica empleada para el diagnóstico de la tuberculosis.

**Cameron (1982)** describe la existencia de comunidad antigénica entre el grupo de las Corinebacterias y las Micobacterias, razón por la que dicha técnica diagnóstica puede dar falsos resultados positivos en animales libres de infección por *Mycobacterium* spp. e infectados por *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Asimismo, **Wolinsky (1978)** describe la existencia de antígenos comunes entre el género *Mycobacterium* y otros géneros cercanos taxonómicamente como nocardias y corinebacterias.

Conociendo todos estos datos y sumando a ello que Canarias es una zona con una alta incidencia de pseudotuberculosis por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, nos planteamos el ver la

influencia de realizar sucesivas intradermorreacciones tuberculínicas en cabras infectadas de forma natural por *C. pseudotuberculosis*, así como la influencia de las mismas sobre la inmunidad humoral utilizando para ello la técnica ELISA indirecto con el antígeno A60 y el antígeno MPB70.

## **2. Material y metodos**

Para el desarrollo de este estudio hemos utilizado:

- 5 cabezas de ganado caprino con infección activa y manifiesta de seudotuberculosis, procedentes del "Valle de Agaete" (Gran Canaria), zona en la que se desconocen antecedentes de tuberculosis y paratuberculosis.

Estos animales presentaron lesiones caseosas localizadas a nivel retromamario o preescapular.

En ellos hemos aplicado las siguiente técnicas:

### **Técnicas microbiológicas**

Tras rasurado de la zona en la que estaba localizada la lesión, se procedió a su desinfección y anestesia local con xilocaina, posteriormente incidimos la misma con la ayuda de una hoja de bisturí estéril, el contenido caseoso fue vertido en frascos estériles que mantuvimos a 4°C hasta el momento de su procesado en el laboratorio.

Estas muestras fueron sembradas en Agar sangre que posteriormente incubamos a 37°C durante 24-48h.

Una vez observado crecimiento realizamos su identificación morfológica utilizando la técnica de GRAM y bioquímica utilizando galerías comerciales Api Coryne de laboratorios Biomerieux, Se Fueron realizadas también pruebas complementarias: catalasa, hemólisis sinérgica e inhibición de la B-hemólisis.

### **Intradermorreacción tuberculínica comparativa cervical**

Tras rasurado de las zonas laterales izquierda y derecha del cuello, se procedió a realizar una medición del grosor de la piel con la ayuda de un cutímetro, posteriormente inoculamos 0,1ml de PPD bovina en el lado derecho y 0,1 ml de PPD aviar en el lado izquierdo. La lectura fue realizada a las 48 postinoculación. Los animales 1,2,3 y 4, fueron tuberculinizados de forma repetida los días 1, 7, 14 y 28 de la experiencia. Antes de cada prueba alérgica se realizó una toma de sangre en cada animal, posteriormente tras dicha prueba se volvió a tomar muestras de sangre coincidiendo con el día de lectura de la técnica intradérmica. El animal número cinco sirvió de control durante toda la experiencia. No se realizó en este intradermorreacción alguna pero sí controles de grosor de la piel y toma de sangre al mismo tiempo que en el resto de los animales.

### **Método ELISA indirecto**

Empleamos esta técnica diagnóstica con dos antígenos distintos: con el antígeno MPB70 y con el antígeno A60. Sometimos a cada uno de estos dos antígenos los sueros de los cinco animales obtenidos a las 48h. posttuberculinización, así como controles positivos a *M.bovis* y sueros libres de agentes patógenos que sirvieron de controles negativos. Estos ELISAS se desarrollaron en las mismas condiciones que las ya expuestas por el Dr. Real en la comunicación expuesta en este mismo congreso, titulada " Eficacia de los antígenos MPB70 y A60 en el diagnóstico de la tuberculosis caprina por *M.bovis*."

### **3. Resultados**

#### **Resultados microbiológicos**

Tuvo lugar al finalizar la experiencia de tuberculinización, constatándose la infección por *Corynebacterium pseudotuberculosis* en los cinco animales de este grupo.

