

# PRODUCCION Y CONTROL DE TUBERCULINA

Dr. J. R. Bermúdez \*

C. I. Vet. Rubino, M. A. P.

Las tuberculinas son preparados obtenidos por tratamiento térmico de los productos de crecimiento y lisis de cultivos de *Mycobacterium* spp. (*M. tuberculosis*, *bovis*, *avium* y otros) que inoculados en animales sensibilizados por dichos microorganismos producen una reacción alérgica que se clasifica como de hipersensibilidad retardada.

Constituyen el arma más importante en la lucha contra la tuberculosis bovina siendo adoptadas universalmente en programas de control y erradicación.

Las investigaciones que soportan su uso se originan con los trabajos de Koch R., quien en su afán de encontrar un agente terapéutico comprobó que un filtrado de cultivo inculado a un cobayo tuberculoso producía una reacción inflamatoria en el punto de inoculación, procedimiento que luego lo propondrá como método diagnóstico (1890). A partir de entonces se investigó extensamente y se aplicó con gran éxito en el campo.

En U.S.A. su uso en bovinos data de 1892 y en nuestro país de 1897, cuando por iniciativa del Dr. Heguy, Director de Salubridad del Municipio de Montevideo se estableció una ordenanza que prohibió la entrada de vacas tuberculosas a los tambos capitalinos.

## TIPOS DE TUBERCULINA

La tuberculina puede clasificarse teniendo en cuenta el tipo de microorganismo empleado y el método de producción.

1. De acuerdo al tipo de *Mycobacterium* empleado tenemos:

- tuberculina mamífera (*M. tuberculosis* o *M. bovis*)
- tuberculina aviar (*M. avium*)
- tuberculina de otros *Mycobacterium* (*Mycobacterium* atípicos y *M. Johnney*).

2. Según el método de producción:

- tuberculina vieja
- tuberculina sintética
- derivado proteico purificado

## TUBERCULINA VIEJA (Old Tuberculin O. T.)

Empleado por Koch, R. (1890) es obtenida a partir de un cultivo de *Mycobacterium* en caldo glicerina muerto por el calor, filtrado y concentrado por calentamiento a 1/10 de su volumen original. Este concentrado se denomina Tuberculina Bruta que para su uso se diluye de acuerdo a su actividad biológica con respecto al Patrón Internacional.

## TUBERCULINA SINTETICA (Synthetic Old Tuberculin — S.O.T.)

Kuhne (1892-1894) fue el primero en emplear un medio sintético, pero es a partir de la década del treinta que su uso se generaliza.

Los medios sintéticos llevan como única sustancia nitrogenada aminoácidos. De esta forma las proteínas del caldo y la peptona no afectan la reacción tuberculínica como en el caso de la O.T.

El procedimiento que se sigue en su preparación es similar al empleado para la O.T. es decir: el cultivo en medio sintético es muerto por calor, filtrado, concentrado por calentamiento y titulado con respecto al Patrón Internacional de Tuberculina vieja.

\* Médico Veterinario, técnico adjunto "C. Inv. Vet. Miguel C. Rubino" MAP Pando, Uruguay.

Actualmente existe la tendencia de denominar Tuberculina vieja a las dos descritas.  
**DERIVADO PROTEICO PURIFICADO**  
(Purified Protein Derivate — P.P.D.).

El término P.P.D. fue aplicado por Seibert, F. a una fracción proteica de la O.T. y S.O.T. responsable de la actividad biológica de la tuberculina. Dicha fracción no es químicamente pura sino que está constituida por varias proteínas con diferentes actividades.

Hoy se entiende por P.P.D. una fracción proteica obtenida a partir de un cultivo en medio sintético, filtrado, precipitado (por sulfato de amonio o Ac. tricloroacético) y patronizada. Para ello se suspende el precipitado y se solubiliza obteniéndose una solución concentrada de P.P.D., se determina su contenido en nitrógeno (método semi-micro de Kjeldahl o método del biuret modificado) y se diluye a la concentración de 3 mg/ml para el PPD mamífero y 1 mg/ml para el PPD aviar, quedando listo para la prueba biológica.

