

Tuberculosis Bovina: relación de proporciones entre los diagnósticos anatomopatológicos macroscópico y microscópico

Dubarry, J. R^{1, 4}.; Alvarez, A. R¹.; Errea, A. L¹.; Hierro, J. A¹.; Medina, A².; Pechín, G³.; Risi, R^{2, 4}.; Vera, O. A¹.; Véspoli Pucheu, M. V¹

¹Departamento de Clínicas, ²Departamento de Epizootiología y Salud Pública y ³Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Pampa

⁴Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA)

Resumen

Existe en la actualidad un Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina, en el que uno de los métodos más importantes para estimar la prevalencia es a partir de la detección de animales enfermos mediante el diagnóstico anatomopatológico macroscópico en frigoríficos.

Para hacer confiables estos datos, se realizan otros estudios entre los que se encuentra el histopatológico. De acuerdo con la bibliografía y trabajos anteriores de los autores, la relación de proporciones entre los diagnósticos macroscópico y microscópico variaba entre el 54 y el 90%. Esta variación era excesivamente amplia para estimar la prevalencia de la enfermedad en el ganado bovino a partir de los datos obtenidos en frigoríficos.

El objetivo del presente trabajo consistió en analizar uno de los factores que inciden en la amplitud de las correlaciones halladas, aumentando el número de muestras de cada individuo sospechado de estar enfermo.

Fueron confirmados por histopatología el 60,40% de las muestras estudiadas (considerando una sola submuestra), este porcentaje aumentó al 69,80% cuando se recurrió al diagnóstico de las otras submuestras.

Para conocer la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico histopatológico se decidió realizar cultivos específicos tanto en las

muestras positivas como las negativas a dicho estudio.

Los resultados fueron los siguientes: la sensibilidad del diagnóstico histopatológico fue del 71,15% y la especificidad del 97,77%.

Este primer muestreo reveló que la prevalencia de la tuberculosis en la población estudiada y en el período analizado fue del 2,64%.

Palabras claves: bovino, tuberculosis, histopatología, bacteriología, relación de proporciones.

Summary

At present exists a National Plan of Control and Eradication of Bovine Tuberculosis, which more important methodology for the prevalence estimation through the macroscopic anatomopathology diagnosis of affected animals in the abattoirs.

To make reliable these data, it realize study like hystopathology diagnosis. At present, the correlation found about this diagnosis with respect to the macroscopic was between 54 to 90%.

The purpose of the present work was to analyze one of the incident factors in the amplitude of the finded correlations, increasing the numbers of samples of each suspected sick individuals.

The 60,40% of studied samples about histopathology method were confirmed (considering only one subsample) and the 69.80% were confirmed by the diagnosis of more one subsample.

To enhance the sensibility and the sensibility of histopathology diagnosis it decided to do specific cultures in the positives and the negatives samples.

The results were the following: the sensibility of histopathology diagnosis was 71,15% and the specificity was 97,77%.

The prevalence of the animal population studied and in the time analyzed was in order of 2,64%.

Key words: cattle, tuberculosis, histopathology diagnosis, bacteriology diagnosis, proportions relation.

Introducción

La tuberculosis bovina es una de las enfermedades de creciente importancia en Salud Pública, ya que están aumentando los casos de infección producida por *Mycobacterium bovis* en el hombre. También incide negativamente sobre la producción de carne y leche, así como sobre la inserción de los productos en los mercados internacionales, que en el presente exigen la ausencia de bacterias patógenas o fracciones de las mismas para los productos y subproductos de origen animal, ya que esta enfermedad pertenece a la lista B de la O.I.E.

En la Argentina se estima que su prevalencia, dada por los porcentajes de decomisos en frigoríficos con inspección oficial, tiene una media cercana al 4%. La única encuesta tuberculínica a nivel nacional fue realizada entre 1967 y 1971 sobre una muestra estadísticamente diseñada de 12.000 bovinos. Se determinó un porcentaje promedio de 4,3% de animales reactores positivos. el 38% de rodeos infectados (Bernardelli, 1997). Estas estimaciones se han efectuado basándose en el diagnóstico anatomopatológico macroscópico en

plantas faenadoras y a través de la intradermorreacción con PPD bovina.

Existe en la actualidad un Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina, en el que uno de los métodos más importantes para estimar la prevalencia es a partir de la detección de animales enfermos mediante el diagnóstico anatomopatológico macroscópico en las plantas faenadoras (SENASA, 1970; Torres et al., 1997).

Para verificar la confiabilidad de estos datos, se habían realizado algunos trabajos de correlación entre el diagnóstico anatomopatológico macroscópico y microscópico, encontrándose una variación entre el 54 y el 90% (Pellegrino et al., 1996; Latini et al., 1997).