#### **Resultados a la intradermorreacción tuberculínica**

Ningún animal del grupo reaccionó de forma positiva durante el transcurso de la experiencia. No poniéndose de manifiesto diferencias en el grosor de la piel entre antes y después de tuberculinizar mayor o igual a 2 mm, diferencia a partir de la cual se considera como dudosa.

#### **Resultados a la técnica ELISA**

El punto de corte de la técnica ELISA con antígeno MPB70 quedó establecido tras estandarización de la técnica en una D O de 0.009. Una cabra (cabra nº 3) siempre resultó negativa en la técnica ELISA con antígeno MPB70. No así el resto, que seroconvirtieron a positivas después de la tercera tuberculinización. Obtuvimos unas densidades ópticas de 0.001, 0.014 y 0.018 para los animales 1, 2 y 4, respectivamente. Tras la cuarta tuberculinización intradérmica todas las densidades ópticas volvieron a ser negativas, excepto el animal número 4, que aumentó la reacción frente al antígeno MPB70 dando una D O de 0.023. Todos los animales resultaron negativos antes de ser tuberculinizados.

El punto de corte al antígeno A60 en la técnica ELISA quedó establecido en 0.396.

Con este antígeno dos (nº 3 y 4) de los cuatro animales dieron un resultado positivo (0.434 y 0.4263, respectivamente) con antígeno A60 antes de ser sometidos a la tuberculinización intradérmica. Tras la primera intradermorreacción ambos seroconvirtieron a negativos. La cabra 3 tras la tercera tuberculinización muestra una D O de 0.434 para volver a ser negativa después de la cuarta prueba alérgica. Llama la atención la respuesta del animal número 4 con D O superiores al punto de corte antes de ser tuberculinizado. Después de la segunda y de la tercera tuberculinización, las D O de este animal sufrieron un ascenso a la positividad para volver a ser negativo tras la cuarta tuberculinización.

La cabra 2 inicialmente negativa, también desarrollo una respuesta sinusoidal (0.344, 0.338, 0.434, 0.313) con final seronegativo.

En cuanto a la cabra 1 únicamente mostró seroconversión positiva (0.414) tras la primera tuberculinización.

Debido a que el animal número cuatro se mostró positivo en distintos momentos para ambos antígenos (MPB70 y A60) fue sacrificado en busca de una posible tuberculosis, aunque en ningún momento mostrara reacción de hipersensibilidad a la tuberculina bovina o aviar. Tras inspección minuciosa de la canal, vísceras y ganglios no se pudo poner de manifiesto lesión alguna que no fueran la propias de pseudotuberculosis. La siembra de dichas lesiones en medios para micobacterias (Löwenstein Jensen con y sin piruvato) no obtuvieron crecimiento alguno.

#### 4. Discusión

La lucha de la tuberculosis en ganado vacuno se rige por nuestra legislación vigente adecuada a los criterios comunitarios. Para el diagnóstico de la tuberculosis caprina no existen en nuestro país medidas reglamentarias, basándose actualmente en nuestro país en las mismas bases legislativas que para el ganado vacuno (ANONIMO, 1985).

Para algunos autores (THOREL, 1980, 1984) la cabra se mantiene en los mismos niveles (en cuanto a dosis de tuberculina, punto de inoculación y mm a partir de los que se considera a un animal positivo) que el ganado vacuno. Otros, sin embargo, opinan que la lectura ha de realizarse a las 48 h post-inoculación (SHAROV, 1986). G.M. ALLEN y cols. (1987) opinan que la lectura ha de realizarse a las 72 h y consideran como reacción positiva una hinchazón visible y palpable o un incremento de grosor de 2 mm o más, o simplemente la aparición de inflamación y edema. Nosotros hemos elegido las indicaciones de A.N. SHAROV (1986) que realiza la lectura en ganado caprino a las 48 h pos-inoculación con muy buenos resultados, al igual que M. HARBOE y cols. (1990) en ganado vacuno.