Si bien hay cierta correlación entre el contenido en nitrógeno y potencia puede haber variaciones y por ello toda serie debe ser estandarizada biológicamente, siendo esta prueba la que determina la dilución final del P.P.D. problema. Se compara el P.P.D. problema con el Patrón Internacional de P.P.D. (mamífero o aviar, según corresponda) en cobayos sensibilizados empleándose 3 diluciones por cada clase de P.P.D. y se efectúa un ensayo de seis puntos paralelos basado en las respuestas cuantitativas (diámetro de la reacción dérmica en el cobayo).

El P.P.D. aviar lleva colorante de Poncau, 2 R. para facilitar su identificación. Las series de tuberculina deben controlarse además en cuanto a esterilidad, toxicidad (prueba en cobayos) y contenido de fenol.

La fecha de vencimiento no debe ser mayor de cinco años para soluciones concentradas o liofilizadas mantenidas a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  y al abrigo de la luz y de 6 meses a 2 años para el producto diluido.

Cualquiera sea el tipo de tuberculina empleado su actividad depende de la tuberculo proteína específica producida durante el crecimiento y lisis de *Mycobacterium* spp.

Las ventajas del P.P.D. frente a la O.T. son las siguientes:

1. No contiene las proteínas del caldo y la peptona presentes en la O.T. ni las proteínas desnaturalizadas por calentamiento de la O.T. y S.O.T. que afectan la especificidad y sensibilidad de la prueba.
2. Es más económico de producir, ya que no hay pérdidas de proteínas por el calentamiento. En la preparación de la O.T. se pierde al calentar la mitad de la tuberculo proteína presente en el medio.
3. Es más fácil de patronizar por existir cierta correlación entre cantidad de nitrógeno y potencia biológica.

Se emplean cepas humanas en la preparación del P.P.D. mamífero por su mayor rendimiento en proteínas, sin embargo existe la tendencia a usar P.P.D. bovino dado que su especificidad es mayor que la del P.P.D. humano.

### PRODUCCION DE TUBERCULINA EN EL PAIS

En el país la tuberculina para uso bovino es producida por el Centro de Investigaciones Veterinarias "Miguel C. Rubino" (500.000 dosis preparadas en medio sintético) y por el Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina (pequeñas partidas de tuberculina vieja). Hasta fines de la década del cincuenta el Instituto de Microbiología de la Facultad de Veterinaria producía tuberculina vieja a partir de cepas "frescas" aisladas de esputos de enfermos tuberculosos no tratados.

La tuberculina actualmente se prepara a partir de las cepas humanas "C", "PN" y "Dt" mantenidas en Lowestein Jensen y repicados a Erlenmeyer de 100 ml con medio sintético de Dorset-Henley con la finalidad de obtener "velos" para semilla.

Los cultivos para producción se hacen en "damajuanas" de 10 litros con 4 litros de medio sintético Dorset-Henley o Souton y se incuban a  $37^\circ\text{C}$  durante 90 días.

El cultivo es muerto por vapor fluyente (3 horas), filtrado, reducido su volumen por calentamiento en baño de agua a  $100^\circ\text{C}$  obteniéndose así la Tuberculina Bruta. La reducción de volumen desde 1974 se hace a 1/3 en lugar de 1/10.

La tuberculina bruta es titulada en cobayos sensibilizados frente a una tuberculina nacional patrón estandarizada en el

Centro Panamericano de Zoonosis. Se emplea el ensayo de los 6 puntos paralelos mencionado anteriormente.

Es de destacar que desde 1974 se cuenta en el país con una tuberculina titulada en unidades internacionales, conteniendo 100.000 U.I./ml. siendo ésta la única forma en que debe expresarse la cantidad a inocular y no en unidades volumétricas (ejem. 0.1) como es costumbre en el país.

