

# LA TUBERCULINIZACION

## Y EL PROBLEMA DE LAS REACCIONES TUBERCULINICAS DUDOSAS E INESPECIFICAS EN EL GANADO VACUNO (\*)

Prof. Dr. M. Cordero del Campillo

Catedrático

Facultad de Veterinaria de León

«La sanidad constituye la primera base de la rentabilidad animal».

Cuando KOCH descubrió la tuberculina (1890) con la pretensión de hallar un producto terapéutico o inmunizante, siguiendo la tendencia en boga a finales del siglo pasado entre los microbiólogos, puso en nuestras manos un recurso diagnóstico, gracias al cual se ha eliminado la tuberculosis en extensos territorios. Como es bien sabido, la reacción tuberculínica se debe a la presencia de anticuerpos en las células mesenquimales activas de los tejidos, elaborados en respuesta a determinadas sustancias liberadas por el bacilo tuberculoso en el organismo. En la actualidad, la mayor parte de los investigadores admiten que el papel más importante lo desempeñan las proteínas microbacterianas. De ellas, las más interesantes parecen ser las lipoproteínas, considerándose que las nucleoproteínas son menos activas o están desprovistas de acción, aunque la dificultad de separación de unas y otras, si no se recurre a la electroforesis, hace todavía prematuro juzgar definitivamente este extremo. Pero aparte de las proteínas del bacilo tuberculoso, otras sustancias pueden potenciar su acción. Experimentalmente, PLACIDE y SAUNIE (1961) han observado que la aplicación de tuberculina sintética, adicionada de caldo bovino, proporciona reacciones más netas que cuando se aplica aisladamente. IDE y colaboradores (1961) consideran, en cambio, con idéntica actividad, diversas fracciones proteicas.

Los anticuerpos alergizantes existen en todo el organismo. Por ello, cuando se aplica la tuberculina por vías que permiten una distribución sistémica (subcutánea o intravenosa, por ejemplo), se produce en todos los puntos donde existe alguna lesión tuberculosa una *reacción inflamatoria*

*focal*, y también una *reacción general*, esta última a cargo de las diversas células sensibilizadas que se hallan distribuidas por todo el organismo, las cuales liberan histamina y sustancias histaminoides (sustancia H). Mas si la tuberculina se deposita en lugares desde donde difícilmente puede difundirse a todo el organismo, la reacción es simplemente *local*, corriendo a cargo de las células sensibilizadas existentes en aquel preciso punto, sin que se llegue a perturbar el estado general del animal, o a lo sumo, de modo poco intenso y efímero.

Como sucede con todos los fenómenos biológicos, cuya característica fundamental es la variabilidad, el elevado cociente de inestabilidad, la aplicación de la tuberculina no siempre proporciona resultados inconfundibles, unánimemente juzgados por diferentes personas. Un breve repaso a la literatura sobre este tema pone de manifiesto la existencia de numerosas clases de tuberculina, diversas técnicas de aplicación y variados criterios interpretativos. ¿Por qué? Sencillamente, porque nuestros conocimientos sobre el mecanismo íntimo de la reacción alérgica en la tuberculosis no son todo lo profundos que fuera de desear, lo cual, unido a la gran cantidad de variables que intervienen, condicionando el resultado de la tuberculización, hacen difícil la uniformidad de los resultados a obtener.

En la tuberculización intervienen tres grupos de variables: I, *tuberculina* (tipo, concentración, dosificación, etc.); II, *técnica* (zona de aplicación material utilizado, criterios de interpretación, etcétera), y el III, *individuo* (estados reaccionales diversos, sensibilización frente a otros alérgenos, etcétera).

I. Hablar de tuberculina, sin precisar más de

(\*) Lección pronunciada ante los veterinarios empleados en las Campañas de Saneamiento, en el Laboratorio Pecuario Regional del Duero. León, octubre de 1962.

tales, es cometer una grave imprecisión. No hay una tuberculina, sino muchas tuberculinas, que difieren en cuanto a las cepas utilizadas, medios de cultivo, técnicas de concentración y otros factores. Por ello, los productos finales pueden ser distintos hasta límites verdaderamente insospechados, aunque tengan en común la presencia de la proteína microbacteriana fundamental. Sin embargo, el papel desempeñado por otras sustancias presentes en la tuberculina, y las variaciones que pueden derivarse simplemente de pequeñas modificaciones de la técnica, hacen cada día más recomendable el utilizar protocolos rigurosamente ajustados y la máxima atención a todos los detalles de preparación, incluyendo la calidad de los envases (vidrios neutros, siliconados, etc.) (VIELLAUME, 1960).

Para obtener una buena tuberculina, inicialmente se requiere partir de cepas adecuadamente seleccionadas por su capacidad de producción proteica. Según los fines que se pretendan, y de acuerdo con la especie animal en que se van a emplear, así se eligen bacilos pertenecientes a uno u otro tipo. Para el ganado vacuno se ha empleado el tipo humano inicialmente, pero cada día son más los especialistas que prefieren los tipos bovinos, como medio de obtener reacciones alérgicas más claras (NICOLAUS y MICHAEL, 1961). La tuberculina aviar también se aplica en el ganado vacuno para esclarecer algunas reacciones dudosas o inespecíficas, aparte de su utilidad en el diagnóstico de la paratuberculosis. Como norma general, también es recomendable utilizar más de una cepa, con lo cual tenemos la seguridad de cubrir un mayor campo antigénico.

La tuberculina «ideal» todavía no se ha conseguido, pero si tuviéramos que fijar sus cualidades, habría que decir que sería aquella que proporcionara un 100 por 100 de resultados específicos y ninguna reacción inespecífica. Por el momento, una tuberculina será tanto mejor cuanto más alto sea el valor del cociente «reacciones específicas/reacciones inespecíficas».

Aparte de algunas tuberculinas cuya aplicación no ha pasado del terreno experimental (fracciones A, B y C de SEIBERT (1949), tuberculina IP-48 del Instituto Pasteur de París y extracto fenólico de JONES y col. (1953), este último con perspectivas esperanzadoras) las tuberculinas pueden incluirse en uno de estos grupos:

a) *Tuberculina de KOCH*.—Se conoce en la literatura mundial con el nombre de tuberculina «vieja» (AT = «alt Tuberkulin», en la literatura alemana, y OT = «old tuberculin», en la anglosajona). Se prepara con cultivos en caldo glicerina-

do, que a las 6-8 semanas se esterilizan a corriente de vapor y seguidamente se someten a evaporación en baño María, con el fin de reducir su volumen a 1/10. Así se obtiene la «tuberculina bruta», que presenta aspecto siruposo, oleoso, amarillo-marrón y se conserva durante años sin adición de conservador.