Ante esto, se consideró que era necesario conocer cuáles son los factores, aislados o convergentes, que inciden en esta amplitud, con el objeto de tener mayor precisión en las estimaciones.

Uno de los objetivos del presente trabajo consistió en analizar uno de dichos factores, ya que la hipótesis que se planteó es que a mayor número de muestras de cada órgano o conjunto de órganos decomisados por tuberculosis, aumentaría la sensibilidad del diagnóstico macroscópico.

El otro objetivo fue conocer una estimación muestral de la prevalencia de la enfermedad en esta zona, concretamente de los establecimientos que faenan en este frigorífico, como un muestreo más para conocer la del país.

Materiales y Métodos

El trabajo se realizó en un frigorífico local en el que se recolectaron muestras de 149 animales que presentaron lesiones macroscópicas compatibles con TBC.

El tamaño de la muestra se calculó tomando en cuenta las siguientes estimaciones: población total de animales faenados durante seis meses (N=17.500), prevalencia esperada (P=0.05), con un nivel de confianza del 95%. Este cálculo fue realizado en base al programa EPIDAT versión 2.0 (Lwanga y Lemeshow, 1991).

Se recolectaron todos los órganos que presentaban estas lesiones, siguiendo la rutina del personal sanitario. Luego de describirlas se tomaron hasta tres submuestras de cada decomiso, la mitad se fijó en formol al 10% para su estudio histopatológico y la otra mitad se colocó en un recipiente estéril para realizarles cultivos posteriores en Stonebrink y Löwenstein Jensen, conservándolas en el freezer (-20 °C).

A las submuestras fijadas en formol se las procesó para su inclusión en parafina y se realizaron dos cortes con micrótopo, uno se tiñó con la técnica de Hematoxilina-Eosina y al otro con la técnica de Ziehl Neelsen, específica para microorganismos ácido alcohol resistente (ver fotos 1-2).

El diagnóstico histopatológico (anatomopatológico microscópico) positivo se basó en la observación de la morfología típica del granuloma con tinción H-E o bien en presencia de células epitelioides con micobacterias en su citoplasma, evidenciadas por la tinción de Ziehl Neelsen (Jubb et al., 1992; Cassidy et al., 1998).

Se realizaron cultivos bacteriológicos en medios selectivos para micobacterias. Se sembraron las muestras positivas y negativas al diagnóstico histopatológico tanto en el medio de Löwenstein Jensen como en el de Stonebrink. El método de decontaminación que se empleó es el que utiliza la N-Acetil-L-Cisteína, según lo recomendado por la Red Latinoamericana y del Caribe de Tuberculosis (RELACTB) en 1998.

Los datos de Bacteriología positiva correspondieron a las muestras que

desarrollaron en los cultivos de Stonebrink.

Resultados y Discusión

Como se mencionó anteriormente, uno de los puntos de partida del Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina es la detección de animales enfermos mediante el diagnóstico anatomopatológico en las plantas faenadoras. Esta es la prueba tamiz para dicho plan. Se basa en las características de las lesiones macroscópicas, cuyo criterio de positividad lo da la observación de la morfología típica de un granuloma, o sea la presencia de una formación esférica, rodeada por tejido conectivo y con un contenido necrótico, calcificado o no. Esto lo realizan los inspectores de frigoríficos aplicando su experiencia teórica y práctica.

Debido a que la morfología macroscópica es similar a la de otras enfermedades granulomatosas, los datos obtenidos en frigoríficos deben ser confirmados posteriormente para conocer la especificidad de dicho diagnóstico. Para ello se realizan diversos estudios entre los que se encuentra el análisis de la relación de proporciones entre los diagnósticos positivos macroscópicos con respecto a los positivos histopatológicos (diagnóstico anatomopatológico microscópico). De acuerdo con la bibliografía consultada, cuando ambas pruebas se compararon la proporción variaba entre el 54% y el 90% (Dubarry y Ottavianoni, 1985). Ante esto, se consideró que era necesario analizar cuáles son los factores aislados o convergentes que inciden en esta amplitud de los porcentajes hallados.

