



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**DETECCIÓN DE *Mycobacterium bovis* EN POBLACIÓN CANINA, MEDIANTE PRUEBAS INMUNOLÓGICAS,
MICROBIOLÓGICAS Y DE BIOLOGÍA MOLECULAR.**

**TESIS
QUE PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
ITZEL NALLELI JIMÉNEZ VÁZQUEZ**

**TUTOR PRINCIPAL
DRA. ELIZABETH MORALES SALINAS
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
COMITÉ TUTOR
DR. JOSÉ ÁNGEL GUTIÉRREZ PABELLO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DRA. ROSALINDA ACOSTA SALINAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

MÉXICO CD. MX.

MAYO

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Para Melissa

El empeño y dedicación son necesarios para alcanzar tus objetivos. Tú eres mi mayor motivo, gracias por ser paciente y aunque eres pequeña has sabido sobrellevar todo lo que implica mi trabajo.

Agradecimientos

A los doctores Elizabeth Morales Salinas y Orbelín Soberanis Ramos por permitirme trabajar una vez más con ustedes, por su asesoría, financiamiento y amistad.

A los miembros de mi comité tutor, la Dra Rosalinda Acosta Salinas gracias por su apoyo y asesorías durante la realización de este trabajo, por abrirme las puertas de su laboratorio, así como su financiamiento. El Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello, gracias por su apoyo durante la realización de este trabajo, por abrirme las puertas de su laboratorio, así como su financiamiento (CONACYT CB167488).

A los miembros del laboratorio de Investigación en Brucelosis y Tuberculosis Bovina, por tratarme como un miembro más de su grupo de trabajo.

Al Dr. Alejandro Benítez Guzmán, gracias por compartir tus conocimientos, por el entrenamiento en el laboratorio, por tu apoyo y amistad.

Al Dr. Edgar Alfonseca Silva, por su orientación durante la realización de la prueba de IFN- γ .

A los miembros del laboratorio de Investigación del ICAP, el Dr. Victor Manuel Martínez Juárez y el Dr. Adrián Zaragoza Bastida, de igual forma agradezco su trato como un miembro más de su grupo de trabajo.

A la Dra Rosa Elena Méndez Aguilar por su apoyo para la interpretación de las radiografías realizadas.

Al MVZ Mario Santacruz Aguilar y al MC Mario Bedolla Alva por su apoyo para la realización del trabajo de campo con los perros en el Centro Agropecuario e Industrial Tizayuca, Hidalgo.

Al MVZ Rubén Ramírez por su ayuda durante el trabajo de campo con los perros.

A Luis Alejandro Castellanos, por su ayuda durante el trabajo de campo con los perros. Gracias por darme tus días de descanso para realizar el muestreo en los perros.

Al MVZ Alfonso Saulés Aguilar, te agradezco darme la oportunidad de trabajar en tu clínica, la experiencia ganada allí me ayudó mucho durante el trabajo de campo con los perros.

A la MVZ y súper amiga Alma Julieta Martínez Santillán, tú me jalaste al lado oscuro de la clínica de pequeñas especies, te agradezco mucho que compartas conmigo tu experiencia y con lo aprendido en la clínica realicé un mejor trabajo de campo.

A los miembros del jurado, que con sus comentarios se pudo enriquecer la escritura de este trabajo.

Índice.

Resumen	8
Abstract.....	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	11
2.1 Tuberculosis	11
2.2 Características del microorganismo	12
2.3 Patogenia de la enfermedad	13
2.4 Respuesta inmune en la tuberculosis.....	14
2.5 Situación Actual de la Tuberculosis Bovina en México	15
2.6 Diagnóstico	15
2.6.1 Pruebas <i>ante mortem</i> (Prueba de tuberculina y prueba de IFN- γ).....	16
2.6.1.1 Prueba de tuberculina	16
2.6.1.2 Ensayo de liberación de interferón gamma (IFN- γ).....	16
2.6.2 Pruebas <i>post mortem</i>	17
2.6.2.1 Histopatología.....	17
2.6.2.2 Bacteriología.....	18
2.6.2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa	18
2.7 Relación hombre-perro: Riesgo de Zoonosis.....	19
2.8 Tuberculosis en el perro	20
2.8.1 Presentación clínica de tuberculosis en el perro.....	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. HIPÓTESIS.....	22
5. OBJETIVOS.....	22
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	22
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
6. MATERIAL Y MÉTODOS	23
6.1 Lugar de estudio:.....	23
6.2 Diseño de estudio epidemiológico:.....	23
6.3 Censo de población canina	23
6.4 Cuestionario de salud general.....	23
6.5 Manejo de los perros	24
6.5.1 Examen físico general	24

6.6 Pruebas Inmunológicas	24
6.6.1 Aplicación de la prueba de tuberculina con PPD de <i>M. bovis</i>	24
6.6.2 Ensayo de Liberación de Interferón Gamma (IFN- γ).....	25
6.6.2.1 Obtención de muestras de sangre para estímulo celular	25
6.6.2.2 Estimulación de sangre con antígenos micobacterianos (Medición de la producción de IFN- γ)	25
6.7 Imagenología y Necropsia.....	25
6.7.1 Radiografías de tórax	25
6.7.2 Estudios <i>post mortem</i>	25
6.8 Pruebas Microbiológicas y de Biología Molecular	26
6.8.1 Descontaminación de las muestras.....	26
6.8.2 Aislamiento de DNA.....	26
6.8.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	26
6.8.4 Cultivo bacteriano	27
7. RESULTADOS.....	29
7.1 Censo de población canina y cuestionario general.....	29
7.2 Resultados del examen físico.....	41
7.3 Pruebas Diagnósticas.....	42
7.3.1 Prueba de Tuberculina	42
7.3.2 Ensayo de liberación de Interferón gamma (IFN- γ).....	42
7.4 Análisis bivariado.....	44
7.5 Exámenes complementarios	45
7.5.1 Radiografías de Tórax	45
7.5.2 Estudios <i>post mortem</i>	48
7.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa	51
7.5.4 Resultados de Cultivo.....	51
8. DISCUSIÓN	52
9. CONCLUSIONES	56
10. BIBLIOGRAFÍA.....	57
11. ANEXOS.....	61

Índice de figuras

Figura 2.1. Estructura de la pared micobacteriana.

Figura 2.2. Protocolo de laboratorio para la realización del Ensayo de Liberación de Interferón Gamma (IFN- γ).

Figura 6.1. Medición de la piel de la oreja a las 72 horas post inoculación con PPD bovino.

Figura 7.1. Población canina del CAIT por sexo.

Figura 7.2. Edad de la población canina del CAIT.

Figura 7.3. Lugar de origen de los perros del CAIT.

Figura 7.4. Tiempo transcurrido en el que recibió atención médica veterinaria.

Figura 7.5. Manejo de medicina preventiva en los perros.

Figura 7.6. Ingreso a la ordeña.

Figura 7.7. Acceso a otros establos.

Figura 7.8. Convivencia con otras especies.

Figura 7.9. Lugar de acceso para el consumo de agua.

Figura 7.10. Consumo de leche bronca.

Figura 7.11. Consumo de restos de animales.

Figura 7.12. Perros con presentación reciente de signos clínicos.

Figura 7.13. Índice de estimulación por individuo.

Figura 7.14. Concentración de IFN- γ de sangre de perro estimulada con PPD^B.

Figura 7.15. Resultado de la prueba de PCR para el gen *mpb 70* en muestras de órganos (pulmón, linfonodos retrofaríngeo, traqueobronquial, mediastínico y mesentérico e intestino).

Índice de imágenes

Imagen 1. Perro 70. Radiografía de tórax lateral izquierda-lateral derecha.

Imagen 2. Perro 68. Radiografía de tórax lateral derecha-lateral izquierda.

Imagen 3. Perro 19. Radiografía de tórax lateral izquierda-lateral derecha.

Imagen 4. Perro 53. Radiografía de tórax lateral derecha-lateral izquierda.

Imagen 5. Perro 33. Radiografía de tórax lateral derecha-lateral izquierda.

Imagen 6. Vista ventral de pulmón derecho mostrando nódulos multifocales blancos de diferentes diámetros, así como zonas enfisematosas.

Imagen 7. Vista dorsal de pulmón derecho, mostrando nódulos multifocales blancos de diferentes diámetros.

Imagen 8. Acercamiento vista de pulmón, mostrando nódulos multifocales blancos de diferentes diámetros.

Imagen 9. Fotomicrografía de pulmón 10X Tinción Hematoxilina y Eosina (H&E).

Imagen 10. Fotomicrografía de pulmón 40X. Tinción Hematoxilina y Eosina (H&E).

Imagen 11. Fotomicrografía de linfonodo 10X Tinción Hematoxilina y Eosina (H&E).

Imagen 12. Fotomicrografía de linfonodo 10X Tinción Hematoxilina y Eosina (H&E).

Imagen 13. Fotomicrografía de Linfonodo 100X Tinción Ziehl-Neelsen (ZN).

Índice de cuadros

Cuadro 1. Perros del CAIT que han recibido manejo de medicina preventiva (%).

Cuadro 2. Diferentes áreas del establo a las que los perros tienen acceso.

Cuadro 3. Convivencia y contacto que los perros tienen con la población humana.

Cuadro 4. Lugar en el que los perros defecan.

Cuadro 5. Tipo de alimentación de los perros del CAIT.

Cuadro 6. Etapa de la vida en la que el perro consumió leche bronca.

Cuadro 7. Frecuencia de consumo de la leche bronca.

Cuadro 8. Alteraciones observadas al examen físico.

Cuadro 9. Alteraciones observadas en linfonodos (Aumento de tamaño).

Cuadro 10. Aumento en milímetros tras la aplicación de la prueba de tuberculina.

Cuadro 11. Factores de riesgo de la población canina del CAIT (IFN- γ n=65).

Cuadro 12. Hallazgos radiográficos en la población canina del CAIT.