El inconveniente más grave de esta tuberculina es la variable concentración de principios activos que contiene, según haya sido de frondoso o escaso el crecimiento. Además, el tratamiento térmico evapora o destruye productos con posible actividad. Y, por último, en el caldo de cultivo existen ya algunas sustancias extrañas al bacilo tuberculoso, que pueden influir sobre el resultado de la reacción, aparte de que no todos los metabolitos elaborados por el bacilo ni todas las sustancias que lo integran tienen actividad como alérgenos.

b) *Tuberculinas sintéticas*.—Reciben este nombre las elaboradas partiendo de medios de cultivo sintéticos, desprovistos de proteínas animales. DORSET (1934) y otros prepararon medios adecuados para eludir la presencia en el producto final de sustancias proteicas independientes de las elaboradas por el germen tuberculoso, que podían dar lugar a reacciones inespecíficas. En estos medios la única fuente energética suele ser la glicerina y como principios nitrogenados orgánicos solamente contienen ciertos aminoácidos (asparagina, sobre todo). Por lo tanto, los productos proteicos que aparezcan ulteriormente en el medio habrán tenido que ser sintetizados por el bacilo tuberculoso.

La técnica de concentración sigue las pautas de KOCH, por lo cual también muchas de las tuberculinas sintéticas pierden proteínas por coagulación por el calor. En algunos institutos se evita este inconveniente disponiendo la concentración en vacío. El medio más empleado para la preparación de esta tuberculina es el de SAUTON, y el producto se etiqueta como tuberculina «S». El Patronato de Biología Animal de Madrid elabora este tipo de tuberculina e igualmente muchas instituciones extranjeras.

c) *PPD*.—Esta sigla deriva de la expresión inglesa «Protein Purified Derivative», es decir, derivado proteico purificado. Existen varias técnicas para la preparación, pero, en general, probablemente la más difundida es la que se utiliza en Weybridge (Inglaterra), que en pocas palabras consiste en lo siguiente: los cultivos en medios sintéticos líquidos se someten a corriente de vapor para matar los bacilos. Los cuerpos bacterianos se eliminan por filtración y la proteína exis-

tente en el filtrado se precipita mediante ácido tricloroacético. Después de eliminar el líquido sobrenadante, el sedimento se lava tres veces mediante centrifugación y, por fin, una vez bien purificado, se vuelve a resuspender en solución concentrada. Los residuos particulados se eliminan mediante centrifugación y el resto se diluye de modo que contenga una cantidad determinada de proteína por ml. Acto seguido se filtra por placa SETZ y se envasa.

Indudablemente, la principal ventaja de las PPD es que pueden tipificarse con rigor y que no contienen más que sustancias específicamente elaboradas por el bacilo tuberculoso. De todos modos, como ya mencionamos antes, bien por las dificultades de su producción, bien porque algunos autores consideran que es excesiva la eliminación de otras sustancias presuntamente activas en combinación con la proteína (ciertos polisacáridos, etcétera), en la mayoría de los países se siguen empleando las tuberculinas sintéticas. También el Patronato de Biología Animal ha utilizado esta tuberculina, a través de los Laboratorios Pecuarios, en las campañas de saneamiento.

Uno de los factores de la reacción tuberculínica es de índole cuantitativa. En principio, se requiere una determinada cantidad de tuberculina para desencadenar una respuesta positiva. De ahí el valor que tiene la titulación de la tuberculina, para fijar una unidad. Desde los tiempos de KOCH, se empleó el cobayo infectado con bacilos tuberculosos cuatro semanas antes de la prueba. Se considera como unidad en este método la cantidad mínima de tuberculina que, aplicada subcutáneamente, produce la muerte en un plazo que oscila entre 24-36 horas. Como en este caso se requieren varios animales para cada una de las diluciones a emplear, la titulación se ha modificado utilizando un solo cobayo infectado, al que se inoculan intracutáneamente series de diluciones de la tuberculina problema, comparándolas con las proporcionadas por diluciones semejantes de una tuberculina tipo. En este caso llegan a considerarse significativas diferencias del 30-50 por 100 existentes entre una y otra.

La limitación del empleo del cobayo es que los resultados en él obtenidos no siempre corresponden al comportamiento del ganado vacuno. Indudablemente, para el control de la tuberculina destinada a aplicarse en esta última especie es preferible recurrir a reses bovinas. El mejor método, sin duda, es utilizar animales positivamente enfermos, que vayan a sacrificarse, puesto que existe aquí la oportunidad de comprobar las lesiones en la necropsia. Se aplican tres diluciones de la

tuberculina tipo y otras tantas de la problema, en cada una de las tablas del cuello, respectivamente. Empleando suficiente número de animales pueden compararse los resultados, obteniendo una idea del grado de concentración que conviene disponer para el empleo de la tuberculina problema en el campo. Puede hacerse también en un solo animal, con series de diluciones de las respectivas tuberculinas, tipo y problema.

En lo que respecta a las PPD, conviene también realizar este control biológico, pero en ellas puede ser suficiente el gravimétrico, disponiendo una concentración adecuada por ml. Por ejemplo, tal como se aplica en Inglaterra, la PPD obtenida de tipos tuberculosos de mamífero contiene 2 mg./miligramos y la de tipo aviar 0,5 mg./ml.

La unidad internacional se ha fijado en 0,028 gr. de PPD. El Código Veterinario británico (1955) fija la unidad de PPD-S en 0,00002 mg. y admite que la unidad de OT está contenida en 0,00001 ml. de tuberculina vieja tipo.

