

# MÉTODOS PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA

Dres. Isabel N. de Kantor e I. W. Lesslie<sup>1</sup>

*La inoculación al cobayo se ha considerado hasta la fecha como el mejor método para demostrar la existencia de bacilos tuberculosos bovinos, especialmente en especímenes que contienen un número escaso de ellos. En este trabajo se compara este método con el de la realización de cultivos en el medio de Stonebrink.*

## Introducción

La inoculación al cobayo se ha considerado tradicionalmente como el método de elección para el diagnóstico bacteriológico de la infección por *Mycobacterium bovis*. No obstante, en los últimos años, en los laboratorios de bacteriología de la tuberculosis se ha generalizado el empleo de los medios de cultivo a base de piruvato (1, 2), que permiten un desarrollo eugónico del bacilo bovino.

Por otra parte, la inoculación al cobayo en la práctica de rutina de un laboratorio, presenta ciertas exigencias de orden económico tales como la adquisición de animales, instalaciones y equipo, personal y mantenimiento, que resultan muy elevadas al compararlas con las que se requieren para la realización de cultivos.

Al considerar estos hechos, los autores compararon los resultados obtenidos con uno y otro procedimiento, mediante el empleo de materiales de orígenes distintos.

## Materiales y métodos

Se efectuaron tres experiencias (cuadro 1). En las dos primeras, los especímenes estaban constituidos por suspensiones bacilares muy diluidas, que en general contenían un número escaso de bacilos y, en la tercera, se trabajó con ganglios de cerdos que presentaban lesiones macroscópicas semejantes a tuber-

culosis. Los materiales y métodos empleados en cada una de estas experiencias fueron los siguientes:

1. Los homogeneizados se prepararon de trozos de bazos, extraídos de cobayos sacrificados 30 días después de inocularlos por vía subcutánea con suspensiones concentradas de *M. bovis*. Se decontaminaron por tratamiento con hidróxido de sodio al 4%, durante 15 minutos a 37°C, y con neutralización, centrifugación y lavado posteriores. Se efectuaron diluciones de los homogeneizados del orden de  $10^{-3}$  y  $10^{-5}$  en agua destilada, y se inoculó 1 ml por vía subcutánea a cada uno de dos cobayos y se sembró otro ml en cinco tubos de medio de Stonebrink.

2. Se prepararon suspensiones de cultivos jóvenes de *M. bovis* en medio de Stonebrink que contenían aproximadamente 1 mg/ml de bacilos, las que eran luego diluidas a  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$ . Se inoculó 1 ml de cada una de esas diluciones, en agua destilada, a dos cobayos, por vía subcutánea, y se cultivó igual volumen en la misma forma que en el ejemplo anterior.

3. Se trataron trozos de ganglios de cerdos—de materiales enviados por la Inspección Veterinaria del Frigorífico Lisandro de la Torre, de Buenos Aires—en morteros, con arena y agua estériles, a fin de preparar suspensiones concentradas. Se inoculó 1 ml de cada una de ellas a dos cobayos por vía subcutánea, se decontaminó el mismo volumen en la forma descrita en el epígrafe 1, y

<sup>1</sup> Centro Panamericano de Zoonosis, Ramos Mejía, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

CUADRO 1—Investigación de *M. bovis* por inoculación al cobayo, y por cultivo en medio de Stonebrink, resultados obtenidos en las tres experiencias.

Inoculación	Cultivo	Experiencia	No. <sup>a</sup>	%
(+)	(+) {	(a)	10/20	50.0
		(b)	28/38	73.6
		(c)	70/109	64.2
		Total	108/167	64.6
(-)	(-) {	(a)	4/20	20.0
		(b)	6/38	15.8
		(c)	30/109	27.6
		Total	40/167	24.0
(+)	(-) {	(a)	5/20	25.0
		(b)	2/38	5.3
		(c)	7/109	6.4
		Total	14/167	8.4
(-)	(+) {	(a)	1/20	5.0
		(b)	2/38	5.3
		(c)	2/109	1.8
		Total	5/167	3.0

<sup>a</sup>Se presenta como fracción del total de materiales empleados en cada experiencia.

se sembró de manera similar que en las experiencias anteriores.

