

TUBERCULOSIS CAPRINA: ESTUDIO LESIONAL Y SU RELACIÓN CON EL TIPO DE REACCIÓN DIAGNÓSTICA

Caprine tuberculosis: lesional study and its relationship with the type of diagnostic reaction

Grincalaityte Puodziukynaite R, Buendía Marín A, Párraga Ros E

Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparada. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia

Autor para correspondencia: Ramune Grincalaityte, ramune-@hotmail.com

Tipo artículo: Trabajo Fin de Grado

Enviado: 5 agosto 2022

Aceptado: 13 octubre 2022

RESUMEN

En determinadas comunidades autónomas de España, existen programas de control y erradicación frente a la tuberculosis caprina para minimizar las repercusiones económicas y de salud pública. Dichos programas oficiales se fundamentan en un tipo de diagnóstico basado únicamente en inmunidad celular (prueba de intradermotuberculinización y prueba de liberación de IFN- γ), no obstante, existe un tipo de diagnóstico humoral (serología) que podría resultar útil cómo prueba adicional para detección de animales con una respuesta humoral predominante. Todas las pruebas se basan en el proceso inmunopatológico que padece el animal enfermo, por lo que resulta interesante comprender la regulación del proceso a nivel sistémico y local.

En este trabajo se estudiaron 23 cabras de las cuales 10 resultaron positivas tan sólo a pruebas de inmunidad celular y otras 13 únicamente positivas a pruebas de tipo humoral. A partir de la visualización macroscópica de las lesiones, se tomaron muestras para la realización de 3 estudios: uno histopatológico mediante la clasificación microscópica de las lesiones en cerradas y abiertas, otro etiológico mediante la visualización de micobacterias

con la tinción de Ziehl Neelsen y un estudio de los diferentes grupos celulares inmunológicos mediante inmunohistoquímica. El objetivo fue establecer las relaciones existentes entre el tipo de prueba diagnóstica y los distintos parámetros estudiados. Los resultados demostraron la existencia de una asociación significativa entre el diagnóstico de tipo celular, con lesiones de tipo cerrado. Asimismo, la asociación entre un diagnóstico de tipo humoral con lesiones de tipo abiertas (más infectivas), con mayor presencia de linfocitos B y linfocitos T reguladores en el área de lesión. Por tanto, se cumple nuestra hipótesis de que dichas células se hallan en un número más elevado en fases más avanzadas de la enfermedad con procesos de inflamación crónica, lo que influye en el diagnóstico condicionado por el tipo de prueba empleada.

Palabras clave: tuberculosis caprina, linfocitos T, linfocitos B, lesiones

ABSTRACT

Some regions of Spain have control and eradication programs to fight against goat tuberculosis. These official programs are based on a type of diagnosis that relays on cellular immunity (Intra dermal tuberculin test and IFN- γ release assay), however, there is a humoral type of diagnosis (serology) that could be useful as an ancillary test for the detection of animals with a predominant type of humoral response. Those goats are related to a more advanced phase of the disease and they can spread the bacteria in an easier way causing a persistent infection on some farms. Since these tests are based on the immunopathological process suffered by the animal, it is of our interest to understand better the regulation of the immune response at a systemic and local level. In this study, 23 goats were taken, 10 of which were positive only to cellular immunity-biased tests and the other 13 only positive to humoral-biased tests. From the macroscopic visualization of the lesions, samples were taken to perform 3 different studies: the histopathological one where microscopic lesions were classified as closed or opened. For the etiological study, the Ziehl Neelsen stain was carried out, and finally, for the study of the different lymphocyte families separately, immunohistochemical staining was performed. The objective was to find the existing relationships between the type of diagnostic test and the different studied parameters. The results showed that there was indeed a significant association between a cell-type diagnosis, with closed-type lesions, on the other hand, the association between a humoral-type diagnosis with open-type lesions (more infective ability), with a more significant presence of B lymphocytes as well as regulatory T lymphocytes in the lesion, a reason that meets our hypothesis that these cells are found in a higher number in more advanced stages with chronic inflammation processes.