II. En el ganado vacuno, de modo habitual se recomienda la prueba intradérmica, que descubrieron MANTOUX y MOUSU. Esta ha sido la conclusión aprobada en el II Symposium sobre erradicación de la tuberculosis bovina, celebrado en 1960 bajo los auspicios de la F. A. O., la O. I. E. y la O. M. S. En cuanto al lugar inoculado varía según los países. En Estados Unidos, en algunos departamentos de Francia y en otros países, se aplica en el pliegue caudal. En la mayoría, en cambio, se prefiere la piel de la zona de la espalda, por delante o por detrás de la espina acromion o, mejor todavía, la piel del cuello. Mediante estudios comparativos, ha podido determinarse que la piel del cuello es mucho más sensible que el pliegue caudal. Como no todas las zonas cutáneas del cuello tienen la misma sensibilidad, se recomienda practicar la reacción eligiendo siempre una zona fija, de sensibilidad media. En general, la zona de máxima sensibilidad se encuentra a lo largo de la línea imaginaria que une la punta del esternón con el ángulo maxilar, siendo máxima a medida que se aproxima a la cabeza y disminuyendo al acercarse al esternón y la espalda. Igualmente es mayor en las zonas bajas del cuello, siendo menor hacia el borde superior del mismo. Por ello, se recomienda que la prueba intracutánea se realice en el tercio medio del cuello, aproximadamente en el centro del mismo.

La aplicación en la piel de detrás de la espalda, que recomienda en Suiza ANDRES (1954) y en España nuestro compañero CUEZVA SAMANIEGO (1956), tiene la ventaja de que permite realizarla a un solo operador, en el propio establo y sin ne-

cesidad de soltar al animal, pero no se realiza de modo general en el mundo.

El volumen inoculado varía con la concentración de la tuberculina entre 0,1 y 0,2 c. c. Con PPD y con tuberculina «S» en la aplicación en el cuello se emplean 0,1 c. c. En la tuberculinización en el pliegue caudal, con tuberculina «S», se utilizan 0,05 c. c. Esto quiere decir que utilizando la PPD a la concentración empleada en Inglaterra, como ya dijimos (2 mg./ml.), la dosis de 0,1 c. c. contiene 0,2 mg. de PPD, lo que equivale a 10.000 unidades. En Holanda la PPD contiene 1,5 mg/ml., con lo que 0,1 c. c. contiene 7.500 unidades. Más adelante veremos la importancia que tiene el número de unidades aplicadas, aunque precisemos desde ahora que la escuela alemana estima como óptima la aplicación de 5.000 unidades, lo que equivaldría a decir que la PPD debería contener 1 mg./ml.

Después de esquivar el punto de inoculación y medir el grosor de la piel, se desinfecta ésta con algodón impregnado en alcohol de 50 por 100 y se aplica la dosis tuberculina, utilizando aguja de hisel corto, de 0,6-0,7 mm. de grosor y 4-5 mm. de longitud. Cuando se tuberculinizan series de animales, por ejemplo, en un establo, entre cada aplicación conviene limpiar la aguja con la torunda de algodón (limpio) humedecido en alcohol de 50 por 100. Cuando la técnica se ha seguido correctamente, en el punto de inoculación aparece una pequeña prominencia, bien circunscrita, como una lenteja. Si no se tiene seguridad de que se ha realizado bien, aplicar la tuberculina en el otro lado del cuello.

La reacción tuberculínica típica va acompañada de un aumento de grosor de la piel, con edema, dolor, reacción ganglionar local, aparición de un exudado con tendencia hemorrágica, etc. En estos casos el dictamen no ofrece dudas, pero no siempre aparecen todos los caracteres reunidos y en ello radican las dificultades, que se manifiestan en la disparidad de módulos interpretativos. Veamos algunos ejemplos. En Inglaterra (RITCHIE, 1959) además del grosor de la piel se presta gran atención a la aparición de edema, que se califica en cuatro grados: ligero, difuso, extenso y circunscrito. Combinando este dato con el grosor cutáneo, se sigue esta norma:

Reacción local	Calificación
> 1 mm. ....	—
> 2 mm. ....	—
> 3 mm. ....	dudosa
> 4 mm. ....	+
> 2 mm. y edema ligero ...	+
> 3 mm. y edema ligero ...	+

SAURAT y LAUTIE (1955) consideran positiva la reacción con carácter inflamatorio evidente: tumefacción, dolor, con tendencia a extender a una zona de más de 4 cm. de diámetro, con calor o no, necrosis local o infiltración hemorrágica y reacción local. Negativa, cuando el espesor de la piel es 2 mm. superior a la lectura inicial, o menos, y no hay signos inflamatorios perceptibles. Y dudosa cuando el grosor oscila entre 2-4 mm. más que en la lectura previa, en ausencia de signos inflamatorios.

CUEZVA SAMANIEGO (1956) califica como negativos los incrementos del espesor de la piel de 0-1,5 mm., sin dolor. De 1,6-3,0 mm., sin dolor, o con muy ligera hipersensibilidad local, dudosa. Este mismo aumento del espesor cutáneo, con dolor claro, como positivo. Más de 3 mm. de aumento, con dolor o sin él, siempre como positivos.

MESSERLI (1954) es más comedido, considerando dudosos todos los casos que muestran un grosor superior al inicial, que no llegue a 4 mm. e incluso incrementos de 4-8 mm. en ausencia de marcados signos inflamatorios también los considera dudosos.

En resumen, si exceptuamos a algunos autores (NASSAL, 1960) que conceden el máximo de importancia a la estimación del aumento de grosor, por considerar que los demás datos son muy subjetivos, en la mayor parte de los casos la interpretación de la reacción debe realizarse valorando conjuntamente todos los datos mencionados anteriormente. De todos modos, en apoyo de la opinión de NASSAL, puede citarse la experiencia de JOHNSON y col. (1961), según la cual el 92,4 por 100 de los bovinos tuberculosos proporcionan incrementos cutáneos de 3 ó más mm. y, por el contrario, en el 97,1 por 100 de los individuos no tuberculosos son inferiores a 3 mm.

Con el fin de hacer más evidente la respuesta tuberculínica local, se han propuesto diversos sistemas de reacciones intradérmicas dobles. Los fundamentos biológicos son correctos, ya que se basan en que una primera dosis contribuye a incrementar la sensibilidad local, que la segunda aplicación pone claramente de manifiesto. En otro sentido, también es razonable la idea de valorar el incremento del grosor de la piel, no en absoluto, sino en relación con el que inicialmente presentaba la piel. Es decir, no parece lógico considerar como igualmente positivo un incremento de 4 mm. para un animal que en la lectura que precedió a la aplicación de la tuberculina tenía una piel de 20 mm. de grosor, y esos mismos 4 mm. de aumento, para otro cuya piel tenía solamente 8 milímetros de espesor, pongamos por ejemplo. En

Inglaterra esta prueba fue oficial hasta 1940 y todavía se practica en algunos países centroeuropeos. Nosotros también la hemos realizado durante bastantes años y estamos satisfechos de sus resultados. Se aplica 0,1 ml. y a las 72 horas otra nueva dosis. El incremento del grosor de la piel debe ser entonces doble del inicial, para considerar positivo el resultado.