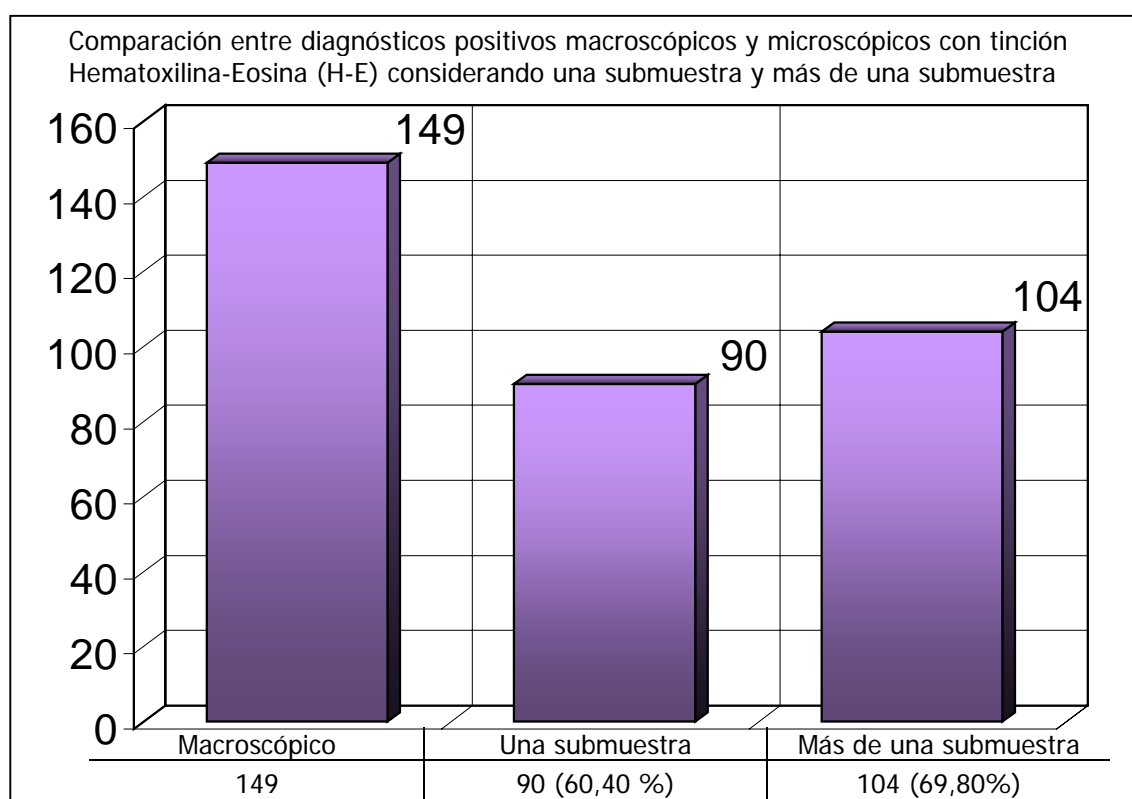
Uno de los objetivos del presente trabajo consistió en analizar uno de dichos factores, ya que la hipótesis que se planteó es que a mayor número de

muestras de cada órgano o conjunto de órganos decomisados por tuberculosis, aumentaría la sensibilidad del diagnóstico macroscópico, ya que habría una mayor probabilidad de encontrar la morfología histológica característica.

Fueron confirmadas por histopatología el 60,40% de las muestras estudiadas (considerando el estudio de una sola submuestra). Este porcentaje aumentó al 69,80% al recurrir al diagnóstico de las otras submuestras, cifra superior a las mencionadas en otros trabajos (Torres

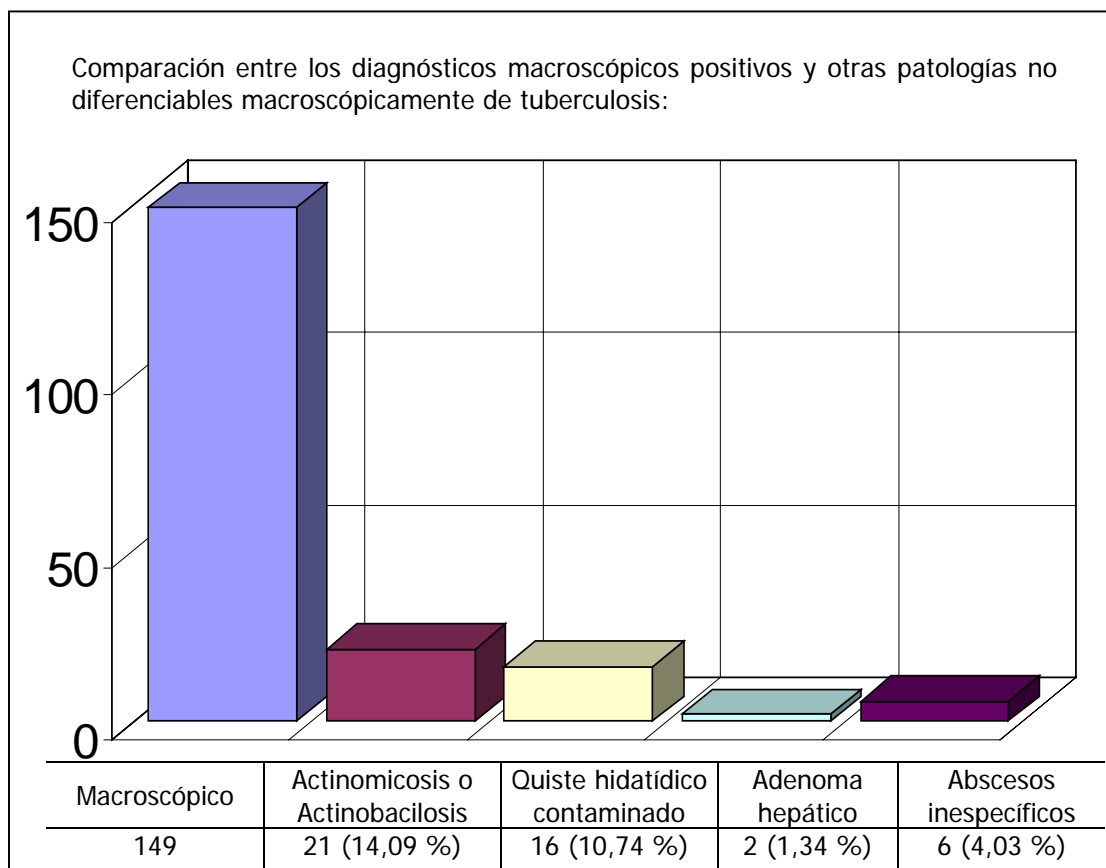
et al., 1997). Se mejoró la relación de proporciones en un 9,40%. Estas muestras hubieran sido diagnosticadas como procesos inflamatorios crónicos, aún en algunos casos no granulomatosos (cuadro 1).