Key words: caprine tuberculosis, T lymphocytes, B lymphocytes, lesion

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa y zoonótica causada por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Matthews, 2016). Se encuentra extendida mundialmente afectando a múltiples hospedadores, entre ellos el ser humano y la mayoría de especies domésticas. Concretamente, en el ganado caprino, es una enfermedad de especial importancia en países con un censo elevado y en vías de desarrollo. En estos últimos, hay una clara repercusión tanto sobre la salud pública, por el aumento de zoonosis, como económica, por pérdidas productivas y

la alta mortalidad de los animales (Bezoz et al., 2012; Pesciaroli et al., 2014). En España, el control de la tuberculosis caprina sólo se realiza a nivel autonómico mediante programas de control, por lo que, al no existir una regulación nacional, se dificulta su proceso de erradicación (Balseiro et al., 2020).

Las pruebas de diagnóstico oficial establecidas y aprobadas en estos programas (Conserjería de Agua Agricultura Ganadería Pesca y Medio Ambiente, 2018) son la intradermo-tuberculinización y la prueba de liberación de IFN- γ , ambas basadas en una reacción de inmunidad celular. Por lo tanto, aquellos animales

con una respuesta inmunitaria de tipo humoral no son detectados por estos métodos (Welsh et al., 2005) y son diagnosticados como falsos negativos. Dada la relevancia de este hecho y las repercusiones sanitarias que ello supone, parece necesario ahondar en el estudio de los tipos de reacción diagnóstica (celular y humoral) y si esto está condicionado por las lesiones microscópicas presentes en el animal, la cantidad de micobacterias y el tipo de poblaciones celulares inmunitarias que modulan dicha respuesta (linfocitos T, linfocitos B o linfocitos T reguladores). Así pues, la hipótesis de este trabajo plantea la posibilidad de que las variaciones a nivel inmunitario que se producen localmente en la lesión, causarán una repercusión a nivel sistémico condicionando el tipo de reacción diagnóstica así como la progresión de la enfermedad. Derivados de esta hipótesis, planteamos los siguientes objetivos:

- Evaluar la relación entre el tipo de reacción diagnóstica (celular o humoral) y el tipo de lesión microscópica (tuberculosis abierta o cerrada).
- Evaluar la relación entre el tipo de reacción diagnóstica (celular o humoral) y la mayor o menor presencia de micobacterias en las lesiones tuberculosas.
- Evaluar el tipo de respuesta inmune local definida por los distintos grupos linfocíticos (Linfocitos T, linfocitos B y linfocitos T reguladores) y su relación entre el tipo de reacción diagnóstica (celular o humoral) y el tipo de lesión microscópica (abierta o cerrada).

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales del estudio

Se estudiaron un total de 23 cabras de raza murciano-granadina donde 10 de las cabras fueron positivas únicamente a las pruebas relacionadas con la inmunidad celular (prueba de intradermorreacción comparada y prueba

de producción específica de IFN- γ) y las otras 13 cabras fueron positivas tan sólo a la prueba relacionada con la inmunidad humoral (prueba serológica tipo ELISA). Una vez identificados y confirmados como animales positivos fueron trasladados al servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia para establecer el diagnóstico *post-mortem* mediante necropsia reglada.

Necropsia y clasificación macroscópica de las lesiones

Los animales se sacrificaron usando una pistola de bala cautiva penetrante, desangrándose a continuación mediante sección de las venas y arterias axilar y subclavia. Durante la necropsia se realizó una inspección macroscópica de todos los órganos del animal, prestando especial atención a los órganos diana de la tuberculosis, como son el pulmón y los nódulos linfáticos mediastínico y traqueo-bronquiales. Las lesiones se clasificaron como complejo primario, si se limitaban a nódulos caseificados de pequeño tamaño y marginales en el portal de entrada (es decir, pulmón y en gran parte de los casos, también en nódulo mediastínico o traqueo-bronquiales), o tuberculosis orgánica crónica, cuando se hallaban múltiples nódulos en pulmón o se encontraba diseminada hacia otros órganos.

Toma de muestras y procesado histológico

Tras la toma de muestras histológicas de todas las lesiones encontradas compatibles con tuberculosis, se fijaron en formol al 10% durante 48 horas. Posteriormente se tallaron y procesaron de manera rutinaria para su inclusión en parafina. Una vez obtenidos los bloques de las muestras se realizaron cortes histológicos de 5 μ m de grosor con un microtomo. De cada uno de los 23 animales en estudio se seleccionó un bloque con la muestra representativa de la lesión y de este bloque se obtuvieron 5 cortes:

- 1 para el estudio morfológico mediante tinción con Hematoxilina-Eosina.
- 1 para el estudio etiológico mediante tinción Ziehl-Neelsen.
- 3 para el estudio de poblaciones linfocíticas en las lesiones por técnica inmunohistoquímica, linfocitos T (CD3+), linfocitos B (CD79+) y linfocitos T reguladores (FOXP3+).