Tres semanas después de la inoculación, se administró a todos los cobayos 125 U.I. de derivado proteínico purificado (PPD) mamífero y 100 U.I. de PPD aviar (ambos provenientes de Weybridge, Inglaterra). La lectura de la reacción se realizó a las 24 horas. Todos los cultivos se incubaron a 37°C y se observó el desarrollo de colonias a los 4, 8, 12, 30 y 60 días.

### Resultados

El cuadro 1 presenta los resultados totales y los obtenidos en cada una de las experiencias, ya que el origen y tratamiento de los materiales fueron diferentes. La menor eficacia del cultivo frente a la inoculación se dio en la experiencia 1, en la que se emplearon bazos de cobayos tuberculosos. En la experiencia 2, el cultivo y la inoculación mostraron idéntica eficacia para el aislamiento del *M. bovis*, a partir de suspen-

siones provenientes de cultivos. En la experiencia 3—en la que se empleó ganglios de cerdos—el cultivo permitió el diagnóstico de un 6.3% menos de casos de tuberculosis bovina, que la inoculación. Solo se decontaminaron las porciones de ganglios destinadas al cultivo.

Si se considera el total de resultados positivos por ambos métodos (cuadro 2), se puede observar que un 96.0% se obtuvo por inoculación al cobayo y un 89.0% por cultivo. La diferencia fue, por consiguiente, de un 7% a favor de la inoculación al cobayo.

### Comentarios y conclusiones

De acuerdo con este estudio, la inoculación al cobayo sigue mostrando ventajas sobre el método de cultivo para el diagnóstico de la tuberculosis bovina.

Al mismo tiempo, deben considerarse los factores siguientes.

1. Cuando se trabaja con materiales de origen animal, no solo se aísla *M. bovis*, sino también *M. avium* y las llamadas micobacterias “atípicas”. De no realizarse cultivos, tanto estas últimas como el bacilo aviar, no serían puestos de manifiesto por no ser patógenos para el cobayo.

2. Los resultados relativos de la inoculación al cobayo, mejoran cuando—como se ha visto en la experiencia 3—se inoculan los especímenes sin previo tratamiento de decontaminación, ya que este siempre elimina una proporción variable de bacilos tuberculosos. Pero también se corre el riesgo de que se produzca la muerte de cobayos por causas diferentes a tuberculosis.

3. Como se señaló al principio, debe

CUADRO 2—Determinaciones de *M. bovis* realizadas por inoculación al cobayo y por cultivo en medio de Stonebrink. Resultados generales.

Materiales (+)	No.	%
Por inoculación	122	96.0
Por cultivo	113	89.0
Total	127	100.0
Diferencia	9	7.0

considerarse también el costo de instalación y mantenimiento de un bioterio frente al de realización de cultivos.

Al tener en cuenta estos factores, los laboratorios de diagnóstico que dispongan de un cuantioso material para estudio, deberían optar por el método de cultivo y emplear los medios a base de piruvato y huevos (1, 2). Esto debe aplicarse especialmente al considerar las condiciones actuales de América Latina donde, por regla general, los recursos financieros con que cuentan los laboratorios de diagnóstico no son muy amplios.

Por otra parte, el estudio y desarrollo constantes de los medios de cultivo ofrece la posibilidad de que en lo futuro disminuya la desventaja del método de cultivo con respecto al de inoculación.

#### Resumen

Se efectuó una comparación de la efectividad de los métodos de inoculación al cobayo y de cultivo en medio de Stonebrink, para la

investigación del *M. bovis*. Se emplearon diferentes tipos de especímenes en tres experiencias. La inoculación al cobayo dio mayor número de resultados positivos que el cultivo, salvo cuando se empleaban suspensiones bacilares diluidas, provenientes de cultivos de *M. bovis*. Al evaluar ambos procedimientos se consideran la importancia de los costos, que son siempre superiores para la inoculación que para la realización de cultivos, y la existencia, en muestras de origen animal, de otras especies micobacterianas diferentes del bacilo bovino, y no patógenas para el cobayo.