Lo expuesto permitió disminuir el desvío estandar de todos los muestreos realizados hasta el presente en el país de 20,39% a 17,14%. Esto es lógico desde el punto de vista estadístico, ya que a mayor cantidad de muestras disminuye el error.



En este trabajo el 30,20% no fue diferenciable macroscópicamente de un proceso de tuberculosis. Estas patologías y sus porcentajes fueron los siguientes: Actinomicosis o Actinobacilosis (14,09%), Quistes hidatídicos contaminados (10,74%). Adenomas hepáticos (1,34%) y

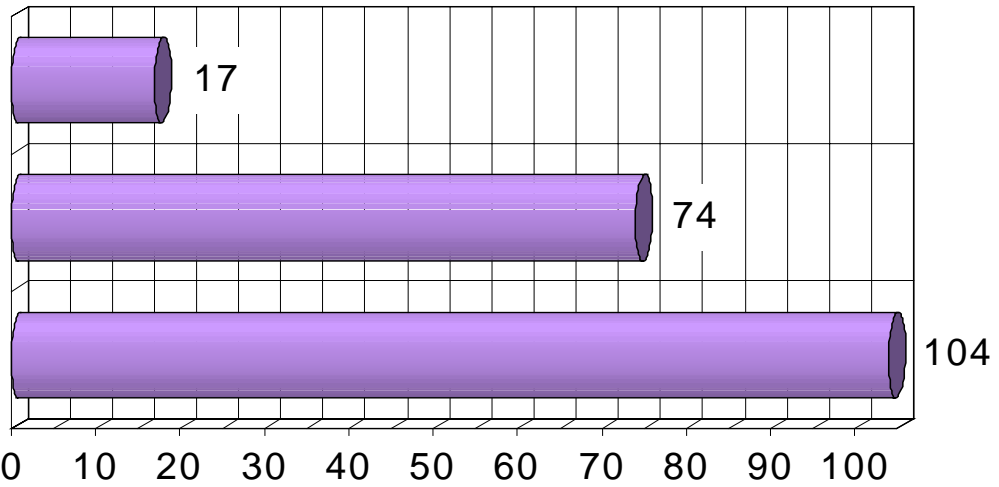
abscesos inespecíficos 4,03%. Estos datos también son importantes porque nos están manifestando los primeros datos de otro de los factores a analizar como causantes de la distorsión de las proporciones cuando se relacionan los decomisos con la realidad de la enfermedad, en esta zona geográfica.



Los trabajos sobre correlación o concordancia del diagnóstico microscópico presuntivo de TBC con otras pruebas confirmatorias en las que debe estar incluido el cultivo que es considerado altamente específico (cercano al 100%), se hacen con el objeto de determinar si solo con el diagnóstico microscópico es suficiente para considerar una muestra positiva, dicho de otra manera determinar su grado de sensibilidad y especificidad. Para conocer estas relaciones se decidió cultivar tanto las muestras positivas como las negativas a dicho diagnóstico. Los resultados fueron los siguientes: 71,15% de muestras positivas por