Tinciones histológicas e inmunohistoquímica

Tinción Hematoxilina-Eosina y Ziehl-Neelsen

Para ambas tinciones se realizó el desparafinado de la muestra con sustituto de xilol y la hidratación de las mismas con una secuencia de alcoholes en concentraciones decrecientes (100%, 96% y 70%). A continuación, se tiñeron siguiendo el protocolo específico rutinario de Hematoxilina-Eosina y Ziehl-Neelsen, se deshidrataron con una secuencia de alcoholes en concentraciones crecientes y se eliminaron los restos de parafina con pases sucesivos con sustituto de xilol. Finalmente se realizó el montaje rutinario de la muestra ya teñida.

La tinción Hematoxilina-Eosina se usó para clasificar el tipo de lesión microscópica encontrada en cada muestra:

- Lesiones cerradas: Lesiones granulomatosas y fibrocalcificadas con granulomas ocupando el parénquima sin invadir vías aéreas. Las lesiones tienen un centro de necrosis por caseificación limitado por una barrera celular de macrófagos, células gigantes y más periféricamente, linfocitos.
- Lesiones abiertas: Lesiones cavitarias en las que se identifica material necrótico, procedente de los granulomas que se han roto, ocupando vías aéreas (bronquiolos principalmente).

La tinción de Ziehl-Neelsen se empleó para la observación y cuantificación del agente

etiológico *Mycobacterium*. Se establecieron 3 categorías: ‘Ausencia’, ‘Presencia mínima de micobacterias’ y ‘Multitud de micobacterias’.

Técnica inmunohistoquímica

El principio de esta técnica se basa en el uso de anticuerpos marcados para detección de los antígenos específicos para cada grupo de linfocitos estudiados. El protocolo se inicia desparafinando las muestras y rehidratándolas con alcoholes de forma rutinaria. Para la inhibición de la peroxidasa endógena se utilizó una solución de peróxido de hidrógeno al 1,5% en metanol al 1,5% durante 20 minutos. La recuperación del antígeno se llevó a cabo por calor en una olla a presión sumergiendo las muestras en tampón citrato 0,01 M y pH 6 durante 20 minutos (Dako Target Retrieval Solution, Agilent, Santa Clara CA, USA). Tras lavar las muestras con tampón Tris salino (TBS), se bloqueó el ruido de fondo con suero de caballo. Se incubaron las muestras con el anticuerpo primario específico al 1:50 para cada población linfoide. Se usaron los anticuerpos primarios para la inmunohistoquímica con el marcaje concreto de los tres grupos de linfocitos del estudio:

- Linfocitos T: anticuerpo monoclonal en conejo frente al antígeno CD3 (clon SP7AbCam, Cambridge, Reino Unido), asociado a la membrana celular.
- Linfocitos B: anticuerpo monoclonal en ratón frente a la proteína transmembranal CD79 (clon HM57, Biotechne, Minneapolis, MN, USA).
- Linfocitos T reguladores: anticuerpo policlonal en conejo frente al factor de transcripción FOXP3 (Biotechne, Minneapolis, MN, USA).

Tras lavar, se incubaron durante 30 minutos con el anticuerpo secundario de ratón o conejo (ImmPRESS horse anti-rabbit or anti-mouse IgG polymer kit-peroxidase, Vector Laboratories, Burlingame CA, USA) en cámara húmeda

en estufa 37°C, en función de la especie en la que se haya desarrollado el anticuerpo primario. Se lavó y se reveló con diaminobencidina (Sigma, Madrid, España) durante 5 minutos y hematoxilina como tinción de contraste. Para finalizar se realizó una deshidratación creciente en alcoholes y montaje de las preparaciones.

Análisis y cuantificación

La observación de muestras y la obtención de imágenes se llevaron a cabo con el programa de imagen, ZEN Lite y el microscopio Zeiss Axioskop 40 con cámara incorporada. Se utilizó un objetivo de 63 aumentos y un visor de 10 aumentos. Para dichas imágenes, se buscó en cada muestra las áreas periféricas de la lesión, donde se encuentra la mayor concentración de linfocitos. El procedimiento fue el siguiente.