Cuadro 13. Alteración en linfonodos por individuo (Aumento de tamaño).

Resumen

El agente causal de la tuberculosis bovina es *Mycobacterium bovis* que afecta principalmente a bovinos, sin embargo, posee uno de los más amplios rangos de hospederos, afectando especies como: humanos, primates no humanos, vacas, venados, tejones, perros, entre otros. La información de tuberculosis en perros es escasa. El objetivo del presente estudio fue la detección de *M. bovis* en una población canina que cohabita con bovinos naturalmente expuestos a la micobacteria.

El estudio se realizó en el Complejo Agropecuario e Industrial Tizayuca (CAIT), ubicado al sur del estado de Hidalgo, integrado por 126 establos, actualmente se encuentran en producción 73 establos con una población estimada de 18,000 bovinos lecheros. La población canina se compone de 250 perros, la mayoría tiene acceso a todas las áreas del establo, algunos de ellos son alimentados con leche bronca y a veces llegan a consumir placentas y fetos de los corrales en el establo donde habitan. A 65 perros escogidos al azar se les realizó examen físico general, prueba de tuberculina y ensayo de liberación de interferón gamma (IFN- γ). Los resultados de la prueba de tuberculina fueron muy variados, teniendo reacciones que oscilaron entre 1 y 13 mm, el 13.85% de los perros muestreados tuvo una reacción mayor a 5 mm. El 55.38 % (36 de 65) de los perros tuvo un resultado positivo en la prueba de interferón gamma. Para identificar factores de riesgo, se buscó la asociación de infección a *M. bovis* con una encuesta epidemiológica. El análisis estadístico determinó que los perros que permanecen libres, es decir que no están amarrados (OR 4.9, IC 95%) y que deambulan libremente por el establo (OR 19.35, IC 95%) tienen mayor posibilidad de presentar un resultado positivo a la prueba de IFN- γ . Con base en los resultados de las pruebas anteriores, se seleccionó un subgrupo de perros para imagenología (19), de los cuales, únicamente 5 resultaron con lesiones sugerentes de neumonía. En el caso particular de un perro al que se le realizó necropsia, macroscópicamente se observaron lesiones nodulares blancas multifocales y zonas enfisematosas en los pulmones, al realizar la histopatología se observó neumonía intersticial e hiperplasia linfoide, con la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) se observan algunos macrófagos positivos (citoplasma rojo intenso). De los tejidos colectados a la necropsia se obtuvo un resultado positivo de PCR (MPB 70). Por lo tanto concluimos que *M. bovis* está presente en la población canina que cohabita con bovinos.

Palabras clave: *Mycobacterium bovis*, perros, prueba de interferón gamma (IFN- γ), tuberculosis

Abstract

Mycobacterium bovis is the causative agent of bovine tuberculosis primarily affects cattle, however, has one of the widest ranges of hosts, affecting species such as humans, non-human primates, cows, deer, badgers, dogs, among others. Information of tuberculosis in dogs is scarce. The aim of this study was the detection of *M. bovis* in a dog population living with cattle naturally exposed to the mycobacteria.

The study was conducted at the Agricultural and Industrial Complex Tizayuca (CAIT), located south of Hidalgo State, comprising 126 stalls, currently 73 stables in production with an estimated population of 18,000 dairy cattle. The canine population is composed of 250 dogs, most with free access to all facilities feed with raw milk and animal tissues like placenta and fetuses. In order to identify risk factors associated to the infection, epidemiology survey was conducted. Sixty five dogs were selected randomly to perform general physical examination, tuberculin skin test and interferon gamma release assay (IFN- γ). A subgroup of dogs was selected for imaging (19) and necropsy (1). Dogs remaining free (not tied) (OR 4.9, IC 95%) and those with access to all facilities (OR 19.35, IC 95%) had more possibility to get a positive result on the IGR test. Results of the tuberculin skin test were ambiguous, having reactions between 1 and 13 mm, 13.85% of the population had a reaction over 5 mm. The 55.38 % (36/ 65) of the dogs had a positive test result of gamma interferon. The x-ray results showed only five dogs with pneumonia. At the necropsy white multifocal nodular lesions and emphysematous areas were observed, histopathology showed interstitial pneumonia and lymphoid hyperplasia in the lungs, with Ziehl-Neelsen (ZN) some positive macrophages (deep red cytoplasm) were observed. A positive PCR (MPB 70) was obtained from tissues collected at necropsy. We conclude the presence of *M. bovis* in the canine population who lives together with cattle.

Key words: *Mycobacterium bovis*, dogs, interferon gamma release assay (IFN- γ), tuberculosis.

1. INTRODUCCIÓN

Se tiene mucha razón para creer que las necesidades psicológicas del hombre fueron la principal causa de la domesticación de los animales, así como la necesidad de apoyo en sus actividades de trabajo y de alimentación. Muchas especies animales comparten el mismo ambiente y a menudo se benefician de la presencia del otro, sin embargo, este no es el caso del hombre con los animales domésticos. La estrecha convivencia del hombre con estos animales ha favorecido la presentación de zoonosis con una gran variedad de agentes causales (Beck, 2013).

La tuberculosis bovina causada por *Mycobacterium bovis* es una enfermedad infecto-contagiosa de curso crónico que causa pérdidas económicas de consideración, además de que es una zoonosis. México es un país endémico de tuberculosis bovina, actualmente la prevalencia de la enfermedad en cuencas lecheras es del 16 % (SENASICA, 2015), la presencia de otras especies en las unidades de producción representan un problema en el control y erradicación de la enfermedad (Shrikrishna et al, 2009).

El hospedero principal de *M. bovis* es el bovino, sin embargo, posee uno de los más amplios rangos de hospederos, afectando especies como: humanos, primates no humanos, vacas, venados, tejones, perros, entre otros (O'Reilly y Darbon, 1995). Se ha informado que la mayoría de los casos de tuberculosis canina es causada por *M. tuberculosis* y se asocia a la convivencia cercana con pacientes tuberculosos. Por otro lado, la presencia de perros en las producciones animales, así como el consumo de leche bronca o restos de animales podría favorecer la infección de los perros con *M. bovis* (Chomel y Arzt, 2013). Sin embargo la información disponible es escasa.

El diagnóstico en bovinos se lleva a cabo principalmente mediante pruebas *ante mortem* con la prueba de tuberculina, y de manera complementaria se realiza el ensayo de liberación de IFN- γ . Los animales reactivos a estas pruebas deben ser sacrificados para la toma de muestras para histopatología y microbiología (NOM 031 ZOO 1995, Schiller *et al*, 2009). En los perros el diagnóstico es una tarea difícil ya que las pruebas de laboratorio, biopsias y radiografías dan resultados inespecíficos, asimismo se ha observado que la prueba de tuberculina no es confiable (Parsons *et al*, 2012, Chomel y Arzt, 2013).

El objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia de *M. bovis* en una población canina que cohabita con bovinos, mediante pruebas inmunológicas, microbiológicas y de biología molecular.

2. REVISIÓN DE LA LITERATURA

La tuberculosis puede ser considerada como un antiguo flagelo, ya que se sabe ha infectado al hombre a lo largo de su historia. *M. tuberculosis* quizá ha matado más personas en el mundo que cualquier otro microorganismo patógeno (Daniel, 2006).

Se ha postulado que el género *Mycobacterium* se originó hace más de 150 millones de años. Las técnicas de genética molecular y secuenciación, así como la baja tasa de mutación del agente han permitido una mejor estimación del origen de las micobacterias, se ha propuesto, que el ancestro de *M. tuberculosis* estuvo presente al este de África hace tres millones de años y pudo haber infectado los homínidos de ese tiempo (Daniel, 2006).

Se ha encontrado también que otros miembros del complejo *M. tuberculosis* como *M. africanum*, *M. canettii*, así como *M. bovis* tienen un ancestro común africano de hace 35 000 a 15 000 años (Daniel, 2006).

Desde el descubrimiento de lesiones tuberculosas en momias egipcias en diferentes escritos antiguos, como hindúes y griegos, se ha mencionado a la tuberculosis como una enfermedad grave, de curación difícil y fatal (Ledderman, 2003, Altamirano, 2004). Existe también evidencia arqueológica de tuberculosis en América, se han encontrado lesiones en momias peruanas de la época precolombina; lo que indica que la enfermedad se desarrolló antes de la llegada de los primeros exploradores europeos a América (Daniel 2006).

2.1 Tuberculosis

El término tuberculosis se utiliza para las enfermedades que son causadas exclusivamente por agentes del complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*; *M. bovis*; *M. africanum*; *M. microti*; *M. canettii*; *M. caprae* y *M. pinnipedi*) (Abalos y Rematal, 2004).

La tuberculosis humana, se considera la segunda causa de mortalidad a nivel mundial, en el 2013, 9 millones de personas contrajeron la enfermedad, mientras que 1.5 millones murieron por la enfermedad; más del 95% de dichas muertes ocurrieron en países en vías de desarrollo (OMS, 2015).

Se estima que en 2013, 550 000 niños contrajeron la enfermedad y 80 000 murieron por la misma causa. En mujeres de entre 15 y 44 años, la tuberculosis, es una de las cinco causas principales de muerte (OMS, 2015).

La tuberculosis bovina causada por *M. bovis*, es una enfermedad infecto-contagiosa, de curso crónico y progresivo, que afecta a los animales y al hombre, por lo que se considera zoonosis. Se caracteriza por la formación de lesiones granulomatosas en diversos órganos, que merman la condición física y productiva, causando pérdidas económicas de consideración (Abalos, y Rematal 2004; Herrera *et al*, 2009, NOM-031-ZOO-1995). Es una enfermedad de notificación obligatoria debido al impacto socioeconómico que genera y por las dificultades que puede representar para el comercio internacional de animales y de sus productos en los países afectados (Bautista, 2011).