La tuberculina bruta se conserva a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  y al abrigo de la luz, se diluye de acuerdo a las necesidades y se le da un vencimiento de 3 meses.

Desde el año 1973, la tuberculina se expende sólo en envases de 2ml. con la finalidad de evitar la contaminación al cargar la jeringa repetidamente, y por ende la alteración del producto.

Las series son controladas en cuanto a toxicidad (2 cobayos de 400 grs. deben so-

brevivir la inoculación de 100.000 U.I. por vía subcutánea) y esterilidad (ausencia de crecimiento en los medios para aerobios y anaerobios).

#### RECOMENDACIONES

1. Producir P.P.D. bovino en cantidad suficiente para poder soportar las futuras etapas de Control y Erradicación. Para lo cual deberá dotarse al Centro de Investigaciones Veterinarias de equipo y reactivos.
2. Si bien el P.P.D. ofrece grandes ventajas frente a las otras tuberculinas, su uso no daría los resultados esperados de no contarse con una estrecha coordinación entre los servicios de campo, de laboratorio e inspección de carne.
3. Uniformizar la producción y contralor de Tuberculina en el país de acuerdo a normas internacionales.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BRAGA, A. SOROS — Vacinas, Alérgenos e Inmunígenos. Tomo III, Empresa Nacional Río de Janeiro, 242 pp. 1942.
2. BRITISH VETERINARY CODEX — 2nd ed. Supplement. The Pharmaceutical Press Lond, 317 pp. 1970.
3. Centro Panamericano de Zoonosis. Tuberculosis. Preparación y estandarización del Derivado Proteico Purificado (P.P.D.) de la Tuberculina. Nota Técnica N° 17, 27 pp. 1972.
4. DE SCHWEINIT, E.A. — Investigation Conducted by Biochemic Laboratories during, 1892. Tuberculin. Report of the Chief of the Bureau of Animal Industry, 106 pp. 1892.
5. DORSET, M. — A Comparison of Koch's old Tuberculin with a New Synthetic Medium Tuberculin J.A.V.M.A. 84: 439-456, 1934.
6. FRANCIS, J. — The Diagnosis of Tuberculosis in cattle with special reference to Bovine P.P.D. Tuberculosis. Aust. Vet. J. 49; 246-251.
7. GREEN, H.H. — Description and preparation of Weybridge Purified Protein Derivate Tuberculins, F.A.O. Agric. Stud N° 25. Adv. Contr. Zoon. 45-54; 1953.
8. JOHNSON, H.W. — History of Tuberculin and Tuberculin tests on their relationship to the Diagnosis of Tuberculin Proc. Tuber. Erradication Conf. Konsor State Univ. A.R.S. 91-20. U.S. Department of Agriculture: 8-13; 1959.
9. LESSLIE, I.W. — The Tuberculin Test and the Laboratory Diagnosis of Tuberculosis Symp. Zool. Soc. Lond. 4; 11-23, 1969.
10. LESSLIE, I.W. y HEBERT, C.N. — The Standardization of Tuberculins by Biological Assay. Conf. Univ. College Ibadon Nigeria, 1962.
11. LESSLIE, I.W. — The specificity and stability of old Tuberculin and Tuberculin P.P.D. Tuberculin Lon. 49; 294-303, 1968.
12. Ministerio de Ganadería y Agricultura. La Dirección de Ganadería actual, Ed. M.G.A. Montevideo, 637 pp. 1951.
13. SEIBERT, F. — History of the development of purified protein derivate tuberculin. Amer. Rev. Tuber. 44; 1-8; 1941.
14. TOPLEY, W.W.C. — Wilson, G.S. y Miles, A. A. Bacteriología e Inmunidad 2ed. 1949. Ed. Salvat Barcelona, 2037 pp. 1949.