Linfocitos T

En el caso de linfocitos T, donde el número de linfocitos era muy homogéneo en estas zonas periféricas, se fotografiaron un total de 10 campos por muestra. Se realizó una cuantificación objetiva y automática con apoyo del programa Fiji. Partiendo de las 10 fotografías realizadas por muestra según la máxima cantidad de área inmunomarcada de linfocitos T CD3+, dicho área quedaba registrado por el programa de análisis de imágenes Fiji cedido por el Servicio de Análisis de Imágenes de la Universidad de Murcia. El resultado final de cada muestra se basaría en la media aritmética de las 10 áreas de inmunomarcaje calculadas obteniéndose un porcentaje único. Los resultados de las muestras analizadas se clasificaron en dos grupos para su posterior análisis estadístico: Un primer grupo con muestras con menos del 10% (10%) de área inmunomarcada CD3+ sobre el área total de la imagen.

Linfocitos B

Ante la distribución irregular de esta población, se realizó una cuantificación semicua-

litativa. Se establecieron dos categorías para evaluar el inmunomarcaje:

- “Moderado número de linfocitos B” en las lesiones, cuando se observaban algunas células CD79+ con morfología de linfocitos o células plasmáticas en la zona linfocítica de la lesión y/o presencia de pequeños folículos linfoides constituidos mayoritariamente por células CD79+ en las zonas más periféricas de la lesión.
- “Escaso número de linfocitos B” en las lesiones, cuando únicamente se observaron muy pocas células linfoides CD79+ en la zona linfocítica de la lesión.

Linfocitos T reguladores

El número de células inmunomarcadas fue muy escaso por lo que se realizó una cuantificación semicualitativa. Se clasificaron en dos grupos:

- “Ausencia total de linfocitos FOXP3+ en las lesiones observadas.
- “Presencia” de algunas células linfoides FOXP3+ con su característico inmunomarcaje intranuclear en las zonas linfoides periféricas.

Análisis estadístico

Para establecer resultados concretos referentes a las distintas variables estudiadas, se llevó a cabo un análisis estadístico haciendo uso del programa IBM SPSS Statistics versión 24. Se valoraron los distintos parámetros estudiados, es decir, prueba diagnóstica positiva en cada caso, el tipo de lesiones microscópicas presentes (abiertas o cerradas), presencia del agente etiológico, *Mycobacterium* en las lesiones y evaluación del número de los distintos grupos linfocíticos en las lesiones: linfocitos T, linfocitos B, linfocitos T reguladores. Se construyeron tablas de contingencia para llevar a cabo la asociación entre dos variables de las

anteriormente mencionadas. El grado de asociación se estudió mediante la prueba de *Chi-cuadrado de Pearson*. En el estudio se aceptó un nivel de significancia del 5% (magnitud de error en caso de que exista dependencia entre ambas variables), es decir, un *p-valor* de 0,05. Si el resultado es menor a este número se concluirá que existe relación significativa entre las variables estudiadas.

RESULTADOS

Asociación entre resultado diagnóstico (celular/humoral) y los distintos parámetros estudiados

Las tablas 1-5 muestran los resultados obtenidos al realizar la asociación entre el tipo diagnóstico de inmunidad humoral (ELISA) o inmunidad celular (Intradermotuberculinización e IFN- γ) y las lesiones microscópicas presentes (abiertas o cerradas) así como la presencia de los distintos tipos celulares en la zona de lesión (micobacterias, linfocitos CD3+, Linfocitos CD79+, y finalmente linfocitos FOXP3+) en todos los animales (n=23).

Los datos presentes en la tabla 1 muestran

que existe relación significativa (**0,026** en la prueba de *Chi-cuadrado de Pearson*) entre el tipo de diagnóstico al que resultaron ser positivos los animales y entre las lesiones observadas ($p < 0,05$). La gran mayoría de animales positivos a una prueba de tipo humoral presentaban lesiones abiertas.

En cuanto al análisis entre el tipo de diagnóstico y la observación de micobacterias en la lesión mediante tinción Ziehl-Neelsen (Tabla 2), no hubo relación significativa entre ambas, pues el valor estadístico fue de 0,823 para la prueba de *Chi-cuadrado de Pearson* ($p > 0,05$).