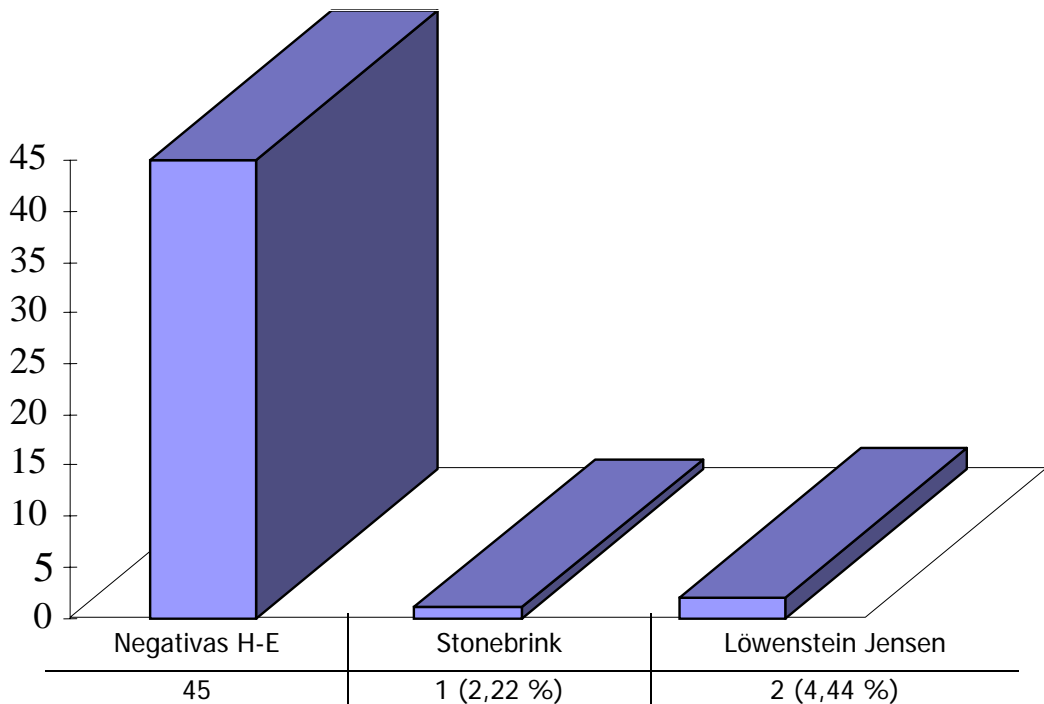
histopatología resultaron positivas también a *M. bovis* (desarrollaron en Stonebrink) y un 16,35% correspondieron a otras micobacterias (desarrollaron en Löwenstein Jensen). También se hicieron cultivos de muestras negativas al diagnóstico histopatológico para estimar su especificidad. El resultado fue el siguiente: el 2,22% de las 45 muestras negativas desarrolló en Stonebrink y el 4,44% en Löwenstein Jensen. El análisis de los datos anteriores revela que la sensibilidad del diagnóstico histopatológico fue del 71,15% y la especificidad del 97,77%.

Comparación entre el número de muestras con diagnóstico positivo con tinción H-E y positivas por cultivo en medio de Stonebrink (SB) y positivas cultivadas en medio de Löwenstein Jensen (L-J)