Una variante de este sistema, utilizada en Irlanda del Norte, es la prueba Stormont, como allí se llama. Consiste en aplicar 0,1 c. c. de tuberculina. A los 7 días se mide el grosor de la piel y se aplica una segunda dosis en el mismo punto. A las 24 horas se lee la reacción, estimándose como positivos los aumentos de 5 mm., dudosos de 3 hasta 5 y negativos de menos de 3 mm.

En los momentos presentes, en todo el mundo se emplea la prueba intradérmica simple, en alguna de sus diversas variantes, pero fundamentalmente la aplicación en el dermis del cuello. En vista de la complejidad de factores implicados, que hacen posible una gran variación en los resultados obtenidos, debe recomendarse el máximo cuidado en su realización e interpretación. La experiencia, como en todo, es muy valiosa para la diferenciación de algunos casos poco claros.

Para juzgar el valor de la reacción tuberculínica podrían citarse datos estadísticos que demuestran una eficacia que sobrepasa el 90 por 100, considerándose las reacciones sobre bases individuales. Pero el máximo valor de la tuberculina corresponde a aquellos casos en que se dictamina sobre el estado de rebaños de ganado vacuno. En estos casos, de ordinario la eficacia del método se aproxima al 100 por 100. Puede aducirse también como testimonio de la exactitud de este método diagnóstico, que eliminando los animales considerados como positivos en la prueba, ha podido llegarse en los Estados Unidos, de un porcentaje de reaccionantes del 5 por 100, hasta cifras que actualmente oscilan en torno al 0,11 por 100.

III. Pero la prueba no es infalible. Algunos animales tuberculosos no reaccionan a la inyección de tuberculina. Otros animales no tuberculosos pueden dar reacciones «positivas». Veamos estos casos.

Aproximadamente en el 1-2 por 100 de los casos de tuberculosis, es posible comprobar la ausencia de reacción a la tuberculina. Estos estados «anérgicos» no reaccionales se aprecian algunas veces en individuos con tuberculosis progresiva, en los que existen signos clínicos evidentes y con pruebas bacteriológicas positivas. Pero otras veces pueden hallarse reses anérgicas, que sufren tuberculosis mamaria (en este caso hay reaccio-

nes positivas en terneros de menos de 6 meses), o ganglionar localizada, que permanece inactiva durante largos períodos, permitiendo incluso buenas producciones en el animal, que se mantiene en favorable estado de carnes. SCHOOP (1952) califica estos estados a-reaccionales, que se observan en sujetos viejos que han llegado a un estado de equilibrio bacilo tuberculoso-organismo, como «anergias de inmunidad», en oposición a las anergias por falta de defensas. Algunos de los resultados dudosos pueden explicarse como «hipoergias». A veces se trata de infecciones recientes. Hasta 30 días post-infección, por término medio, no hay respuesta alérgica.

En cuanto a los animales reaccionantes, en los que la necropsia no descubre lesiones o se comprueba que no padecían una infección tuberculosa, son muchos los casos a considerar y el problema tiene una importancia capital para el desarrollo de una campaña de saneamiento. Cuando se inicia ésta, la correspondencia entre la reacción positiva y el hallazgo de lesiones es estrecha y el ganadero y el técnico son tolerantes respecto a que individuos procedentes de efectivos infectados den reacciones positivas, aunque en alguno de ellos no se comprueben lesiones macroscópicas. Pero a medida que progresa el saneamiento y las oportunidades de contagios van disminuyendo, el número de reaccionantes «sin» lesiones sube paralelamente, creando crisis de confianza entre los propietarios y entre los mismos veterinarios. En el pasado año, el 73 por 100 de los reaccionantes bovinos hallados en los Estados Unidos estaba libre de lesiones macroscópicas. Esto, que no es nuevo, adquiere cada día mayor importancia. ¿Qué explicaciones tiene este fenómeno?

Aclaremos, inicialmente, que «no apreciarse lesiones» no equivale a «no existir lesiones». La falta de lesiones macroscópicas no significa la ausencia de infección tuberculosa. La reacción tuberculínica positiva y específica no indica ni la situación ni el grado de las lesiones, sino, simplemente, la existencia de un estado alérgico. La lesión tuberculosa inicialmente es microscópica, por lo que la determinación de su emplazamiento requiere una investigación histopatológica. En el hombre, incluso se admite la existencia de infecciones criptógenas, en las cuales las bacterias y el organismo llegan a un equilibrio, sin formación de lesiones, aunque sí haya sensibilización. Para HÜBSCHMANN y DOMAGK ésta es la fase primera de la tuberculosis en el hombre. En Veterinaria, PALLASKE (1961) considera que el estado alérgico corresponde siempre a una lesión, posiblemente microscópica y limitada a pequeños acúmulos de

células epitelioides y gigantes, difícil de hallar, pero que un examen sistemático puede poner de manifiesto, por ejemplo, en los ganglios mesentéricos y en la pared intestinal, si el complejo primario radica en esta zona. Esta situación puede prolongarse algún tiempo, por un estado de equilibrio entre los elementos defensivos y el germen, pero histopatológicamente no cabe hablar de «falta» de lesiones. Podría llamarse este estado de «latencia macroscópica», dice este autor.

Lo que sucede, cuando se comienza la campaña, es que abundan los bovinos tuberculosos en diversos estados de evolución y es fácil hallar enfermos crónicos, cuyas lesiones son evidentes. Cuando, al cabo de un año, por ejemplo, vuelve a tuberculinizarse el hato, es más fácil hallar algunos individuos cuyas lesiones son mínimas, e incluso microscópicas. Aun en estas ocasiones, un examen anatomopatológico cuidadoso llega a descubrir lesiones hasta en el 50 por 100 de los casos. Pero si se recurre al análisis histopatológico, es mucho más elevado el número de reses con lesiones que se descubren. De todos modos, es bien fácil comprender que una lesión tuberculosa mínima puede estar localizada en cualquier parte del cuerpo y que es prácticamente injustificado e impracticable tratar de realizar un estudio histopatológico de TODO el organismo. Pese a ello, la histopatología tiene un valor considerable porque permite la diferenciación de las lesiones tuberculosas de otras simplemente tuberculoides. Un 46 por 100 de las lesiones consideradas como tuberculosas en los mataderos norteamericanos, sobre bases macroscópicas, se ha comprobado que se deben a otras causas: actinobacilosis, tumores, granulomas parasitarios, etc.