En cuanto al tipo de diagnóstico y la presencia de linfocitos T CD3+ (Tabla 3), las variables no mostraron relación significativa ($p > 0,05$) pues los valores estadísticos fueron de 0,673 para la prueba de *Chi-cuadrado de Pearson*. A pesar de esto, el porcentaje de linfocitos CD3+ fue mayor del 10% en ambos grupos de diagnóstico humoral y celular.

Analizando los datos sobre tipo de diagnóstico y linfocitos B CD79+, (Tabla 4) se observó que existía una relación significativa entre ambas variables ($p < 0,05$) con una significación estadística de **0,019** para la prueba *Chi-cuadrado*. En los animales diagnosticados con base en

Tabla 1. Relación entre diagnóstico y lesiones microscópicas (n=23)

		Lesión		Total
		Cerrada	Abierta	
Diagnóstico	Humoral	2	11	13
	Celular	6	4	10
Total		8	15	23

Tabla 2. Relación entre tipo de diagnóstico y observación de micobacterias

		Micobacterias			Total
		Ausencia	Mínima	Multitud	
Diagnóstico	Humoral	3	8	2	13
	Celular	3	5	2	10
Total		6	13	4	23

Tabla 3. Relación entre tipo de diagnóstico y linfocitos CD3+

Diagnóstico		Linfocitos CD3+		Total
		<10%	>10%	
Humoral		5	8	13
	Celular	3	7	10
Total		8	15	23

Tabla 4. Relación entre tipo de diagnóstico y linfocitos CD79+

Diagnóstico		Linfocitos CD79+		Total
		Mínima	Moderada	
Humoral		4	9	13
	Celular	8	2	10
Total		12	11	23

Tabla 5. Relación entre tipo de diagnóstico y linfocitos FOXP3+

Diagnóstico		Linfocitos FOXP3+		Total
		Ausencia	Presencia	
Humoral		1	12	13
	Celular	7	3	10
Total		8	15	23

inmunidad humoral, hubo un número moderado de linfocitos CD79+ en el área de lesión, mientras que, en los diagnosticados con pruebas de inmunidad celular, destacó la mínima cantidad de linfocitos CD79+ en la lesión.

En relación con el estudio entre tipo de diagnóstico y presencia de linfocitos T inmunorreguladores FOXP3+ (Tabla 5), se observó una gran significación estadística ($p < 0,05$) entre el tipo de diagnóstico y la presencia de linfocitos FOXP3+, con un valor de **0,002** en la prueba de *Chi-cuadrado de Pearson* ($p < 0,05$). Más del 90% de las cabras positivas a un diagnóstico de tipo humoral tuvieron una clara presencia de linfocitos FOXP3+ en el área de lesión, mientras que, la mayoría de las positivas con diagnóstico de inmunidad celular, no contenían ningún linfocito FOXP3+ en las lesiones.

Asociación entre lesiones microscópicas y los distintos parámetros estudiados

La asociación entre las lesiones que presentaban los animales a nivel microscópico (abiertas o cerradas) y las diferentes familias celulares, linfocitos CD79+, linfocitos CD3+ y micobacterias se muestran en las tablas 6-9.

En primer lugar vemos el análisis entre el tipo de lesión y la observación de micobacterias en la lesión mediante tinción Ziehl-Neelsen (Tabla 6). En este caso, los resultados estadísticos obtenidos fueron de 0,571 para la prueba *Chi-cuadrado de Pearson*, no existe una relación significativa entre ambas variables ($p > 0,05$). A pesar de ello, en gran parte de los animales destaca la presencia mínima de micobacterias en lesiones abiertas.

Tabla 6. Relación entre lesiones microscópicas y micobacterias

Lesión		Micobacterias			Total
		Ausencia	Mínima	Multitud	
Lesión	Cerrada	3	3	2	8
	Abierta	3	10	2	15
Total		6	13	4	23

Tabla 7. Relación entre lesiones microscópicas y linfocitos CD3+

Lesión		Linfocitos CD3+		Total
		<10%	>10%	
Lesión	Cerrada	2	6	8
	Abierta	6	9	15
Total		8	15	23

Tabla 8. Relación entre lesiones microscópicas y linfocitos CD79+

Lesión		Linfocitos CD79+		Total
		Mínima	Moderada	
Lesión	Cerrada	7	1	8
	Abierta	5	10	15
Total		12	11	23