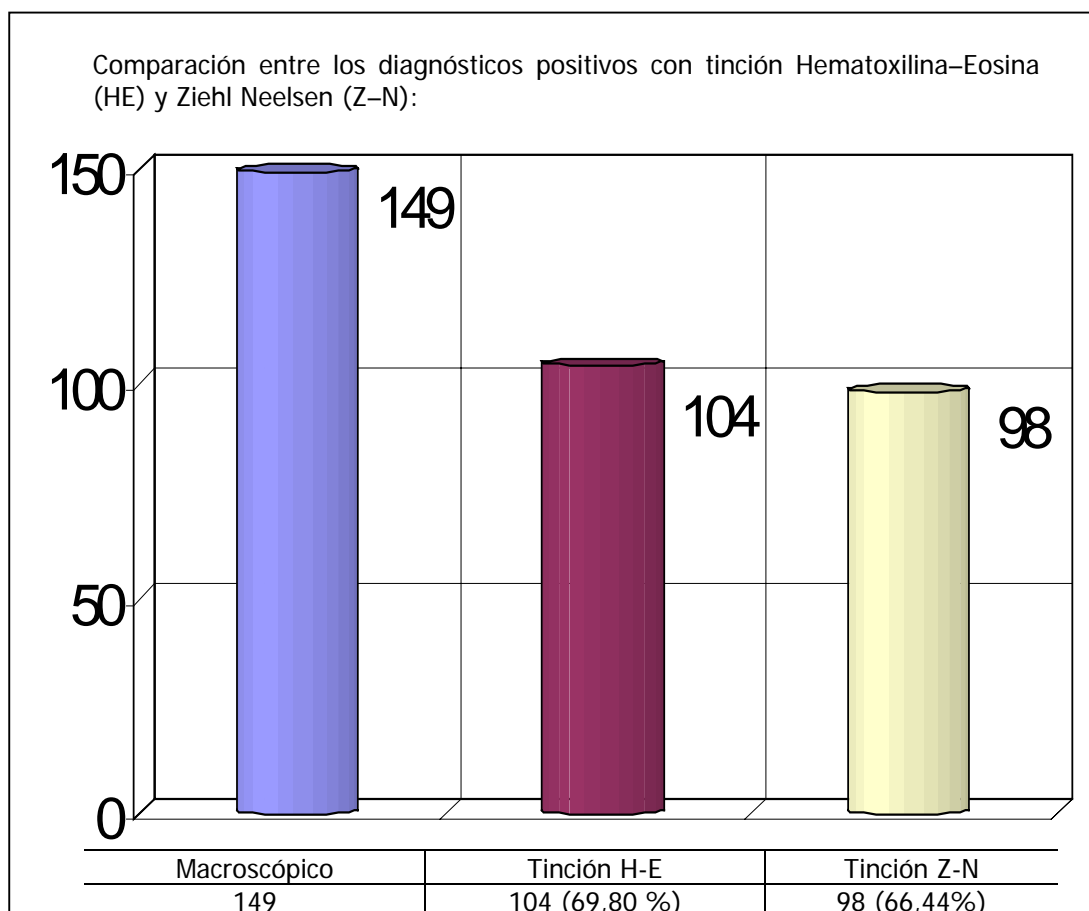
Tinción H-E	Cultivo en Stonebrink	Cultivos en Löwenstein Jensen
104	74 (71,15 %)	17 (16,35 %)

Comparación entre el número de muestras con diagnóstico negativo con tinción de H-E y los resultados en el cultivo en medio de Stonebrink y en Löwenstein Jensen:



Los porcentajes en relación al diagnóstico histopatológico positivo fueron Ziehl Neelsen versus H-E:

94,23%; cultivo Stönebrink versus H-E: 71,15%.



El 94,23% fue positivo a la coloración para ácido alcohol resistentes aunque solo se confirmó por cultivo el 75,51%, cifra muy superior a la mencionada por Latini y col. (1997) del 45,6, aunque en este caso se efectuó la baciloscopía sobre el total de los decomisos sospechosos de tuberculosis. En el mismo trabajo se señala un 97% de correlación entre el baciloscopio positivo y el cultivo.

El 71,15% se confirmó mediante cultivo, cifra intermedia entre las obtenidas por otros autores que variaban entre el 68.50% y el 96% (Latini et al., 1997) y similar al 71,30% obtenida por Pellegrino y col (1996).

En este frigorífico en promedio se faenan 17500 animales durante seis

meses y se decomisan aproximadamente 650 animales, por lo tanto la prevalencia de la enfermedad según estos datos sería del 3,71%. Pero corregido por los valores hallados de concordancia de proporciones entre los diagnósticos macroscópicos y microscópicos sería realmente del 2,64%.

Esta cifra es baja si se la compara con los valores de prevalencia a nivel nacional, pero está de acuerdo con lo que se señala en algunos trabajos (Torres et al., 1997) en los que se le da gran relevancia a cada una de las regiones en cuanto a la presencia de la enfermedad y los rangos son muy amplios variando entre el 1,35% (Torres et al., 1997) y el 5,37% (Latini et al.,

1997) en las distintas regiones y entre frigoríficos de una misma región variaba entre el 0,59% y el 11% (Latini et al., 1997). En nuestro caso la

prevalencia relativamente baja posiblemente se deba a que el 95% de los animales faenados son de consumo especial.

Foto 1. Granuloma producido por *Mycobacterium bovis*, confirmado por cultivo en Stonebrink. Nótese las características típicas de un granuloma producido por Mycobacterias, hiperplasia externa de tejido conectivo (1); acúmulo de células inflamatorias mononucleares con células gigantes (2); necrosis caseosa central (3); y calcificación (4). (40X).