Diversas especies animales domesticas como silvestres son hospederos de *M. bovis*, entre las que se encuentran: cabras, ovejas, búfalos, venados, bisontes, antílopes, leones, leopardos, camélidos, zarigüeyas, liebres, hurones, cerdos domésticos y silvestres, jabalíes, primates humanos y no humanos; así como perros y gatos. De acuerdo con la dinámica de la enfermedad las poblaciones de animales infectados pueden ser considerados como hospederos de mantenimiento, aquellos que mantienen la infección en ausencia de fuentes externas de reinfección (Boroughan *et al*, 2013), mientras que los hospederos incidentales (*spillover hosts*) son aquellos animales en los que la enfermedad no persiste sin una fuente externa de reinfección. En este tipo de hospederos, la enfermedad desaparecerá en cuanto la fuente de infección sea eliminada; pueden morir y no desempeñar un papel en la transmisión de la enfermedad (Palmer *et al*, 2012; Boroughan *et al*, 2013).

2.2 Características del microorganismo

Las micobacterias son bacilos inmóviles, ácido alcohol resistentes, no esporógenos; con un alto contenido lipídico en su pared celular. Las micobacterias patógenas son de lento crecimiento no fotocromogenicas Son resistentes a desinfectantes ácidos y álcalis, a la desecación y otros factores adversos del medio (Thoen y Barletta, 2004, Pfyffer, 2011); y susceptibles a cuaternarios de amonio, yodo y fenoles (SENASICA, 2015).

El genoma de *M. bovis* tiene un 99.95% de identidad con *M. tuberculosis*. Las diferencias en el genoma se deben a las deleciones que *M. bovis* posee, por lo tanto estas diferencias se manifiestan en el fenotipo y patogenicidad así como rango de hospedadores de las mismas. Tras diversos estudios realizados, se ha llegado a la conclusión de que *M. canettii* es el ancestro de todas las especies del complejo *M. tuberculosis*, ya que la pérdida de la región RD9 dio origen a *M. africanum*, *M. microti*, así como *M. bovis*. Las cepas de *M. tuberculosis* se originaron por la pérdida del locus TbD1 (Thoen, 2006)

La patogenicidad de las micobacterias depende de la participación de diversos componentes. Entre ellos, podemos mencionar: la estructura de la pared celular de las bacterias (peptidoglucano, arabinogalactano y ácidos micólicos), los ácidos micólicos participan en el factor de acordonamiento (dimicolato trehalosa). Los sulfolípidos inhiben la formación del fago-lisosoma en los macrófagos, asimismo son capaces de inducir cambios importantes en la función fagocítica de las células, provocando una disminución en la capacidad de respuesta de dichas células hacia la micobacteria. Otros factores que pueden favorecer la sobrevivencia de la micobacteria dentro de los macrófagos son: proteínas inmunoreactivas, lipoarabinomanano, arabinogalactano y ácidos micocerosicos (Thoen y Barletta, 2004).

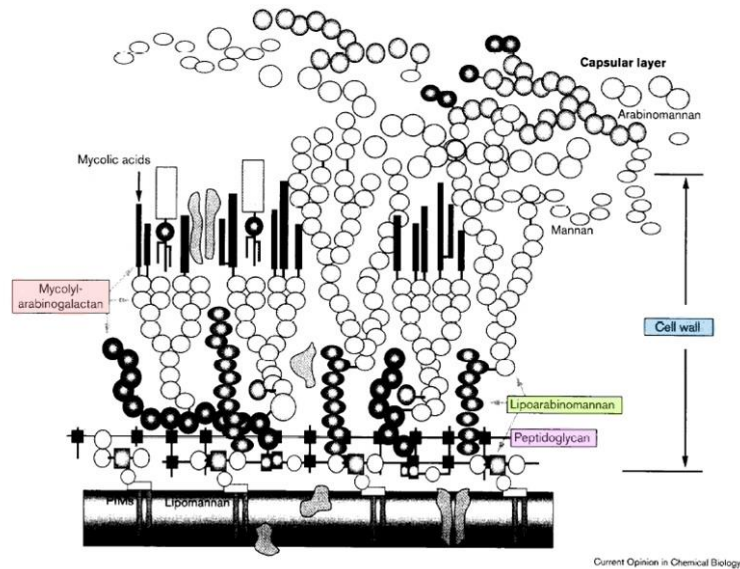


Figura 2.1. Estructura de la pared micobacteriana. Tomado y modificado de Chatterjee, 1997.

2.3 Patogenia de la enfermedad

La infección por micobacterias puede ser adquirida por diferentes vías, siendo la respiratoria la más común, por lo que la distribución de las lesiones son observadas en los linfonodos del tracto respiratorio principalmente. La edad y comportamiento de los animales, así como su medio ambiente son factores importantes para el desarrollo y establecimiento de la enfermedad, asimismo lo serán factores inherentes al bacilo (Olsen *et al*, 2010).

Otra de las vías de infección puede ser mediante la ingestión de alimento y agua contaminada, las lesiones se desarrollarán en linfonodos asociados al tracto gastrointestinal (Olsen *et al*, 2010).

Cuando el individuo entra en contacto con la micobacteria, pueden presentarse tres escenarios: 1) Control y eliminación del bacilo, por lo tanto el animal no se infectará ni enfermará. 2) El bacilo permanece viable en el organismo del individuo, se controla al microorganismo y el animal no enferma. 3) El bacilo permanece viable en el organismo del individuo, el sistema inmune controlará la micobacteria, puede desarrollarse una infección latente o desarrollarse la enfermedad (Pollock y Neill, 2002).

Estudios experimentales en los que se han realizado infecciones en animales por diferentes vías, han demostrado que el desarrollo de lesiones y la gravedad de la enfermedad dependerán de la vía de infección. Asimismo la localización de las lesiones afecta la excreción de *M. bovis* por parte del animal infectado. Thoen (2006) describió las siguientes vías de transmisión:

Respiratoria

La vía respiratoria mediante la inhalación de aerosoles conteniendo la micobacteria es la forma más eficiente de transmisión, ya que requiere una dosis infectiva mínima de microorganismos. Este tipo de transmisión se presenta comúnmente en animales confinados, o en los que viven en grupos.

Digestiva

La ingestión de la micobacteria es otra vía importante de infección, para que un animal se infecte con la micobacteria mediante esta vía, es necesario que consuma agua o alimento contaminado con moco o secreciones nasales, heces, orina o que consuma leche contaminada o cadáveres con lesiones.

Transcutánea

Esta vía de transmisión es menos común, puede ocurrir en humanos que manejen cadáveres infectados, la infección se facilitará si existen lesiones en la piel; en el caso de los animales, la transmisión se dará mediante mordidas de animales infectados (gatos, hurones y tejones).

Vertical

Esta vía de transmisión ha sido observada en tejones, zarigüeyas y venados cola blanca, además de bovinos, sugiriendo que las crías se infectan mediante la ingestión de leche de madres infectadas.

2.4 Respuesta inmune en la tuberculosis

La entrada de las micobacterias al macrófago puede darse por diferentes vías: receptores del complemento (mediante células opsonizadas o no opsonizadas), receptores de manosa, receptores Fc mediante células opsonizadas con IgG, receptores *scavenger*, así como con la interacción de la micobacteria con el colesterol de la membrana celular (Pieters, 2001).

Una vez que las micobacterias llegan a los espacios alveolares del pulmón, comenzarán a multiplicarse dentro de los macrófagos y después de 10 a 14 días se dará la respuesta inmune celular, en esta etapa pueden suceder dos cosas: los macrófagos adquieren la capacidad de eliminar al microorganismo intracelular (Thoen y Barletta, 2004), formándose la lesión caseosa (complejo primario encapsulado)(Manual Merk, 2014); o bien, si el animal se encuentra inmunocomprometido, puede suceder una generalización precoz, en la que mediante vía linfática el bacilo llegará a diferentes órganos(Manual Merk, 2014).

Tras la internalización de la micobacteria en los macrófagos, empezará la producción de citocinas proinflamatorias como: IFN- γ e IL17, TNF- α , IL-18, IL-12, IL-2, así como antiinflamatorias como IL-10, IL-4, IL-5, IL-6, TGF- β ; además de quimiocinas CXCL 9, CXCL10 para el control de la micobacteria y la formación de granulomas (Aranday *et al*, 2013, Olsen *et al*, 2010).

Estudios inmunohistológicos han demostrado que las células T son las primeras involucradas en la formación de granulomas, los grupos involucrados en esta son: células T $\gamma\delta$, CD4 y CD8 (Pollock *et al*, 2005).

El control de la infección por *M. bovis*, se basa en montar una respuesta inmune celular (Th 1), que se caracteriza por la producción de INF- γ para la activación de macrófagos e inicien su actividad microbicida. Las células T CD4 son las células que inducen la producción IFN- γ principalmente, las células $\gamma\delta$ lo producen también, pero en menor cantidad; por otro lado la actividad principal de las células T CD8 es la lisis de células infectadas con micobacterias (Pollock *et al*, 2005).

Las investigaciones en cuanto a la respuesta inmune de tipo humoral, se han basado en la caracterización de antígenos que sean útiles para el desarrollo de pruebas de serodiagnóstico. Se ha identificado que las proteínas ESAT-6, MPT63, MPT70, MPT51, MPT32 Y MPB83 poseen epítopes importantes en las células B (Pollock *et al*, 2005).

2.5 Situación de la Tuberculosis Bovina en México

Siendo México un país endémico de tuberculosis bovina, hasta antes de 1992, la prevalencia de la misma era desconocida, tras la implementación de la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (NOM 031 ZOO 1995), actualmente existen 25 estados clasificados con baja prevalencia (>0.5%) en ganado de carne (SAGARPA-SENASICA, 2015).

Se considera que el 15.87 % del territorio mexicano se encuentra en fase de control con una prevalencia promedio del 2.05%; sin embargo, la prevalencia en cuencas lecheras es del 16.5% (SAGARPA-SENASICA, 2015).