Tabla 9. Relación entre lesiones microscópicas y linfocitos FOXP3+

Lesión		Linfocitos FOXP3+		Total
		Ausencia	Presencia	
Lesión	Cerrada	5	3	8
	Abierta	3	12	15
Total		8	15	23

También se analizó la asociación entre el tipo de lesión y los linfocitos T CD3+ (Tabla 7). En este caso, se obtiene un valor estadístico de 0,472 para la prueba *Chi-cuadrado de Pearson*, por lo que, como en el caso anterior, no existe significación estadística entre tipo de lesión y el porcentaje de área inmunomarcada de los linfocitos CD3+ en las lesiones ($p > 0,05$).

En la tabla 8 de asociación entre lesiones microscópicas y linfocitos B CD79+ se observó una relación significativa entre lesiones micros-

cópicas y linfocitos CD79+ ($p < 0,05$) con un valor del **0,013** en la prueba de *Chi-cuadrado*. La gran mayoría de animales con lesiones cerradas tendrán una mínima presencia de linfocitos CD79+ al contrario que sucede en lesiones abiertas.

Se analizaron los datos entre tipo de lesión microscópica y presencia de linfocitos T inmunorreguladores FOXP3+ (Tabla 9), se pudo comprobar que existía una relación significativa ($p < 0,05$) de **0,042** para *Chi-cuadrado de Pear-*

son donde la mayor parte de las cabras con lesiones abiertas, contenían una determinada presencia de linfocitos FOXP3+.

Otras asociaciones entre parámetros estudiados

Finalmente, se buscó asociación entre la presencia de los distintos grupos celulares estudiados en el área de lesión. De entre ellos, los que demostraron una relación significativa o cercana a la significación fueron los siguientes:

Relación entre la presencia de linfocitos T CD3+ y B CD79+ (Tabla 10). Existía una relación significativa ($p < 0,05$) entre la presencia de linfocitos T CD3+ y linfocitos CD79+ del valor de **0,016** para la prueba *Chi-cuadrado de Pearson* demostrando que cuando se eleva un tipo celular, como los linfocitos T CD3+, el otro disminuye estableciendo una relación inversamente proporcional.

Relación entre linfocitos B CD79+ y linfocitos T inmunorreguladores FOXP3+ (tabla 11). Debido a los resultados estadísticos, 0,110 para *Chi-cuadrado de Pearson*, no se puede afirmar que exista relación significativa entre ambas variables ($p > 0,05$). No hay significa-

ción estadística, pero debido al valor bajo de p , invita a pensar que con la utilización un tamaño muestral claramente mayor sería posible encontrar esa significación. Destaca la mayoría de cabras que muestran una elevación conjunta de linfocitos T FOXP3+ reguladores y linfocitos B CD79+.

DISCUSIÓN

La pretensión de nuestro estudio se ha basado en determinar que un tipo de diagnóstico dado, es reflejo del proceso inmunopatológico que padece el animal, en este caso la cabra, causado por la infección de las bacterias pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* y por ello, comprender los mecanismos que llevan al cambio de una respuesta celular a una de tipo humoral con un mejor estudio del papel de las distintas poblaciones de linfocitos, sobre todo de los T reguladores.

Así pues, en las cabras donde la respuesta inmune predominante frente a *M.bovis* o *M. caprae* es la celular, los resultados diagnósticos serán positivos frente a las pruebas de intradermotuberculinización simple o comparada y a la prueba de liberación de IFN- γ .

Tabla 10. Tabla de contingencia de linfocitos CD79+ y linfocitos CD3+

		Linfocitos CD3+		Total
		<10%	>10%	
Linfocitos CD79+	Mínima	1	11	12
	Moderada	6	5	11
Total		7	16	23

Tabla 11. Tabla de contingencia de linfocitos CD79+ y linfocitos FOXP3+

		Linfocitos FOXP3+		Total
		Ausencia	Presencia	
Linfocitos CD79+	Mínima	6	6	12
	Moderada	2	9	11
Total		8	15	23