Otro grupo importante es el formado por animales no enfermos de tuberculosis por el tipo bovino, que, sin embargo, dan resultados positivos a la tuberculinización. Las causas e interpretaciones de estas reacciones son muy complejas y los términos aplicados para describirlas excesivos y confusos muchas veces. Creemos que se involucran dos aspectos de la cuestión: la reacción en sí y sus causas. Si tenemos en cuenta este criterio, los resultados podrán ser, en el primer caso, «positivo», «dudoso» o «negativo» y, en el segundo, «específico» o «inespecífico», según que la sensibilización provenga del bacilo tuberculoso o de otro agente diferente.

Para MANNINGER son específicas todas las respuestas alérgicas ante antígenos microbacterianos comunes, es decir, son específicas las sensibilizaciones observadas en un bovino infectado por bacilo tuberculoso, ante la aplicación de tu-

berculina de tipo humano, bovino o de otra clase. En sentido inmunológico esto es cierto, pero en cuanto a las repercusiones sanitarias del problema, las cosas cambian. Por ello NASSAL (1960) aconseja distinguir con sentido restrictivo la especificidad de la reacción. Para él es «específica» la reacción de una res tuberculosa por el tipo bovino, ante la aplicación de tuberculina bovina. Las reacciones alérgicas debidas a la sensibilización por otras micobacterias de tipos mamíferos, las califica de «para-alérgicas». Y las provocadas por otras causas, tales como estados hormonales particulares, infecciones no tuberculosas, etc., son en su concepto «inespecíficas». Las «seudoalérgicas» son las provocadas por la irritación del punto de inoculación u otras causas mecánicas.

Las respuestas «para-alérgicas» son perfectamente explicables teniendo en cuenta que diversas micobacterias contienen antígenos comunes a los bacilos tuberculosos. En consecuencia, se trata de reacciones de grupo, comparables a las aglutinaciones que se aprecian en muchas especies bacterianas de un mismo género, por ejemplo, *Salmonella*, *Brucella*. spp., etc. Como ocurre con la presencia o ausencia de lesiones macroscópicas, al iniciarse el saneamiento, el número de reaccionantes para-alérgicos es pequeño en comparación con los específicamente infectados. Pero a medida que progresa la eliminación de los bovinos la situación se invierte. Por ejemplo, en Norteamérica, antes de comenzar la lucha contra la tuberculosis bovina, eran relativamente frecuentes las infecciones humanas por bacilos de tipo bovino, especialmente en niños (zooantroponosis). En la actualidad ocurre precisamente lo contrario; es decir, es más corriente hallar bovinos infectados por bacilos de tipo humano (antropozoonosis). Por ello, entre los reaccionantes para-alérgicos muchos individuos se encuentran infectados por el bacilo de tipo humano. Aproximadamente un 20 por 100 de los bovinos tuberculosos por la variedad humana reaccionan de modo similar ante la tuberculina elaborada con cualquiera de los dos tipos (humano o bovino), pero generalmente reaccionan mayor número con la tuberculina humana. Por fortuna, este tipo de infección tuberculosa no tiende a difundirse y la alergia que provoca llega a desaparecer al cabo de algunas semanas.

La infección por el bacilo de tipo aviar es rara en el ganado vacuno, y un 30 por 100 de los individuos afectados puede llegar a reaccionar con intensidad a la tuberculina bovina.

Respecto a la paratuberculosis, un 30 por 100 de las vacas afectadas reacciona a la tuberculina

bovina. Teniendo en cuenta que esta enfermedad tiene una larga fase de latencia, resulta fácil llegar a comprender que puede ser origen de reacciones alérgicas «sin» lesiones.

A este mismo grupo de reacciones pertenece la observada en bovinos afectados de la llamada «tuberculosis bovina cutánea» o «sin lesión», proceso de dudosa etiología, en cuyas lesiones nodulares anatómicas e histopatológicamente equiparables a las específicamente tuberculosas, se encuentran bacterias ácido-resistentes no cultivables hasta ahora y que experimentalmente inoculadas no producen ninguna afección en los animales de laboratorio.

Todavía completan el grupo las infecciones por otras especies de micobacterias. En la obra de BERGEY (1957) aparecen seriadas 14 especies en el género *Mycobacterium*, entre las cuales *M. smegmatis*, *M. fortuitum* y *M. phlei* se sabe que son capaces de llegar al organismo con alimentos y bebidas, o a la mama, permaneciendo en estos órganos, o en los linfáticos, sin producir enfermedad propiamente hablando, pero sí sensibilización alérgica. A ellos vienen a sumarse las llamadas «micobacterias anónimas», que JOHNSON y colaboradores (1961) dividen en 4 grupos:

1. Bacilos fotocromógenos, cultivables a 37° C, con ritmo de crecimiento más activo que el de los bacilos tuberculosos, y también a 20-25° C. Su actividad catalásica es grande y pueden cultivarse en medios corrientes, simples.

Serológica, alérgica y patogénicamente tienen relación estrecha con los bacilos de tipo humano. La agar-precipitación demuestra la comunidad de algunos de sus antígenos, y en cuanto al poder patógeno, se ha hallado en el hombre, produciendo lesiones tuberculiformes. Experimentalmente son patógenos para el ratón y el cobayo, en ciertas condiciones.

2. Bacilos escotocromógenos (skotos = oscuridad), de crecimiento lento a 37° (más lento que el de los bacilos tuberculosos), también cultivables en medios simples, incluso a 20-25° C., y provistos de catalasas activas. Unas cepas tienen semejanza con los bacilos humanos y otras con los bovinos. Raramente producen lesiones en cobayos y ratones, y hasta ahora, cuando se han aislado del hombre, siempre ha sido en infecciones mixtas con bacilos tuberculosos, asociados a éstos.