La enfermedad causada por *M. bovis* en el humano clínicamente es indistinguible de la causada por *M. tuberculosis* (Winthrop, 2005). La diferenciación entre estos dos microorganismos, solo puede llevarse a cabo mediante técnicas bacteriológicas o de biología molecular, por lo que es difícil tener una estimación precisa de los casos de tuberculosis humana causada por *M. bovis* (8 a 16 %) (De la Rúa-Domenech, 2006). La tuberculosis causada por *M. bovis* es una zoonosis que puede ser considerada como esporádica desde que se llevaron a cabo medidas de prevención como la pasteurización de productos lácteos. Sin embargo, se ha informado un incremento en el número de casos en humanos debido al consumo de productos lácteos sin pasteurizar o por la migración de personas a otros países (Torres-González *et al*, 2013).

2.6 Diagnóstico

El objetivo principal de los programas de control y erradicación de tuberculosis en los países afectados consiste en la detección y eliminación de animales enfermos, de los cuales la mayoría desarrollará una infección subclínica (De la Rúa *et al*, 2006). El método de diagnóstico de tuberculosis más utilizado es la prueba de tuberculina; consiste en la reacción de hipersensibilidad retardada tras la aplicación intradérmica del derivado

proteico purificado (PPD). En el animal vivo. Debido a la sensibilidad y especificidad de la prueba, así como del estado inmunológico del individuo, la detección de animales enfermos puede ser variable, por lo tanto se han desarrollado pruebas complementarias para establecer un mejor diagnóstico *ante mortem*, ejemplo de ello es la prueba de IFN- γ .

En México, el control y erradicación de la tuberculosis bovina, se lleva a cabo mediante un protocolo de tres fases: 1) Identificación de reactores 2) Inspección *post mortem* y diagnóstico de laboratorio, 3) Rastreo, cuarentena y saneamiento del hato positivo (Modificación a la NOM 031 ZOO 1995).

Las pruebas diagnósticas establecidas por la Modificación a la NOM 31 ZOO 1995 para el cumplimiento de dicho protocolo son:

- *ante mortem* (Tuberculinización y prueba de IFN- γ complementaria a la prueba de tuberculina)
- *post mortem* (diagnóstico histopatológico, cultivo y aislamiento y por biología molecular)

2.6.1 Pruebas *ante mortem* (Prueba de tuberculina y prueba de IFN- γ)

2.6.1.1 Prueba de tuberculina

La prueba de tuberculina o intradermorreacción fue desarrollada por Robert Koch a finales del siglo XIX (Casas *et al*, 2007), esta prueba ha sido utilizada eficientemente en bovinos y humanos para el diagnóstico de la enfermedad (Bautista, 2011). En el caso de bovinos, consiste en medir la reacción de hipersensibilidad retardada que se produce al inocular en la piel una solución purificada de antígenos de *M. tuberculosis*, *M. bovis* o *M. avium* (PPD, derivado proteico purificado). Tras la entrada del bacilo al organismo se da la estimulación de los linfocitos T, los cuales producen diferentes citocinas para desencadenar en este caso una respuesta inmune Th1 (mediada por células) para generar células de memoria y provocar una reacción inflamatoria en el sitio de aplicación (Casas *et al*, 2007; Tizard, 2009). La prueba se interpreta realizando la medida del grosor de la piel de las 48 a 72 horas post inoculación.

En el caso de los perros, la dosis necesaria que se ha utilizado para esta prueba, es la de mayor concentración utilizada en humanos (≥ 250 UT = 0.1 mL). El sitio de aplicación es el lado proximal medial del miembro pélvico o preferentemente en la cara interna de la oreja (pabellón auditivo); la prueba será positiva cuando se observe una protuberancia o hinchazón endurecida (que posteriormente será necrótica) a las 48 a 72 horas después de la aplicación (Ettinger y Feldman, 2007; Greene, 2012). El departamento de agricultura de Estados Unidos (USDA) sugiere la aplicación de 0.75 mL de PPD bovino vía subcutánea y se verifica la temperatura rectal cada dos horas durante 12 horas. Un aumento en la temperatura de 1.1° C es interpretado como positivo (Ettinger y Feldman, 2007). Sin embargo, se ha demostrado que el uso de la prueba de tuberculina o intradermorreacción en perros es poco confiable (Parsons *et al*, 2012).

2.6.1.2 Ensayo de liberación de interferón gamma (IFN- γ)

El ensayo de liberación de IFN- γ es una prueba que se realiza *in vitro*, desarrollada a finales de los 80's en Australia para el diagnóstico de la tuberculosis bovina junto con la prueba de tuberculina. Se basa en la

detección *in vitro* de los niveles de IFN- γ producidos por los linfocitos T ante la estimulación de antígenos específicos del complejo *M. tuberculosis* (De la Rúa *et al*, 2006; Casas *et al*, 2007).

Para realizar el diagnóstico de tuberculosis bovina a través del ensayo de liberación de INF- γ , se usa el juego de reactivos comercial llamado Bovigam[®] (Prionics, Switzerland). El principio de esta prueba es detectar la respuesta inmune celular del hospedador contra la infección por *M. bovis*, utilizando como antígenos el derivado proteico purificado (PPD) bovino y aviar. La cantidad de IFN- γ producida por las células T del bovino, se mide según el grado de coloración realizando un ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA) y se expresa en unidades de densidad óptica (OD) (De la Rúa *et al*, 2006).

A continuación se esquematiza la prueba de IFN- γ .

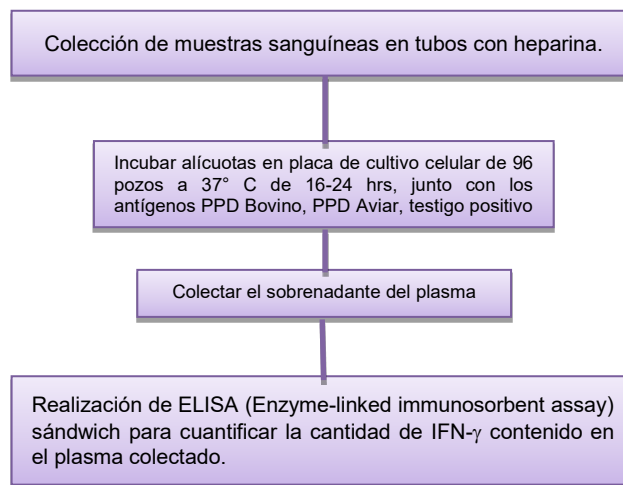


Figura 2.2 Protocolo de laboratorio para la realización del Ensayo de liberación de Interferón Gamma (IFN- γ). Tomado y modificado de: De la Rúa-Domenech *et al*, 2006

2.6.2 Pruebas *post mortem*

Una vez identificadas las lesiones sugestivas a tuberculosis tras la realización de la necropsia o inspección *post mortem*, se toman muestras de diferentes tejidos como son:

- Linfonodos: De la cabeza (retrofaríngeos, mandibulares y parotídeos), así como cervicales, traqueobronquiales, mediastínicos o mesentéricos.
- Otros órganos: Pulmón, bazo, hígado, riñón, médula ósea, ovarios, útero, testículos o glándula mamaria.

2.6.2.1 Histopatología

Las muestras se fijan en formalina al 10%, se procesan por la técnica histológica de rutina y se tiñen con Hematoxilina Eosina (H&E) para identificar por medio del microscopio cualquier cambio morfológico en los tejidos o la formación de granulomas. Se utiliza también la tinción de Ziehl-Neelsen para identificar bacilos.

2.6.2.2 Bacteriología

El examen indirecto se lleva a cabo mediante cultivo, aislamiento e identificación de *M. bovis* utilizando medios especiales para su siembra (NOM 031 ZOO 1995).

El aislamiento de *M. bovis* de muestras clínicas o tejidos es difícil, por lo que se emplean diversos métodos de descontaminación, a los que la micobacteria debe ser más resistente que otros microorganismos, entre los más utilizados se encuentra el hidróxido de sodio (NaOH), cloruro de cetilpiridinio (CPC) entre otros, sin embargo, se ha observado que estos compuestos son tóxicos y afectan el crecimiento de las bacterias (Corner *et al*, 2012). Los medios de cultivo para el aislamiento e identificación de *M. bovis* comúnmente utilizados son: 1) A base de huevo: tienen una buena capacidad amortiguadora y pueden ser almacenados en refrigeración durante varios meses. Stonebrink, que contiene verde de malaquita para inhibir el crecimiento de otros microorganismos, así como cristal violeta, para diferenciarlo del medio Lowenstein Jensen. 2) medios base agar: El medio Middlebrook, tiene un color claro, lo que permite la fácil visualización y cuantificación de las colonias; las siembras realizadas en este medio, tienen una tasa de crecimiento mayor que las realizadas en otros medios; este medio es susceptible a ser contaminado por otros microorganismos fácilmente, por lo que debe ser enriquecido con antibióticos (Pfyffer, 2011).

Nutrientes en los medios de cultivo

Los nutrientes requeridos por las micobacterias pueden ser obtenidos a partir del glicerol como fuente de carbono, además de asparagina y iones de amonio como fuente de nitrógeno y micronutrientes (OPS, 2008). Sin embargo, *M. bovis* necesita piruvato o glutamato de sodio como fuente de carbono; asimismo los medios son enriquecidos con huevo para la fuente de albúmina (Pfyffer, 2011; OPS, 2008).

El examen microscópico puede ser: directo con material obtenido de las muestras mediante la tinción de Ziehl-Neelsen o de nueva fucsina, observándose bacilos rojos en caso de ser positiva. Puede utilizarse también microscopía de fluorescencia con la tinción auramina-rodamina, auramina-acridina o auramina-fenol teniendo bacilos color verde brillante (NOM 031 ZOO 1995).