Existe controversia en la sensibilidad y especificidad que esta técnica intradérmica presenta en el ganado caprino máxime si tenemos en cuenta que la cabra puede afectarse por otras patologías infecciosas producidas por otras micobacteria e incluso bacterias pertenecientes a géneros cercanos como *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Así LU y cols. (1992) observan que de tres caprino positivos a la prueba de la tuberculina tan solo en uno aísla *M.bovis* y de los otros dos *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Asimismo B. ACOSTA y cols. (1993) aíslan de caprinos positivos a la tuberculina *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Si bien en nuestro estudio no hemos podido poner de manifiesto la aparición de falsos resultados positivos a la intradermorreacción tuberculínica en cabras infectadas por dicho microorganismo, aún realizando intradermorreacciones sucesivas.

Consideramos que los valores de positividad que hemos obtenido con la técnica ELISA con el antígeno MPB70 se han debido mayormente al corto periodo de intertuberculinización (7 días), más que a la infección por *C.pseudotuberculosis* si tomamos en cuenta la experiencia previa de Nagai y cols. 1981 que describen a MPB70 como una proteína estable contenida en la PPD.

Llama la atención observar como con el antígeno 60 mediante el método ELISA se detectan variaciones en la inmunidad humoral que parecen estar más debidas a la infección por *C.pseudotuberculosis* que a las sucesivas intradermorreacciones efectuadas, ya que incluso antes del comienzo de la experiencia se detectan animales positivos, aunque en este caso también podrían estar influyendo las intradermorreacciones sucesivas, debido que al igual que el antígeno MPB70 este antígeno A60 es descrito por Cocito y cols., 1986, como una proteína estable contenida en la PPD.

### Bibliografía

- Acosta, B., Real, F., Ferrer, O. y Déniz, S. (1993) *Tuberculosis caprina en Gran Canaria y Tenerife*. SEOC, Albacete, 23-25 Septiembre.
- Allen, G.M. and Sanson, R.L. (1987) *Tuberculosis in goats*. *Veterinary Continuing Education* **115**, 69-71.
- Anónimo (1985) *Maladies infectieuses chroniques. "Tuberculose et paratuberculose: u mise au point"*. *Chev.* **146**, 33-34.
- Cameron, C.M. and Purdom, M.R. (1971) *Immunological and chemical characteristics of Corynebacterium pseudotuberculosis cell walls and protoplasm*. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* **43(4)**, 83-92.
- Cocito, C. and Vanlinden, F. (1986) *Preparation and properties of antigen 60 from Mycobacterium bovis BCG*. *Clin. Exp. Immunol.* **66**, 262-272.
- Harboe, M., Wiker, H.G., Duncan, J.R., Garcia, M., m, , Dukes, T.W., Brooks, B.W., Turcotte, C. and Nagai, S. (1990) *Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for antiMPB70 antibodies in bovine tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **28(5)**, 913-921.
- Lu, Y.S., Tsai, H.J., Tsung, C.S., Chen, C.C., Lee, H.L., Hung, H.H. and Lee, S.H. (1992) *Goat tuberculosis in Taiwan*. *Taiwan Prov. Res. Inst. Anim. Health.* **59**, 61-68.
- Nagai, S., Matsumoto, J. and Nagasuga, T. (1981) *Specific skin-reactive protein from culture filtrate of Mycobacterium bovis BCG*. *Infect. immunol.* **31**, 1152-1160.
- Sharov, A.N. (1986) *Intrapalpebral tuberculin test for sheep and goats*. *Veterinariya, Moscow* **8**, 44-46.
- Thorel, M.F. (1980) *Tuberculose de la chèvre: Diagnostic biologique*. *Ann. Rech. Vet.* **11**, 251-257.
- Thorel, M.F. (1984) *Tuberculose de la chèvre. Mise au point et synthèse*. *Coll. INRA* **28**, 551-557.
- Wolinsky, M.D. (1979) *Mycobacterium*, in "Tratado de Microbiología". Eds. Davis, B., Dulbecco, R., Eisen, H., Ginsberg, H., Wood, W. and McCarty, M. Salvat. 2ª Edición, Barcelona. 867-892