3. Bacilos no fotocromógenos, o bacilos de Battey, así llamados por haberse estudiado en el hospital de este nombre en Roma, Georgia, U. S. A. Son parecidos a los bacilos de tipo aviar, diferenciándose en que éstos no crecen a la temperatura ambiente y aquéllos sí. Hay cepas relacionadas

con los bacilos humanos y otras con los bovinos. Administrados por vía oral al cobayo, algunas cepas llegan a sensibilizarlo intensamente frente a la tuberculina humana. Son patógenos para ratones y cricetos, pero para los cobayos sólo de modo inconstante. Algunas cepas afectan al hombre, mientras que otras pueden aislarse de personas normales.

4. Grupo de micobacterias de «crecimiento rápido» («fast growers»), afines a *M. fortuitum*. Algunas cepas sensibilizan al conejo frente a la tuberculina aviar y bovina, pero no frente a la humana. Se han encontrado en diverso material humano.

Es decir, el bacilo bovino tiene cierta comunidad antigénica con algunas cepas de bacilos escotocromógenos, no fotocromógenos y de rápido crecimiento. Experimentalmente se demuestra que las PPD preparadas utilizando estas cepas, e incluso *Nocardia* spp., puede proporcionar respuestas positivas en bovinos infectados con BCG o bacilo tuberculoso humano; la agar-difusión demuestra también que existen antígenos semejantes.

Concluyendo, las reacciones para-alérgicas son el fruto de la existencia de algunos antígenos comunes entre las diversas micobacterias, que difieren cuantitativamente a este respecto. Los antígenos que poseen los bacilos tuberculosos y los gérmenes afines pueden ser específicos del género, específicos de especie, específicos de ciertas variedades e incluso de algunas cepas. Los responsables de las reacciones alérgicas cruzadas pueden clasificarse en el primer grupo, en su mayoría.

¿Qué posibilidades existen de diferenciar las reacciones para-alérgicas, inespecíficas, pseudo-alérgicas y dudosas de las específicas?

En primer lugar, son importantes los métodos bacteriológicos clásicos. De los serológicos, la fijación del complemento es la más interesante, pero también proporciona resultados de grupo y, por ahora, no permite la diferenciación con la para-tuberculosis, aunque están en buen camino los trabajos para conseguir un antígeno más específico para esta enfermedad. Pero nos referiremos solamente a las técnicas basadas en la propia prueba tuberculínica.

*Inoculación subcutánea o intravenosa.*—Muchos animales que reaccionan de modo dudoso pueden dar resultados más claros si reciben tuberculina por vía subcutánea o intravenosa. Para la primera se aplican 3-5 c. c. de PPD bovina al 20 por 100 y para la segunda 4-6 c. c. de PPD original, también bovina. Ambas son pruebas térmicas.

En la prueba subcutánea conviene controlar temperatura, pulso y respiración cada 2 horas, o en-

tre 6-21 horas, o al menos entre 6-8 horas después de la aplicación, para apreciar la reacción general. Son positivas temperaturas de más de 40° o elevaciones de 1,5° C., con 39,5° C., o bien de 1,0-1,4° C., con temperatura de 39,5°, acompañada de reacción general.

Con infección de tipo humano, muchos animales no reaccionan y con el tipo aviar sólo un 30 por 100.

La prueba intravenosa produce una reacción febril que se inicia a las 3-4 horas y alcanza el máximo hacia las 6, volviendo a la normalidad a las 12. Los sanos no tienen elevaciones de temperatura superiores a 0,7° C. Los positivos (infección de tipo bovino) entre 1,0-2,3° C. Las infecciones aviares no reaccionan significativamente (menos de 1° C. de elevación térmica). Y los infectados con bacilo humano de 1,3-2,1 algunas veces, pero no siempre (generalmente sólo en torno al 25 por 100 de los casos).

KUTLESA y MARIC (1961) estiman que puede interpretarse así la prueba:

Si no hay fiebre ni otros signos clínicos, puede excluirse la presencia de tuberculosis producida por el tipo bovino, pero no la originada por otros tipos. Si la mayor parte, o la totalidad de los reaccionantes a la prueba intracutánea, responden con fiebre y signos generales, el dictamen es que la explotación está infectada por el tipo bovino. Si entre los reaccionantes a la prueba intracutánea hay un número relativamente alto que reacciona también a la prueba intravenosa, aunque otras investigaciones y circunstancias indiquen más la posibilidad de infección por el tipo humano, deben separarse todos los reaccionantes, para examinarlos 3 meses más tarde. Si el número de reaccionantes a la prueba es bajo, dentro de los positivos a la prueba intracutánea, puede existir una infección por otras micobacterias, pero es posible también la infección mixta, por lo cual conviene

separar estos animales para repetir la prueba más tarde.

Estas dos reacciones resultan onerosas por el trabajo que proporcionan, por lo que solamente pueden entrar en consideración en explotaciones pequeñas y de ningún modo son factibles en una campaña de envergadura, más que en fases avanzadas, cuando los reaccionantes disminuyen y conviene diferenciar mejor entre las reacciones inespecíficas o de otro orden.

#### *Empleo simultáneo de tuberculina de tipos de mamíferos y tuberculina aviar*

Dado que muchas reacciones inespecíficas y dudosas ante la tuberculina del tipo mamífero, son producidas por sensibilizaciones ante el tipo aviar, bacilo paratuberculoso y otras micobacterias que tienen relación antigénica con el *M. tuberculosis* tipo aviar, la aplicación de tuberculina preparada con este bacilo, al tiempo que se pone la tuberculina de mamífero, puede ayudar a diferenciar estas reacciones.

Generalmente, en una primera parte, la campaña utiliza solamente tuberculina humana o bovina, según los países, mientras que al repetir la tuberculinización de los efectivos en años sucesivos se ponen simultáneamente ambas, o se aplica en los casos dudosos la aviar. Sin embargo, ciertas naciones, como Inglaterra y Portugal, realizan la prueba simultánea desde el comienzo, lo cual, si bien proporciona mayor trabajo, tiene la ventaja de aclarar dudas desde el principio. Las dos inyecciones se ponen en el tercio medio del cuello, separadas una de otra unos 12 cm. y en posición vertical. La inyección superior se destina a la tuberculina aviar y la inferior a la de mamífero. La PPD aviar tiene 0,5 mg./ml. de concentración.