2.6.2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Desarrollada en 1983 por Kary Mullis, la reacción en cadena de la polimerasa, PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), permite amplificar una región de DNA seleccionada, miles de veces, siempre y cuando se conozca la secuencia de nucleótidos de la región a amplificar (Alberts *et al*, 2008).

La técnica consiste en diseñar dos oligonucleótidos de DNA sintético complementarios a las cadenas, estos flanquearán la región a amplificar y servirán como cebadores para la síntesis de DNA *in vitro*; la replicación del DNA será catalizada por una DNA Polimerasa termoestable (Alberts *et al*, 2008).

El protocolo más sencillo utiliza una muestra de DNA, que se mezcla con la polimerasa, cuatro desoxirribonucleótidos y los oligonucleótidos, primers o cebadores. Se aumenta la temperatura a unos 90°C para

separar las cadenas de DNA, posteriormente se baja la temperatura a 60 °C para que los cebadores se unan al DNA blanco, nuevamente se eleva la temperatura ahora a 72°C para que la polimerasa agregue nucleótidos al cebador (De Necochea y Canul, 2004). Sin embargo existen diferentes protocolos de reacción de PCR de acuerdo al laboratorio en el que se realice.

Se ha informado que el uso de la PCR provee un rápido diagnóstico de diversas enfermedades, particularmente las causadas por patógenos de lento crecimiento. La identificación de los agentes del complejo *M. tuberculosis* en muestras de esputo de humanos y la detección de *M. bovis* en tejidos bovinos ha sido exitosa tras el uso de la PCR. Aranaz *et al.* (1996), sugieren el uso de la PCR como herramienta para la identificación de microorganismos pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*, ya que esta técnica es mucho más rápida y directa que los métodos tradicionales.

En el caso de los perros, se ha informado que la PCR es una prueba útil para confirmar el diagnóstico de tuberculosis en dichos animales. Aranaz *et al.*, 1996, confirmaron el diagnóstico de tuberculosis al realizar dos ensayos de PCR de muestras de tejidos de perros y gatos sospechosos a la enfermedad de los cuales se obtuvo también cultivo positivo y lesiones granulomatosas de cortes histológicos.

2.7 Relación hombre-perro: Riesgo de Zoonosis.

El perro es una de las especies domésticas más antiguas. Evidencia arqueológica indica que el perro fue de las primeras especies animales en ser domesticada, esto pudo ocurrir hacia el final de la última era de hielo, cuando la supervivencia humana todavía dependía de la cacería, recolección y la búsqueda de alimento (Serpell, 1995).

La historia de la relación del perro con el hombre puede remontarse miles de años atrás, en el pleistoceno tardío, humanos y lobos coexistían en un área geográfica amplia, lo que pudo ser una oportunidad para la domesticación y el intercambio genético entre lobos y perros (Vilà *et al.*, 1997). La domesticación del perro trajo consigo muchas ventajas, sin embargo, puso a los seres humanos en un gran riesgo debido a la exposición de este, con parásitos y patógenos del perro (Macpherson *et al.*, 2013).

Existen más de 250 zoonosis que involucran gran variedad de agentes causales y especies de mamíferos siendo los huéspedes intermediarios o definitivos de estos. Las zoonosis causadas por bacterias, comprenden un número limitado y los perros son su principal hospedero. La transmisión de enfermedades del perro al hombre depende de diversos factores, entre los que se pueden mencionar : el comportamiento del propietario con la mascota; en el caso de los niños, el estrecho contacto físico con el perro, la tendencia actual de compartir la cama con la mascota y el modo de transmisión del agente (Macpherson *et al.*, 2013).

2.8 Tuberculosis en el perro

Los perros como hospederos potenciales de *M. bovis* pueden desempeñar un papel importante en el mantenimiento de la enfermedad, por lo tanto, deben considerarse dentro de la vigilancia de la enfermedad, especialmente cuando tienen un contacto estrecho o viven cerca de un establo con animales enfermos de tuberculosis bovina (Abalos y Rematal, 2004; Wilkins *et al*, 2008).

El primer informe de tuberculosis en perros y propietarios fue hecho por Malin (citado por Mills *et al* en 1940). Posteriormente Snider *et al*, 1975, asociaron la presencia de tuberculosis en perros a la enfermedad en humanos y bovinos argumentando que bajo condiciones naturales, los perros pueden infectarse con bacterias pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Se ha informado que el 75% de los casos de tuberculosis en perros son causados por *M. tuberculosis* debido a la exposición con humanos enfermos; mientras que los gatos son más susceptibles a infectarse con *M. bovis*, debido al consumo de productos de origen animal contaminados con la micobacteria; sin embargo, hay que considerar que los perros tienen un alto riesgo de infectarse con *M. bovis* tras la exposición con vacas positivas a tuberculosis. Ejemplo de ello es lo informado por Snider (1975); donde encontró 4/9 perros y 24/52 gatos infectados en un estudio realizado en Pennsylvania (Wilkins *et al*, 2008).

En Gran Bretaña, entre el 2004 y el 2010, se han informado 7 casos de perros infectados con la micobacteria (*M. bovis*), asociados a ingestión o mordeduras de tejones o ardillas (Broughan *et al*, 2013).

Los perros expuestos a humanos que se saben infectados de tuberculosis, pueden desarrollar una prevalencia alta, como lo demostrado por Parsons *et al*, 2012, en una población de alto riesgo la cual tuvo una prevalencia clínica de 1%; mientras que la prevalencia de sensibilización inmunológica fue del 50 %.

2.8.1 Presentación clínica de tuberculosis en el perro

Los animales de compañía naturalmente infectados con tuberculosis, generalmente desarrollan una infección subclínica (Vitirito, 2013), sin embargo, se ha informado que los individuos que han desarrollado la enfermedad, presentan signos clínicos variables e inespecíficos como: debilidad, apatía, pérdida de peso, caquexia, anorexia, signos respiratorios, fiebre, diarrea severa y vómito (Aranaz *et al*, 1996; Erwin *et al*, 2004; Turinelli *et al*, 2004; Parsons *et al*, 2008; Burgt *et al*, 2009; Moravkova *et al*, 2011; Parsons *et al*, 2012; Broughan *et al*, 2013; Vitirito *et al*, 2013; Roberts *et al*, 2014).

Las herramientas que se han empleado para el diagnóstico de tuberculosis en perros incluyen: pruebas de laboratorio (hemograma y bioquímica), citologías, biopsias e improntas, radiografías y ultrasonido, pruebas serológicas, así como ensayos de liberación de IFN- γ , sin embargo, los estudios de histopatología y el cultivo y aislamiento son las pruebas que darán un diagnóstico definitivo de la enfermedad (Greene, 2012).

3. JUSTIFICACIÓN

México es un país endémico de tuberculosis bovina, donde las autoridades sanitarias indican que en las cuencas lecheras una prevalencia del 16.5%. El agente causal de la tuberculosis bovina es *M. bovis*, el cual tiene un amplio rango de hospederos, entre los cuales se encuentran los perros. Existe evidencia de la infección por *M. bovis* así como por *M. tuberculosis* en perros de diferentes partes del mundo, sin embargo, se tiene información limitada sobre la presencia de la micobacteria en poblaciones caninas que cohabitan con animales naturalmente expuestos al patógeno. Por otro lado, los perros como mascotas tienen un estrecho contacto con los humanos, por lo tanto, existe el riesgo potencial de la transmisión de enfermedades del perro al hombre (zoonosis) o del hombre al perro (antropozoonosis). Debido a que se desconoce el papel que los perros desempeñan en la transmisión y mantenimiento de la enfermedad, es necesario realizar más estudios en poblaciones de perros que cohabitan con bovinos infectados con *M. bovis*.

4. HIPÓTESIS

La convivencia de perros con bovinos expuestos naturalmente a *M. bovis*, así como sus hábitos de comportamiento favorecerán la presentación de la infección en perros.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Detectar la presencia de *M. bovis* en población canina que cohabita con bovinos, mediante pruebas inmunológicas, microbiológicas y de biología molecular

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar factores de riesgo asociados a los hábitos de los perros para la presentación de la infección

Realizar las pruebas de IFN- γ , y prueba de tuberculina en la población canina.

Identificar lesiones consistentes con tuberculosis en perros positivos a las pruebas inmunológicas mediante imagenología y necropsia

Demostrar la presencia de *M. bovis* en órganos de perros positivos a las pruebas inmunológicas mediante pruebas microbiológicas y de biología molecular

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Lugar de estudio: La toma de muestras en los perros se llevó a cabo en el Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca (CAIT), ubicado al sur del estado de Hidalgo, en el municipio de Tizayuca; carretera federal México, Pachuca, Km 51.5, en las coordenadas 19° 51'25" latitud norte y 98° 50'8" longitud oeste. Está integrado por 126 establos, de los cuales 73 están en producción, con una población estimada de 18,000 bovinos lecheros.

6.2 Diseño de estudio epidemiológico: Encuestas transversales, observacional y analítico.

6.3 Censo de población canina

Para conocer los datos de perros en los establos, se realizó un censo, obteniendo información acerca del número de perros en cada establo, sexo, edad, presencia de otras especies, acceso de los perros a áreas del establo y a otros establos (Anexo I).

Se visitaron los 126 establos que existen en la cuenca, considerando que en algunos, no existe la presencia de vacas, sin embargo, vive gente con perros.

6.4 Cuestionario de salud general

Durante el censo, se realizó una entrevista a los propietarios junto con la aplicación de un cuestionario, lo que permitió identificar factores de riesgo de los perros expuestos a la tuberculosis bovina, tales como: a) Presencia de otras especies en los establos, b) Comportamiento (si deambulan libremente por el establo o salen a otros establos), c) Tipo de alimentación (consumo de leche bronca, órganos o fluidos de vacas), d) Medicina preventiva, e) Convivencia con humanos entre otros (Anexo II).