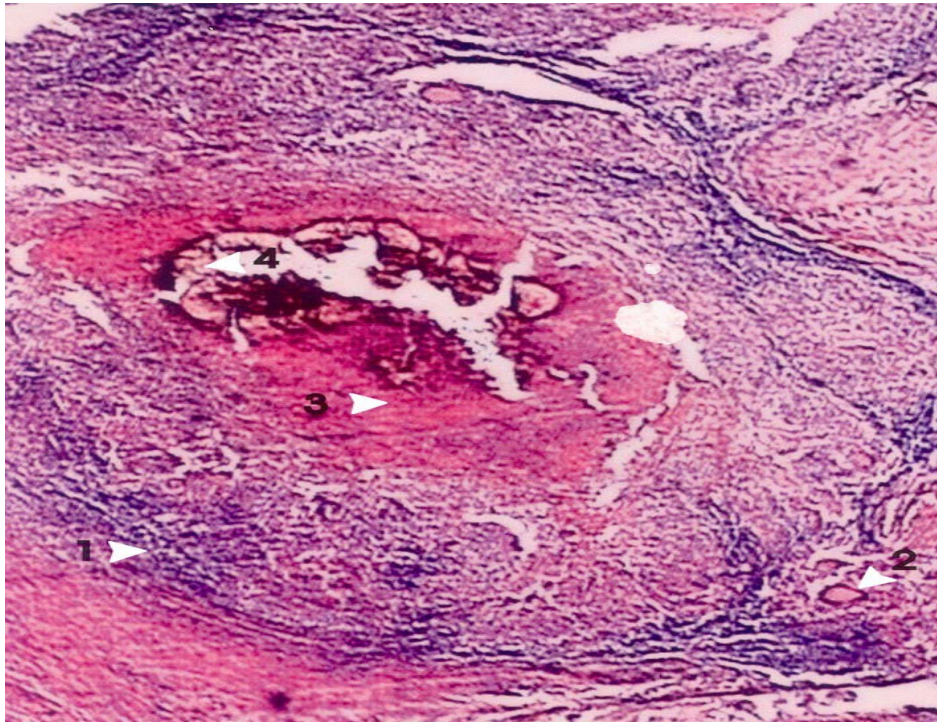
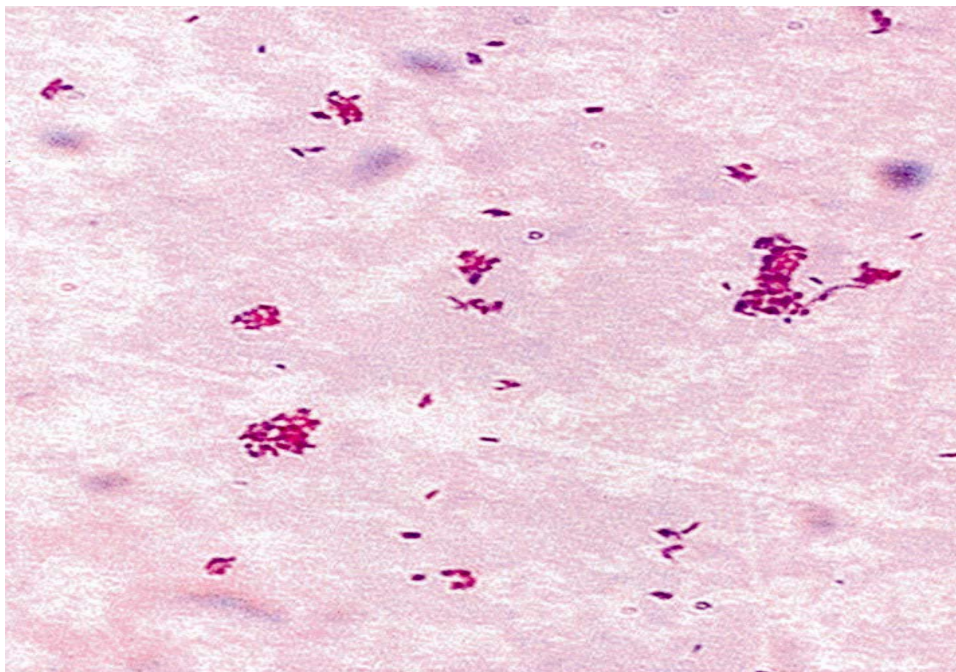


Foto 2. Extendido de colonias de *Mycobacterium bovis* que desarrollaron en el medio específico de Stonebrink teñidas con la técnica de Ziehl Neelsen. (1000X).



Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que al aumentar el número de muestras, se establece una mayor relación entre ambos diagnósticos.

Esto avala la utilización de la histopatología para verificar la sensibilidad del diagnóstico macroscópico, ya que es el que ofrece mayores ventajas para su empleo en mayor escala debido a que requiere menores gastos en cuanto a materiales e infraestructura que cumpla con las normas de bioseguridad.

También nos permiten inferir la tendencia de la prevalencia de otras enfermedades regionales que distorsionan los valores de prevalencia real de la TBC bovina utilizando el parámetro de los decomisos en este frigorífico regional.

Con los valores actuales de prevalencia de la enfermedad a nivel poblacional las diferencias no son notables, pero si pueden serlo cuando esta disminuya o cuando aparezca algún animal sospechoso en rodeos o zonas libres, también para evaluar en algunos casos la sensibilidad de la prueba tuberculínica.