La interpretación de los resultados, según las normas inglesas (RITCHIE, 1959), es la siguiente:

Reacción	D I C T A M E N	
	Infección inespecífica demostrada	Infección inespecífica no demostrada
A+. M	conservar	—
A dudosa. M—	id.	conservar
A+. M+	id.	nueva prueba
A mayor que M	id.	nueva prueba
A+. M+		nueva prueba
A+. M dudosa		nueva prueba
A dudosa. M dudosa		nueva prueba
A dudosa. M+	nueva prueba	nueva prueba
A—. M dudosa	nueva prueba	eliminar
A—. M+	nueva prueba	eliminar
M no superior en 6 mm. a A	nueva prueba	eliminar

A+.  
A d  
M 5  
A+  
A d  
A—  
M r

M=tub

En ge  
ma otr  
(1962)  
con rea

(\*)  
las tube  
de gros  
9,0 na t  
+4 mm  
especifi  
después  
de gros  
para-ale  
tubercu

Rep  
chos c  
de la t  
sibiliza  
largo  
provoc  
en el c  
tímetr  
lizado

Tub  
Es fa  
haust  
borad  
aunqu  
no es  
espera  
de ma  
tuberc  
partir  
San

tre 6-21 horas, o al menos entre 6-8 horas después de la aplicación, para apreciar la reacción general. Son positivas temperaturas de más de 40° o elevaciones de 1,5° C., con 39,5° C., o bien de 1,0-1,4° C., con temperatura de 39,5°, acompañada de reacción general.

Con infección de tipo humano, muchos animales no reaccionan y con el tipo aviar sólo un 30 por 100.

La prueba intravenosa produce una reacción febril que se inicia a las 3-4 horas y alcanza el máximo hacia las 6, volviendo a la normalidad a las 12. Los sanos no tienen elevaciones de temperatura superiores a 0,7° C. Los positivos (infección de tipo bovino) entre 1,0-2,3° C. Las infecciones aviarias no reaccionan significativamente (menos de 1° C. de elevación térmica). Y los infectados con bacilo humano de 1,3-2,1 algunas veces, pero no siempre (generalmente sólo en torno al 25 por 100 de los casos).

KUTLESA y MARIC (1961) estiman que puede interpretarse así la prueba:

Si no hay fiebre ni otros signos clínicos, puede excluirse la presencia de tuberculosis producida por el tipo bovino, pero no la originada por otros tipos. Si la mayor parte, o la totalidad de los reaccionantes a la prueba intracutánea, responden con fiebre y signos generales, el dictamen es que la explotación está infectada por el tipo bovino. Si entre los reaccionantes a la prueba intracutánea hay un número relativamente alto que reacciona también a la prueba intravenosa, aunque otras investigaciones y circunstancias indiquen más la posibilidad de infección por el tipo humano, deben separarse todos los reaccionantes, para examinarlos 3 meses más tarde. Si el número de reaccionantes a la prueba es bajo, dentro de los positivos a la prueba intracutánea, puede existir una infección por otras micobacterias, pero es posible también la infección mixta, por lo cual conviene

separar estos animales para repetir la prueba más tarde.

Estas dos reacciones resultan onerosas por el trabajo que proporcionan, por lo que solamente pueden entrar en consideración en explotaciones pequeñas y de ningún modo son factibles en una campaña de envergadura, más que en fases avanzadas, cuando los reaccionantes disminuyen y conviene diferenciar mejor entre las reacciones inespecíficas o de otro orden.

#### *Empleo simultáneo de tuberculina de tipos de mamíferos y tuberculina aviar*

Dado que muchas reacciones inespecíficas y dudosas ante la tuberculina del tipo mamífero, son producidas por sensibilizaciones ante el tipo aviar, bacilo paratuberculoso y otras micobacterias que tienen relación antigénica con el *M. tuberculosis* tipo aviar, la aplicación de tuberculina preparada con este bacilo, al tiempo que se pone la tuberculina de mamífero, puede ayudar a diferenciar estas reacciones.

Generalmente, en una primera parte, la campaña utiliza solamente tuberculina humana o bovina, según los países, mientras que al repetir la tuberculinización de los efectivos en años sucesivos se ponen simultáneamente ambas, o se aplica en los casos dudosos la aviar. Sin embargo, ciertas naciones, como Inglaterra y Portugal, realizan la prueba simultánea desde el comienzo, lo cual, si bien proporciona mayor trabajo, tiene la ventaja de aclarar dudas desde el principio. Las dos inyecciones se ponen en el tercio medio del cuello, separadas una de otra unos 12 cm. y en posición vertical. La inyección superior se destina a la tuberculina aviar y la inferior a la de mamífera. La PPD aviar tiene 0,5 mg./ml. de concentración.

La interpretación de los resultados, según las normas inglesas (RITCHIE, 1959), es la siguiente:

Reacción	DICTAMEN	
	Infección inespecífica demostrada	Infección inespecífica no demostrada
A+. M ... ..	conservar	—
A dudosa. M— ... ..	id.	conservar
A+. M+ ... ..	id.	nueva prueba
A mayor que M ... ..		nueva prueba
A+. M+ ... ..	id.	nueva prueba
A+. M dudosa ... ..		nueva prueba
A dudosa. M dudosa ... ..		nueva prueba
A dudosa. M+ ... ..		nueva prueba
M con grosor que no excede en 4 mm. a A ... ..	nueva prueba	nueva prueba
A—. M dudosa ... ..	nueva prueba	eliminar
A—. M+ ... ..	nueva prueba	eliminar
M no superior en 6 mm. a A ... ..	nueva prueba	eliminar

Reacción	D I C T A M E N	
	Infección inespecífica demostrada	Infección inespecífica no demostrada
A+. M+ ... ..	nueva prueba	eliminar
A dudosa. M+ ... ..		
M 5-6 mm. mayor que A ... ..		
A+. M+ ... ..	eliminar	eliminar
A dudosa. M+ ... ..		
A-. M+ ... ..		
M más de 6 mm. superior a A ... ..		

M=tuberculina de tipo mamífero. A=tuberculina aviar.