Una vez realizado el censo de población canina, y la aplicación del cuestionario general, se obtuvo el tamaño mínimo de muestra con base en lo estimado por Bautista-Rincón (2011) y utilizando la fórmula de estimación de una proporción.

$$n = \frac{z^2(pq)}{d^2}$$

Dónde:

n = Tamaño de muestra requerido

z = Cuantil de la distribución normal con un nivel de confianza (0.95)

p = Proporción en que se supone existe el fenómeno en la población (0.39)

q = Complemento (1-0.39)

d = Error de estimación (0.05)

Se utilizó además la siguiente fórmula para ajustar $n' = \frac{n}{1 + \frac{n-1}{N}}$

6.5 Manejo de los perros

6.5.1 Examen físico general

Para conocer las características de la población de perros y tener un panorama general de su salud, se evaluaron las constantes fisiológicas que rutinariamente se revisan en los consultorios de pequeñas especies: frecuencia cardíaca y respiratoria, temperatura corporal, reflejo deglutorio y tusígeno, campos pulmonares, palmo percusión, porcentaje de hidratación, linfonodos, coloración de mucosas, tiempo de llenado capilar, palpación abdominal, condición de la piel y el pelo, condición corporal; entre otros hallazgos. Asimismo, se evaluó la actitud y condición general del perro. Todos los datos fueron registrados en un formato de apoyo para la recolección de la información (Anexo III).

6.6 Pruebas Inmunológicas

6.6.1 Aplicación de la prueba de tuberculina con PPD de *M. bovis*

Se aplicó 0.1 mL de PPD bovino (2000 UI) en la cara externa de la oreja derecha, a diferencia de la metodología descrita por Greene, 2000 quien sugiere la aplicación del PPD bovino en la cara interna de la oreja. Se decidió realizar una modificación en la metodología por facilidad de manejo.

Se realizó limpieza y desinfección del área a inocular. Con ayuda de un vernier, se realizaron dos mediciones, una previa a la aplicación del PPD bovino y una posterior correspondiente a la lectura a realizar a las 72 horas post- inoculación.

Se realizaron las siguientes mediciones: 1) Medición de la oreja totalmente estirada, 2) Medición de la oreja doblada, 3) Medición del grosor de la piel.

Teniendo en cuenta que en las mediciones 1 y 2 se incluye el grosor del cartílago de la oreja, para el análisis de los resultados, se tomó en cuenta únicamente la medida número tres (medición del grosor de la piel de la oreja). (Figura 6.1)



Figura 6.1. Medición de la piel de la oreja a las 72 horas post inoculación

6.6.2 Ensayo de Liberación de Interferón Gamma (IFN- γ)

6.6.2.1 Obtención de muestras de sangre para estímulo celular

Se obtuvieron de 3 a 5 ml de sangre de 65 perros a las 72 horas pos inoculación con PPD bovino. Las muestras fueron obtenidas de la vena cefálica o yugular en tubos vacutainer con heparina de sodio como anticoagulante (BD Vacutainer® Sodium Heparin, USA); se transportaron protegidas de la luz a temperatura ambiente y se procesaron durante las primeras 6 horas después de tomada la muestra.

6.6.2.2 Estimulación de sangre con antígenos micobacterianos (Medición de la producción de IFN- γ)

Con base en la metodología descrita por Parsons *et al*, 2012, se realizó una dilución 1:5 de la sangre con medio RPMI 1640 con 100 UI/ml de penicilina y 0.1 mg/ml de estreptomycin. Alícuotas de 200 μ l fueron estimuladas con 17 μ l PPD bovino, 17 μ l PPD aviar, 1 μ g/ml pokeweed mitogen (extracto de *Phytolacca americana*, Sigma Chemical CO. St Louis, MO USA) como testigo positivo y sangre sin estimular como testigo negativo. Se incubaron por 5 días a 37°C y 5% de CO₂ por duplicado en placas de cultivo celular de 96 pozos. Los plasmas fueron cosechados y almacenados en congelación hasta la realización de la prueba.

La medición del interferón gamma se realizó con el juego de reactivos comercial Quantikine® canine INF- γ Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, USA).

6.7 Imagenología y Necropsia

6.7.1 Radiografías de tórax

Con base en los resultados de las pruebas inmunológicas se decidió realizar la toma de imágenes radiográficas de tórax, únicamente los propietarios de 19 perros accedieron a la realización de dicho estudio, con una técnica de 70 KV 0.10 a una distancia de 60 cm. El equipo utilizado fue un generador portátil Min X Ray 8015 H), cuyos rangos son 50-80 KV 15 mA. Con equipo digital slate 1 mA, compañía 4

Las tomas realizadas fueron: lateral izquierda- lateral derecha, lateral derecha-lateral izquierda y ventro- dorsal.

6.7.2 Estudios *post mortem*

Se realizó la necropsia a un perro que murió durante la realización del estudio.

Se tomaron muestras de los linfonodos retrofaríngeos, traqueobronquiales, mediastínicos y mesentéricos, pulmón, intestino, hígado, bazo y riñón. Fueron almacenados en formalina al 10% para histopatología y en solución saturada de borato de sodio para microbiología y biología molecular.

6.8 Pruebas Microbiológicas y de Biología Molecular

6.8.1 Descontaminación de las muestras

De las muestras de tejido obtenidas se decidió agruparlas de la siguiente manera: 1) Linfonodos retrofaríngeo, traqueobronquial y mediástico, 2) Pulmón (diferentes partes de cada lóbulo pulmonar) y 3) Intestino y linfonodo mesentérico. Se maceraron con un Polytron® Eppendorf PT 1200 E y se realizó el protocolo de descontaminación. En un tubo falcon se añadieron 7 ml de solución de hidróxido de sodio y citratos (NaOH /Citratos), y se incubó a temperatura ambiente por 15 min, posteriormente, se añadió solución de fosfatos pH 6.8 y se centrifugo a 4000 rpm por 10 minutos hasta alcanzar un pH de 7.

6.8.2 Aislamiento de DNA

Se realizó el aislamiento de DNA de las muestras de tejido. Las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm 5 minutos. Se añadieron 400 µl de TE con 5 µl de lisozima y se incubó por 1 hora a 37° C. Se agregaron 70 µl de SDS 10% y 5 µl de proteinasa K, se incubó toda la noche a 65° C. Se agregaron 100 µl de NaCl 5M y 100 µl NaCl/CTAB, se incubó a 65°C por 10 min. Para extraer el DNA se utilizó un volumen de Fenol-Cloroformo-Isoamílico y un volumen de cloroformo-Isoamílico; para precipitarlo se utilizaron 0.6 volúmenes de isopropanol y se incubó en frío durante una hora, se lavó con 1 ml de etanol al 70%. El DNA se resuspendió con 50 µl de agua inyectable.

La concentración y pureza del DNA se evaluó con espectrofotometría (DO 260/280 nm), mediante la utilización de un espectrofotómetro nanodrop.

6.8.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se realizó un protocolo de PCR anidado para la amplificación de un fragmento del gen *mpb70*, de las muestras de tejido que fueron obtenidas durante la necropsia realizada al perro que murió.

El PCR simple se realizó mediante la amplificación de un fragmento de 372 pb del gen *mpb70* con los iniciadores TB1 F (5' GAACAATCCGGAGTTGACA 3') TB1 R (5' AGCACGCTGTCAATCATGTA 3') (Acosta-Salinas *et al*, 2012) con el siguiente protocolo de reacción temperatura inicial de desnaturalización 96° por 15 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94° por 30 segundos, alineamiento 55° por 30segundos y extensión a 72° por un minuto, finalmente un ciclo de 72° por 10 minutos. El PCR anidado se realizó utilizando 1 µl de la reacción anterior para amplificar un fragmento de 208 pb del mismo gen, con los iniciadores M22 3 (5' GCTGACGGCTGCACTGTCTGGGC 3') y 4 (5' CGTTGGCCGGGCTGGTTTGCC 3'), (Acosta-Salinas *et al*, 2012) cuyo protocolo de reacción fue: temperatura inicial de desnaturalización 94°C por 5 minuto, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineamiento a 65°C por 45 segundos, y extensión a 72°C por 45 segundos, con un ciclo final a 72°C por 10 minutos. Los protocolos de reacción se realizaron en un termociclador (Mastercycler eppgradient S. Eppendorf®).

Cuadro 6.1. Mezcla de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Reactivos	PCR simple		PCR anidada	
	Concentración reactivos	Volumen (μl)	Concentración reactivos	Volumen (μl)
Master mix (Hot Star Taq) 2.5 U	2X	12.5 μl	2X	12.5 μl
Iniciador F	0.2 μM	1 μl	0.2 μM	1 μl
Iniciador R	0.2 μM	1 μl	0.2 μM	1 μl
DNA	-	1 μl	-	1 μl
Agua	-	9.5 μl	-	9.5 μl
Volumen final		25 μl		25 μl

6.8.4 Cultivo bacteriano

Una vez realizada la descontaminación de las muestras, se inocularon 100 μl de cada muestra por duplicado en medios Stonebrink y Lowenstein Jensen. Se incubaron a 37 °C en una incubadora Revco RCO3000T-5ABC. Cada semana se revisaban los tubos para detectar algún crecimiento.

6.9 Análisis estadístico.

Con la información obtenida de los cuestionarios, se realizó un análisis estadístico univariado y bivariado, de los datos con el programa Stata SE 11.0. Asimismo se correlacionaron las variables consideradas como factores de riesgo para contraer la infección con los resultados de las pruebas de laboratorio.

7. RESULTADOS

7.1 Censo de población canina y cuestionario general

Se encontraron 250 perros viviendo en el CAIT, de los cuales 112 (45%) son hembras y 138 (55%) machos. La distribución por edades es la siguiente: 206 (82.4%) son menores de 7 años, 9 (3.6%) tienen una edad mayor a 7 años y 27 (10.8%) son cachorros cuyas edades van del mes hasta los 11 meses de edad; la edad de 8 (3.2%) perros no se conoce (Figuras 7.1 y 7.2).