Las lesiones que presentan estos animales son mayormente de tipo cerrado (granulomas) al igual que reflejan nuestros resultados de forma significativa. En esta lesión, según otros autores (García Marín, 2010), habrá un número escaso de bacilos para lo cual no se ha podido ofrecer un resultado contundente, quizás debido a la dificultad de visualización de las micobacterias en los planos histológicos de 5 μm del área pulmonar afectada. Todo ello, el tipo de lesión cerrada y la menor carga bacilar es indicativo de una menor progresión de la enfermedad y mayor contención de patógeno. (Neill et al., 2001). Este tipo de lesión debería presentar mayor cantidad de linfocitos T CD3+, no obstante, se ha comprobado que en lesiones de tipo celular abundarán linfocitos T CD4+ pero en lesiones de tipo cavitarias propias de la respuesta humoral, abundarán linfocitos CD8+, ambos con capacidad de inmunomarcaje para CD3+ (Sanchez et al., 2011). Se hipotetiza que por ello, nuestros resultados han sido no significativos. Sin embargo, se valora con relación significativa que cuando se produce un aumento de los linfocitos T CD3+ en la zona lesional, existe una menor cantidad de linfocitos B CD79+ (aunque naturalmente los linfocitos B se encuentran siempre en menor proporción que los linfocitos T) y esto puede ser debido al propio del balance de la respuesta inmune, pues en momentos en los que dicha inmunidad celular o Th1 es dominante, suele haber una menor respuesta humoral Th2 y viceversa. (Wangoo et al., 2005; Welsh et al., 2005).

Por otro lado, aquellas cabras con predominancia de la respuesta inmune humoral fueron positivas a la prueba diagnóstica de tipo humoral, en este caso serología.

Los resultados entre el diagnóstico humoral, lesiones de tipo abierto y la presencia de linfocitos o células CD79+ en la lesión fueron significativos. Así pues, en la respuesta humoral que se da en fases más avanzadas de la enfermedad, se producirá la licuefacción del interior de los granulomas que se romperán invadiendo vías

respiratorias y que habitualmente presentarán un gran número de bacilos. En nuestro caso, la carga bacilar no fue significativa por las razones probables anteriormente expuestas (García Marín, 2010). Todo ello conlleva una capacidad de contagio mayor, a un estado de anergia del sistema inmunitario celular y por tanto a una fase no detectable por métodos de diagnóstico celulares (O'Brien et al., 2017; Seva et al., 2002). Finalmente, cabe destacar nuevamente la elevación total del número de linfocitos B CD79+ cuando hay una disminución de linfocitos T CD3+ en la zona de lesión (aunque estos últimos sigan hallándose en mayor proporción) con una asociación significativa pues, habitualmente, el tipo de respuesta caracterizada por secreción de anticuerpos, se relaciona con una elevación del número de linfocitos B en la reacción local (Rao et al., 2015).

El último resultado a destacar es en relación con los linfocitos T reguladores o FOXP3+. Esta subpoblación celular es reconocida por su capacidad de retrasar o inhibir la respuesta inmune celular, mecanismo que es empleado por el patógeno *Mycobacterium* para proliferar y causar mayor efecto negativo. Se ha comprobado que su número se eleva en procesos de tuberculosis activa, es decir, en fases más avanzadas donde histológicamente, predomina el tipo de lesiones cavitarias y con una elevada carga de micobacterias encontrándose en mayor proporción que en cualquier otra fase del granuloma (Larson et al., 2013). Así pues, en nuestro estudio se ha obtenido un resultado significativo para la asociación entre la cantidad de linfocitos T reguladores presentes en lesiones abiertas y asimismo, un mayor número de linfocitos T reguladores para aquellos animales que han resultado positivos a pruebas de diagnóstico humoral. Estos resultados son concluyentes dado que su número aumenta en la lesión en el momento en que se ha producido un cambio en la respuesta (fases más avanzadas) ya sean causa o consecuencia del proceso. (Larson et al., 2013). Existe además un resultado, el cual se encuentra cercano al nivel de significa-

ción, donde se asocia la presencia más elevada de linfocitos B CD79+ junto a la presencia de linfocitos FOXP3+ y que podría resultar de interés para su estudio con mayor profundidad. El comprender la función de estos linfocitos podría ser de gran utilidad para campos como la inmunoterapia.

CONCLUSIONES

Las conclusiones finales de nuestro estudio se recogen a continuación:

- Las cabras con diagnóstico humoral positivo y por tanto, con predominancia de lesiones cavitarias tendrán mayor capacidad infectiva a diferencia de cabras con diagnóstico celular dónde el patógeno queda contenido en granulomas.