Se concluye que los laboratorios de diagnóstico bacteriológico pueden prescindir de la inoculación al cobayo, optando por realizar cultivos en medios a base de piruvato para la investigación del bacilo bovino.

En lo futuro, el mejoramiento constante de los medios de cultivo ofrece la posibilidad de variación en las diferencias observadas hasta la fecha. □

#### REFERENCIAS

- (1) Stonebrink, B. A new medium for the culture of *M. tuberculosis*. Selected papers (2):1-41, 1961.  
 (2) Lesslie, I. W. A comparison of biological and some cultural methods for the primary isolation of *M. tuberculosis*. *J Comp Path* (69):1-10, 1959.

#### Methods for the bacteriological diagnosis of bovine tuberculosis (Summary)

The effectiveness of the guinea pig inoculation method and of culture in Stonebrink medium for identifying *M. bovis* is compared, different types of specimens being used in three experiments. Guinea pig inoculation gave a higher number of positive results than the culture technique, except when diluted bacillar suspensions from *M. bovis* cultures were used. In evaluating the two procedures, consideration was given to the cost, which is always higher for inoculation than for the culture method, and the existence in samples of

animal origin of other mycobacteria different from the bovine bacillus and not pathogenic for the guinea pig.

It is concluded that for identification of the bovine bacillus, diagnostic laboratories can omit guinea pig inoculation and adopt pyruvate-based culture media instead.

The improvement of culture media in the future will make it possible to eliminate the differences currently observed.

#### Métodos para o diagnóstico bacteriológico da tuberculose bovina (Resumo)

Para a pesquisa do *M. bovis*, comparou-se a eficácia dos métodos de inoculação em cobaia e de cultivo em meio de Stonebrink. Empregaram-se diferentes tipos de espécimes em três experiências. A inoculação em cobaia deu maior número de resultados positivos do que o cultivo, a não ser quando do emprego de suspensões bacilares diluídas, provenientes de cultivos de *M. bovis*.

Na avaliação de ambos os processos consideraram-se a importância dos custos, que na inoculação são sempre superiores aos da realização de culturas, e a existência, em amostras de origem animal, de outras espécies micobacterianas diferentes do bacilo bovino e não patogênicas para a cobaia.

Concluiu-se que os laboratórios de diagnóstico

bacteriológico podem prescindir da inoculação em cobaia, optando por culturas em meios com base de piruvato para a pesquisa do bacilo bovino.

#### Méthodes pour le diagnostic bactériologique de la tuberculose bovine (Résumé)

L'auteur a comparé l'efficacité des méthodes d'inoculation du cobaye et de la culture en milieu de Stonebrink pour l'analyse du *M. bovis*. Il a utilisé divers types de spécimen dans trois expériences. L'inoculation du cobaye a donné plus de résultats positifs que la culture sauf lorsqu'on a employé des suspensions bacillaires diluées provenant de cultures de *M. bovis*. Lorsqu'on évalue les deux procédés, on tient compte de l'importance des coûts qui sont toujours plus élevés pour l'inoculation que pour la culture, ainsi que de

Para o futuro, o constante melhoramento dos meios de cultivo oferece a possibilidade de variação nas diferenças até agora observadas.

l'existence chez des échantillons d'origine animale, d'autres espèces mycobactériennes différentes du bacille bovin et non pathogène pour le cobaye.

L'auteur conclut que les laboratoires de diagnostic bactériologique peuvent se passer de l'inoculation du cobaye pour plutôt réaliser des cultures en milieu à base de piruvate pour l'étude du bacille bovin.

Dans l'avenir, l'amélioration constante des milieux de culture offre une possibilité de variation dans les différences constatées jusqu'à ce jour.