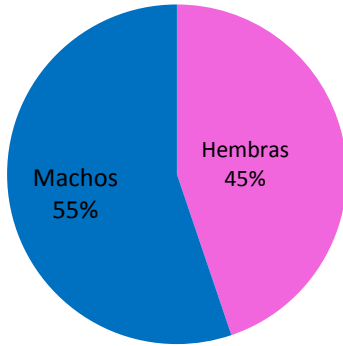


Figura 7.1. Población canina del CAIT por sexo

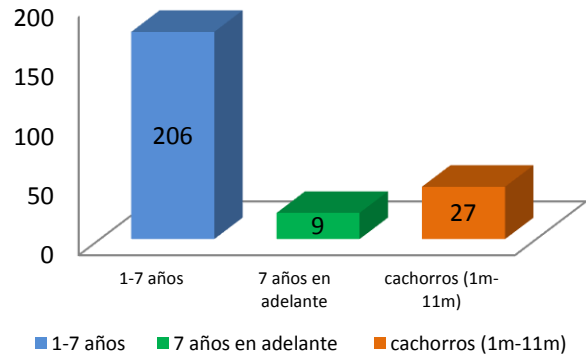


Figura 7.2. Edad de la población canina del CAIT

El **lugar de origen** de la mayor parte de la población canina que vive en el CAIT es el estado de Hidalgo, 125 perros (52.97 %) nacieron en el CAIT, 58 (24.58%) son del municipio de Tizayuca, mientras que 5 perros (2.12%), de acuerdo al entrevistado, el lugar de origen lo refiere únicamente como el estado de Hidalgo y 1 de Tepeji del Río, Pachuca y Huejutla de Reyes respectivamente (0.42%). Diecisiete perros (7.20%) provienen de otro estado (no especificado), así como 1 de Monterrey, San Luis de la paz, Querétaro y Aguascalientes respectivamente (0.42%); 2 de Veracruz (0.85%), 8 (3.38%) son del Estado de México, teniendo 4 de la localidad de Ojo de Agua (1.69%), finalmente 15 provienen del Distrito Federal (6.36%) (Figura 7.3).

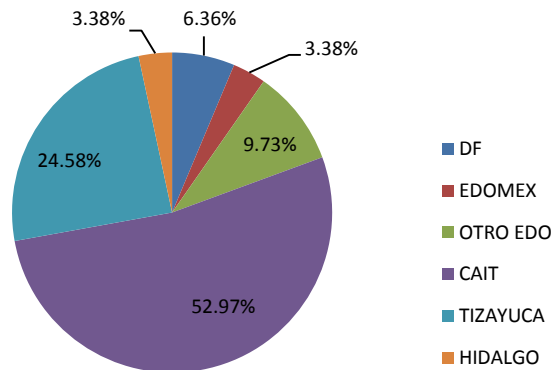


Figura 7.3. Lugar de Origen de la Población canina del CAIT

Atención Médica Veterinaria y Medicina Preventiva

Ciento diecisiete (47.56%) de las mascotas nunca han recibido algún tipo de atención por parte del médico veterinario; 60 (24.39%) recibieron atención médica hace un año o menos, 59 (23.98%) la recibieron hace más de un año; 5 (2.03%) recibieron atención médica cuando eran cachorros. Cinco de los propietarios refieren no saber si su mascota ha recibido atención médica veterinaria alguna vez (Figura 7.4).

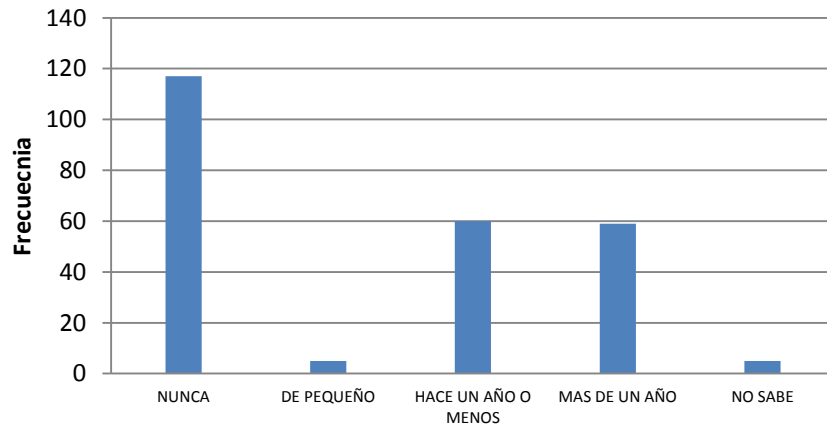


Figura 7.4. Tiempo que ha pasado en la Atención Médica Veterinaria recibida en la población canina del CAIT

Los programas de medicina preventiva que se manejan en pequeñas especies incluyen vacunación y desparasitación periódica. La población canina del CAIT, únicamente ha recibido la vacunación antirrábica y desparasitación proveída por la Secretaria de Salud durante la campaña de vacunación antirrábica. Ciento sesenta y seis (66.40%) de los perros reciben una vacunación anual, 28 (11.20%) fueron vacunados de cachorros, 3 (1.20%) perros fueron vacunados hace seis meses, 7 (2.80%) fueron vacunados hace menos de 6 meses, 7 (2.80%) fueron vacunados hace más de un año, 13 (5.20%) nunca han sido vacunados, 10 de los propietarios no saben si su mascota ha sido vacunada y 16 (6.40%) son cachorros por lo que algunos están iniciado su calendario de vacunación o aún no han sido vacunados. 135 (54.88%) de los perros son desparasitados cada 6 meses a un año, 13 (5.28%) fueron desparasitados de cachorros, 3 (1.22%) se desparasitaron hace más de un año, 3 (1.22%) hace un año o menos; 67 (27.24%) de ellos nunca han sido desparasitados, 10 de los propietarios no saben si su mascota ha sido desparasitada alguna vez y 15 (6.10%) perros que son cachorros no han sido desparasitados o apenas iniciaran su manejo de medicina preventiva (Cuadro 1, Figura 7.5).

La esterilización de las mascotas como medida de control natal, también se considera parte del manejo de medicina preventiva. De 247 perros, 28 (11.34%) han sido esterilizados antes o después de tener alguna camada, mientras que 219 no están esterilizados. De 203 perros que se sabe que han tenido camadas, 119 (58.62%) de ellos no han tenido alguna camada; mientras que 64 (31.53%) de ellos si han tenido alguna camada y de 20 (9.85%) de los perros se desconoce tal dato (Cuadro 1, Figura 7.5).

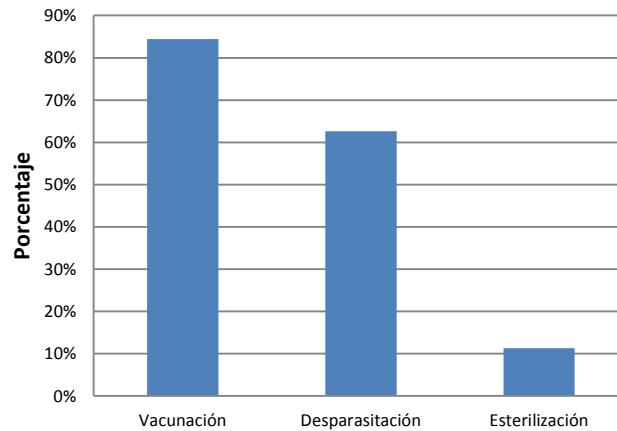


Figura 7.5. Manejo de medicina preventiva

Cuadro 1. Medicina Preventiva de la población canina del CAIT

VACUNACIÓN	Frecuencia	Porcentaje (%)
Nunca	13	5.20
De cachorro	28	11.20
Cada año	166	66.40
Hace más de un año	7	2.80
Hace 6 meses	3	1.20
Hace menos de 6 meses	7	2.80
No sabe	10	4
Es cachorro	16	6.40
Total	250	100

DESPARASITACIÓN		
De cachorro	13	5.28
Hace 6 meses a un año	135	54.88
Hace más de un año	3	1.22
Hace un año o menos	3	1.22
No sabe	10	4.07
Nunca	67	27.24
Es cachorro	15	6.10
Total	250	100

ESTERILIZACIÓN		
Sí	28	11.34
No	219	88.66

Total	247	100
Número de Camadas		
Si	64	31.53
No	119	58.62
No sabe	20	9.85
Total	203	100

Hábitos de las Mascotas

Ciento cincuenta y nueve (63.6%) de los perros deambulan libres en el establo, 69 (27.6%) de ellos permanecen amarrados o encerrados, 10 (4%) están sueltos en el día y amarrados por las noches, mientras que el 12 (4.80%) de los perros permanecen amarrados en el día y sueltos en la noche.

El acceso a las diferentes áreas del establo es la siguiente: 141 (74.21%) perros tienen acceso a todas las áreas del establo, 18 (9.47%) de ellos están en la casa únicamente, 4 (2.11%) tienen acceso a los corrales, 1(0.53%) tiene acceso a las becerreras, 2 (1.05%) tienen acceso al almacén, 7 (3.68%) están en la casa y los pasillos, 3 (1.58%) en corrales y pasillos, 4 (2.11%) en pasillos y entrada, 3 (1.58%) están en la entrada y los corrales, 3 (1.58%) se encuentran en la casa y los corrales, 1 se encuentra en el patio de la casa,1 afuera de la tienda,1 en el jardín y1 en el lugar donde lo amarran (0.53% cada uno) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Acceso a diferentes áreas del Establo

Permanecen	Frecuencia	Porcentaje (%)
Libres	181	72.4
Amarrados	69	27.6
Total	250	100
Áreas del establo		
Todo el establo	141	74.2
Casa	18	9.4
Corrales	14	7.3
Pasillos	13	6.8
Almacén	2	1.0
Otro	4	2.1
Total	190	100

Una de las áreas del establo que debe manejarse con mayor higiene, es la sala de ordeña, el acceso de los perros a la sala durante la ordeña puede ser un factor de riesgo para contaminación de la leche o para que los perros consuman la leche. Únicamente 22 (11%) de los perros pueden ingresar a la sala, mientras se lleva a cabo la ordeña, mientras que 169 (84.50%) de los perros no tienen acceso a la sala durante la misma y 9 de los propietarios no saben si sus perros ingresan a la ordeña (Figura 7.6).