- El resultado positivo con un diagnóstico celular o humoral no permite predecir la cantidad de micobacterias detectables con la tinción Ziehl-Neelsen en la lesión.

- La presencia significativa de linfocitos B y T reguladores en las lesiones tuberculosas determinan el tipo de respuesta inmune, impidiendo el diagnóstico mediante técnicas de inmunidad celular, e indicando, al aparecer en lesiones abiertas, una mayor capacidad infectiva del animal.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer la disponibilidad del departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas de la facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia.

REFERENCIAS

Balseiro, A., Gortázar, C., & Sáez, J. L. (2020). Tuberculosis animal: una aproximación desde la perspectiva de la ciencia y la administración. In *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaría General Técnica. Centro de Publicaciones.*

Bezoz, J., Álvarez, J., Romero, B., Aranaz, A., & Juan, L. de. (2012). Tuberculosis in goats: Assessment of current in vivo cell-mediated and antibody-based diagnostic assays. *Veterinary Journal*, 191(2), 161–165. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.02.010>

Conserjería de Agua Agricultura Ganadería Pesca y Medio Ambiente. (2018). *Protocolo normalizado de trabajo para la ejecución de los controles del programa de erradicación de tuberculosis caprina en las explotaciones caprinas de aptitud lactea de la región de Murcia.*

García Marín, J. F. (2010). Tuberculosis caprina: diagnóstico. *Pequeños Rumiantes*, 11, 25–33.

Larson, R. P., Shafiani, S., & Urdahl, K. B. (2013). Foxp3+ regulatory T cells in Tuberculosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 783, 165–180. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6111-1_9

Matthews, J. G. (2016). *Diseases of the goat* (pp. 258–274). Wiley Blackwell.

Neill, S. D., Bryson, D. G., & Pollock, J. M. (2001). Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis*, 81(1–2), 79–86. <https://doi.org/10.1054/tube.2000.0279>

O'Brien, A., Whelan, C., Clarke, J. B., Hayton, A., Watt, N. J., & Harkiss, G. D. (2017). Serological analysis of tuberculosis in goats by use of the enferplex caprine TB multiplex test. *Clinical and Vaccine Immunology*, 24(2), 7–11. <https://doi.org/10.1128/CVI.00518-16>

Pesciaroli, M., Alvarez, J., Boniotti, M. B., Caggiola, M., Di Marco, V., Marianelli, C., Pasciarini, M., & Pasquali, P. (2014). Tuberculosis in domestic animal species. *Research in Veterinary Science*, 97(S), S78–S85. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.05.015>

Rao, M., Valentini, D., Poiret, T., Dodoo, E., Parida, S., Zumla, A., Brighenti, S., & Maeurer, M. (2015). B in TB: B Cells as Mediators of Clinically Relevant Immune Responses in Tuberculosis. *Clinical Infectious*

- Diseases*, 61(Suppl 3), S225–S234. <https://doi.org/10.1093/cid/civ614>
- Sanchez, J., Tomás, L., Ortega, N., Buendía, A. J., del Rio, L., Salinas, J., Bezos, J., Caro, M. R., & Navarro, J. A. (2011). Microscopical and Immunological Features of Tuberculoid Granulomata and Cavitory Pulmonary Tuberculosis in Naturally Infected Goats. *Journal of Comparative Pathology*, 145(2–3), 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2010.12.006>
- Seva, J., Menchén, V., Navarro, J. A., Pallarés, F. J., Villar, D., Vásquez, F., & Bernabé, A. (2002). Caprine tuberculosis eradication program: An immunohistochemical study. *Small Ruminant Research*, 46(2–3), 107–114. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(02\)00174-8](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00174-8)
- Wangoo, A., Johnson, L., Gough, J., Ackbar, R., Inglut, S., Hicks, D., Spencer, Y., Hewinson, G., & Vordermeier, M. (2005). Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, $\gamma\delta$ (WC1+) T cells and CD 68+ cells. *Journal of Comparative Pathology*, 133(4), 223–234. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.05.001>
- Welsh, M. D., Cunningham, R. T., Corbett, D. M., Girvin, R. M., McNair, J., Skuce, R. A., Bryson, D. G., & Pollock, J. M. (2005). Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology*, 114(1), 101–111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.02003.x>