En estos casos el diagnóstico deberá tener mayor exactitud. Esto hace necesario incorporar nuevas técnicas diagnósticas que permitan detectar ADN o proteínas bacterianas o fracciones de los mismos sin la interferencia de otros factores como de la recolección de las muestras, de los bacilos y las condiciones de un ambiente adecuado para su desarrollo, además estas técnicas aparecen como más rápidas 3-4 días (Miller et al., 1996) frente a los dos meses que tarda el cultivo.

También nos indican que los valores de prevalencia de la enfermedad en esta zona son bajos, aunque en lo sucesivo deberán hacerse más muestreos para

estimar mejor los valores poblacionales regionales.

Bibliografía

- Bernardelli, A.** 1997. Realidad Argentina en Tuberculosis. Revista Medicina Veterinaria N° Centenario: 133-135.
- Cassidy, J. P.; Bryson, D. G.; Pollock, J. M.; Evans, R. T.; Forster, F.; Neill, S. D.** 1998. Early lesion formation in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. Journal of Comparative Pathology, 119: 1, 27-44.
- Cosivi, O.; Grange, J. M.; Daborn, C. J.; Raviglione, M. C.; Fujikura, T.; Cousins, D.; Robinson, R. A.; Huchzermeyer, H. F. A.; Kantor, I. N.; Meslin, F. X.** 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerging Infectious Diseases, 4: 1.
- Dubarry, J. R.; Ottavianoni, L. A.** 1985. Un aporte para el estudio de la tuberculosis bovina en la provincia de La Pampa. Veterinaria Argentina, 2: 14.
- Jubb, K. V. F.; Kennedy, P. C.; Palmer, N.** 1992. Pathology of Domestic Animals. Academic Press. Inc. 4° Ed. p. 641-648.
- Kantor, I. N.; De la Vega, E.; Caballero, P. J.; Piñanez, D.** 1981. Estudio de órganos bovinos decomisados por tuberculosis en mataderos del gran Buenos Aires. Revista Medicina Veterinaria, 62.
- Latini O.; Canal A. M.; Ferrara, M. E.; Sequeira, M. D.; Sequeira, G.; Bagnaroli R.; Torres, P.** 1997. Confiabilidad en la determinación de prevalencia de infección de *Mycobacterium bovis* en ganado bovino por decomisos en frigoríficos. Archivos. Medicina Veterinaria, XXIX, N° 2: 197.
- Lwanga, S. K.; Lemeshow, S.** 1991. Determinación del tamaño de las muestras en los estudios sanitarios" O.M.S.
- Mc. Graw, H.** 1968. Manual of histologic staining methods. Armed Forces Institute of Pathology. 3ª Ed. p. 220.
- Miller, J. M.; Jenny, A. L.; Rhyan, J. C.; Saari, D. A.; Suarez, D. I.** 1996. Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues of cattle and elk by PCR amplification of an IS6110 sequence specific for mycobacterium

tuberculosis complex organisms title
CHG.2-24-97. TEKTRAN. United States
Department of Agriculture. Agricultural
Research Service.

**Ottavianoni, L. A.; Bernardelli, A.;
Dubarry, J. R.** 1986. Aspectos sobre
tuberculosis porcina en la provincia de la
Pampa. Veterinaria Argentina, 3: 25.

**Pellegrino, F.; Oliva, G.; Carfagnini, J.;
Kantor, I.; Pinto, S.; Underwood, S.;
Reniero, A.; Puentes, A.; Torres, P.;
Alvares Peralta, E.** 1996. Bases
anatómicas para los criterios de decomiso
parcial por tuberculosis en bovinos. Revista
Medicina Veterinaria, 77: 241-246.

Plan Nacional de Control y Erradicación de
la Tuberculosis Bovina. Servicio Nacional
de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
(SENASA).

**Primer Seminario Internacional sobre
Tuberculosis Bovina para las Américas.**

1970. Santiago de Chile, OPS / OMS. N°
258.

**Seminario Taller sobre Control y
Erradicación de la Tuberculosis Bovina.**
1997. SENASA.

**Torres, P.; Pérez, A.; Andrada, M.;
Riart, G.; Sarradell, J.** 1998. Estudio de
prevalencia de TBC bovina evaluada por
inspección macroscópica de los animales
faenados en los frigoríficos con inspección
federal de la República Argentina en el
período marzo 1995-febrero 1997.
(Programa nacional de lucha contra la
tuberculosis bovina).

**Zumarraga, M.; Cataldi, A; Bigi, F;
Alito, A.; Romano, M.** 1999. Aplicación
de la reacción en cadena de la polimerasa
(PCR) en la detección de micobacterias en
la leche. Revista Argentina de
Microbiología, (Supl. 1): 4-5.