En general, también concuerdan con este esquema otros criterios. FREERKSEN y LAUTERBACH (1962) creen que deben conservarse los efectivos con reacciones dudosas, si en ellos ya se había

conseguido la erradicación de la tuberculosis bovina anteriormente. NASSAL (1960) propone este cuadro para la diferenciación:

Tuberculina	Diferencia en mm. (+)	Tuberculosis bovina	Reacciones para-alérgicas
M y A (+)	+3,0 mm., o más	+	—
	+1,6—2,9 mm.	?	?
	+0,1—1,5 mm.	—	+
A y M (—)	0,0	—	+
	—0,1 mm. o más	—	+

(\*) Debe entenderse que esta columna significa la diferencia existente entre los incrementos respectivos de las tuberculinizaciones intracutáneas con la tuberculina mamífera y aviar. Así, por ejemplo, un animal con 8 mm. de grosor inicial de piel, que en el punto de aplicación de la tuberculina mamífera tiene 13,0 y en el de la aviar 9,0 na tenido un incremento de grosor, respectivamente, de 5 y 1,0 mm. La diferencia entre estas cantidades es +4 mm., o sea, que reúne la condición prevista en la primera línea, por lo que consideraríamos que la reacción era específica para la tuberculosis bovina (+). Si ese mismo animal hubiera tenido un grosor de piel de 10,0 mm. después de la tuberculinización, en los puntos de aplicación de la tuberculina de mamífero y aviar, el incremento de grosor en ambos puntos sería de +2 mm. y la diferencia (+2—2=0) indicaría (línea cuarta) que la reacción era para-alérgica. Indudablemente, a medida que es más intensa la reacción ante la tuberculina aviar y menor la de la tuberculina de mamífero, las diferencias tienen signo negativo.

*Repetición de la prueba.*—La resolución de muchos casos dudosos la consigue esta reiteración de la tuberculinización a las 6-8 semanas. La sensibilización al bacilo tuberculoso bovino persiste largo tiempo, mientras que puede desaparecer la provocada por el tipo humano. Conviene realizarla en el otro lado del cuello o, por lo menos, a 10 centímetros de distancia del punto inicialmente utilizado.

*Tuberculinización con tuberculinas especiales.*—Es factible, en un intento de diferenciación exhaustivo, el empleo comparado de otros PPD elaborados con cepas de micobacterias diversas, aunque en la práctica el trabajo que proporcionan no está en relación con los resultados que cabe esperar. Algunos autores han llegado a proponer de modo habitual la prueba simultánea triple con tuberculina mamífera, aviar y PPD obtenido a partir de *M. rabinowitsch*, cultivado en medio de SAUTON.

*Tuberculina diluida.*—El ganado vacuno tiene una sensibilidad muy inferior al hombre para la prueba tuberculínica intradérmica, por lo que ordinariamente se emplean dosis hasta 1.000 veces superiores a las humanas. Estas dosis altas tienen el inconveniente de que muchas veces dan resultados positivos con infecciones para-alérgicas, puesto que en la respuesta alérgica juega un importante papel el factor cuantitativo. La dosis óptima para la mayor parte de los autores es de 5.000 unidades.

Sobre estas premisas se ha experimentado repetidas veces el empleo de cantidades inferiores, que todavía estimulan la reacción alérgica en el individuo, si está específicamente sensibilizado, pero ante las cuales ya no reaccionan los sensibilizados a otras micobacterias distintas del bacilo bovino. Es decir, se sigue un proceder semejante en sus fundamentos a la diferenciación de

las aglutinaciones específicas, mediante la determinación del título límite.

Las dosis más consideradas han sido las de 500 y 250 unidades. BEDERKE (1960) es partidario del empleo de 500 unidades para la diferenciación de los casos sospechosos de inespecificidad. Las 250 unidades son insuficientes, aunque solamente responden a ellas 1/3 a 1/4 de los animales que padecen infecciones inespecíficas, en relación con la aplicación de 5.000 unidades (BUEMANN, 1961), pero como contrapartida tienen el riesgo de que algunos animales tuberculosos no reaccionan.

SEELEMANN y RHEM han recomendado como solución final el empleo de tres inoculaciones, una al lado de otra, separadas suficientemente para evitar interferencias. En una se aplican 5.000 unidades, en otra 500, ambas de tuberculina bovina, y en tercer lugar se pone tuberculina aviar. Aparte del trabajo adicional que esta técnica supone, BEDERKE (1962) estima que la aplicación de tuberculina a la dosis habitual (5.000) y diluida, disminuye considerablemente la seguridad de la reacción. Vistos estos resultados, podemos concluir con FREEKSEN y LAUTERBACH (1962) considerando que es más conveniente el empleo de tuberculina mamífera y aviar simultáneamente, para la diferenciación de las reacciones inespecíficas, aunque en un caso aislado la tuberculina diluida pueda ser adecuada. De cualquier modo que sea, en una campaña de erradicación de tuberculosis, es siempre preferible eliminar algunos animales con reacciones inespecíficas que no dejar en la explotación animales enfermos, que no reaccionan con dosis bajas y hacen infructuosos todos los esfuerzos.

*Métodos bacteriológicos y serológicos.*—Los primeros, encaminados al aislamiento de los agentes responsables de las reacciones inespecíficas o a

la demostración de la existencia de micobacterias en las infecciones con estados anérgicos o hipoérgicos, ofrecen recientemente la novedad de la eficacia del embrión de pollo y los medios hísticos para el aislamiento del bacilo tuberculoso.

Respecto a los segundos, por el momento es la fijación del complemento la reacción más útil.

Como final queremos dedicar unas palabras a la posibilidad de que se produzcan reacciones inespecíficas por otras afecciones. Hemos leído varias veces que se considera la fasciolosis como causa de sensibilización inespecífica. Trabajos realizados en Japón sobre conejos artificialmente infectados, han demostrado que no se sensibilizan (YAMAGUCHI y col., 1955). Si fuera cierto que *F. hepatica* sensibiliza a la tuberculina, en algunas zonas no podría aplicarse la prueba, porque el 100 por 100 de los bovinos están parasitados. No creemos en esta sensibilización.

También se han citado casos en que las reacciones inespecíficas se atribuyeron a hipodermosis, tiña, sarna demodéica, brucelosis, etc. Tenemos para este grupo de infecciones y parasitosis la misma opinión.

Es diferente la influencia que pueden ejercer algunos estados hormonales de la esfera genital. FROMM admite la existencia de reacciones inespecíficas frecuentes en novillas post-partum, y también en el macho. La segunda mitad de la gestación también parece ser un momento crucial en el que de ordinario se producen estados anérgicos, aunque, según otros, pueden darse casos positivos.

En resumen: la prueba tuberculínica es por el momento el método diagnóstico más seguro y rápido aplicable a la eliminación de la infección bovina. Sin embargo, de ningún modo cabe considerarla como perfecta, por lo que será preciso intentar perfeccionarla o sustituirla por otras reacciones más correctas.