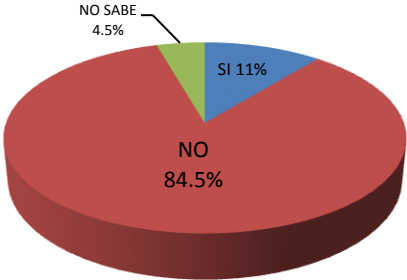


Figura 7.6. Ingreso a la ordeña

Otro de los hábitos observados en los perros es que pueden salir a la calle y tener libre acceso a otros establos, de estos, 108 (44.08%) tienen acceso a otros establos (43 perros, 17.5%) y otros salen a las calles únicamente (65 perros, 26.53%), 5 (2.04%) de ellos salen a las calles y tienen acceso a otros establos, 18 de ellos (7.35%) salen del establo únicamente cuando su dueño los saca. Ciento catorce de los perros (46.53%) no salen nunca del establo (Figura 7.7).

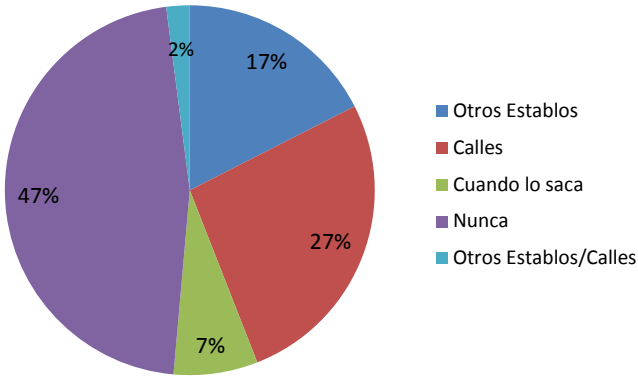


Figura 7.7. Acceso a otros establos

Convivencia con los humanos

Ciento treinta y cuatro (134/250) 53.6 % de los perros tienen una convivencia muy cercana con sus propietarios, 83 (33.20%) de ellos tienen poca interacción y 33 (13.20%) no tienen contacto alguno con sus propietarios. Para saber que tan estrecho es el contacto de los propietarios con los perros, se preguntó si los acarician, permiten que los laman o incluso si duermen con su mascota. Ciento-quince (46%) de ellos son acariciados únicamente, 82 (32.8%) juegan y permiten que su mascota los lama.

Ciento catorce (45.6%) de los perros, duermen en alguna habitación del establo, los propietarios que saben exactamente donde duerme su mascota refirieron los siguientes datos: 31 (12.4%) duermen donde los amarran o encierran, 17 (6.8%) tienen su casa, 17 perros (6.8%) duermen dentro de la casa, 12 (4.8%) en la bodega de alimentos, 3 (1.2%) de ellos duermen en la bodega y los corrales y 19 (7.6%) en los corrales solamente, 11(4.4%) duermen en la entrada del establo, 8 (3.2%) perros duermen en el jardín del establo, 10 (4%) afuera de la casa y 8 de los propietarios no saben dónde duerme su mascota (Cuadro 3).

Cuadro 3. Convivencia y contacto de los perros con la población humana.

CONVIVENCIA	Frecuencia	Porcentaje (%)
Muy cercana	79	31.60
Cercana	55	22
Poca	83	33.20
Nula	33	13.20
Total	250	100
CONTACTO ESTRECHO		
Ninguno	53	21.20
Lo acaricia	115	46
Permite que lo lama	72	28.80
Permite que duerma con él	0	0
Lo acaricia/lo lame	7	2.80
Lo acaricia y juega con él	3	1.20
Total	250	100
DONDE DUERME		
Dentro de la casa	17	6.80
Alguna habitación del establo	114	45.60
En la bodega	12	4.80
No sabe	8	3.20
En la bodega y los corrales	3	1.20

Pasto	8	3.20
Casa del perro	17	6.80
Entrada	8	3.20
Jaula/lugar donde lo amarran	31	12.40
Corrales	19	7.60
Entrada del establo	3	1.20
Afuera de la casa	10	4
Total	250	100

Lugar en el que los perros defecan

Noventa y uno (37.65%) de los propietarios no saben dónde defeca su mascota, mientras que 184 sí sabe o ha visto dónde defeca su mascota, los lugares donde han visto que su mascota defeca son: 35 (15.42%) defecan en los corrales, 40 (17.62%) refieren que su mascota defeca afuera de la casa, 3 (1.32%) en la bodega, 47 (38.84%) donde los amarran o encierran, 25 (20.66%) en la parte de atrás del establo, 24 (19.83%) lo hace en el jardín del establo, 11 (9.09%) en la calle, 9 (7.44%) lo hacen en el lugar que sea, 4 (3.31%) en los pasillos. Ciento sesenta y siete (81.46%) de los propietarios recogen las heces de sus mascotas, mientras que 37 (18.05%) ahí las deja y uno refiere que se las lleva el agua (Cuadro 4).

Cuadro 4. Lugar en el que los perros defecan

Lugar	Frecuencia	Porcentaje (%)
No sabe	91	37.65
Corrales	36	16.25
Afuera de la casa	40	17.62
Bodega	3	1.32
Lugar donde los amarran	47	38.84
Parte de atrás del establo	25	20.66
Jardín	24	19.83
Calle	11	9.09
Pasillos	4	3.31
Lugar que sea	9	7.44
Total		

Convivencia con otras especies

Para identificar un riesgo en la transmisión de la enfermedad, se preguntó si los perros conviven con otras especies, 119 (47.60%) de los 250 perros del CAIT conviven con otras especies; de los 119 perros 66 (56.9%) conviven con vacas, de los cuales 15 perros además de tener contacto con vacas tienen contacto con otros

animales como cerdos, gatos, aves y otros perros. De los 15 mencionados, 5 (4.31%) tienen contacto con cerdos, 1 con gatos, patos y gallos (0.86%), 1 con gatos (0.86%), 4 (3.45%) con gallinas, 3 con perros y gatos (2.59%) y 1 con otros perros (0.86%).

Veinticinco (21.55%) perros conviven únicamente con gatos, 4 (3.45%) con borregos y cabras, 14 (12.07%) de los perros tienen contacto con aves (patos, gallos) y 7 (6.03%) de ellos tienen contacto con otros perros únicamente (Figura 7.8).

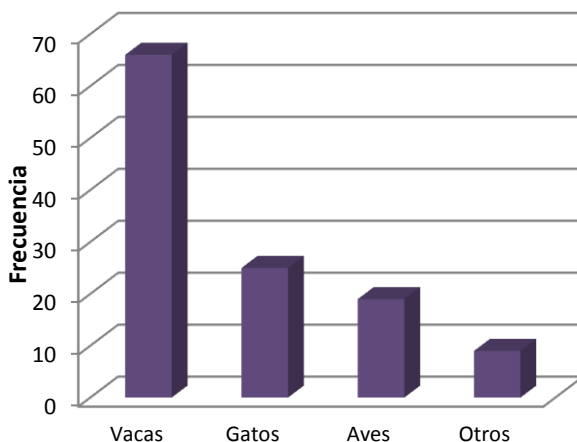


Figura 7.8. Convivencia con otras especies

Tipo de Alimentación

La dieta que recibe la población canina del CAIT es muy variada, los ingredientes que conforman la dieta van desde croquetas, restos de comida y leche.

Ciento quince (46%) de los perros son alimentados con croquetas, mientras que 71 (28.4%) son alimentados con restos de comida. Sesenta y cuatro (25.6% restante) son alimentados con combinaciones de diferentes ingredientes: 36 perros (14.4%) son alimentados con croqueta/restos de comida, 2 perros (0.8%) con croqueta/leche hervida, 7 perros (2.8%) con restos de comida/leche cruda, 4 perros (1.6%) con restos de comida y croqueta a veces, 8 perros (3.2%) con restos de comida/concentrado, 3 perros (1.2%) con restos de comida/croqueta/leche, 2 perros (0.8%) con pollo, 1 perro (0.40%) con carne y 1 perro (0.4%) con tortillas (Cuadro 5).

Cuadro 5. Tipo de Alimentación de los perros del CAIT

Alimento	Frecuencia	Porcentaje (%)
Croqueta	115	46
Restos de comida	71	28.4
Combinaciones		
Croqueta/Restos de comida	36	14.4
Croqueta/Leche	2	0.8
Restos de comida/Leche cruda	7	2.8
Restos de comida/A veces croqueta	4	1.6
Restos de comida/Concentrado	8	3.2
Restos de comida/Croqueta/Leche	8	1.2
Pollo	2	0.8
Carne	1	1.4
Tortilla	1	1.4
Total	250	100

Lugar de acceso para el consumo de agua y alimento (Plato de agua y alimento)

Treinta y cinco (14%) perros no tienen plato propio de alimento, mientras que 215 (86%) si tienen un plato o una bandeja donde les sirven su comida. Diecisiete (6.8%) de ellos tampoco cuentan con un plato donde les proporcionen agua y 233 de los perros cuentan con un plato para agua, el origen del agua que consumen los perros del CAIT es variado, 220 perros la consumen de la llave (88.35%), 9 (3.61%) la consumen de los bebederos del ganado, 10 (4.02%) donde la encuentren, 8 (3.21%) de garrafón y 2 (0.8%) de la llave y de charcos (Figura 7.9).

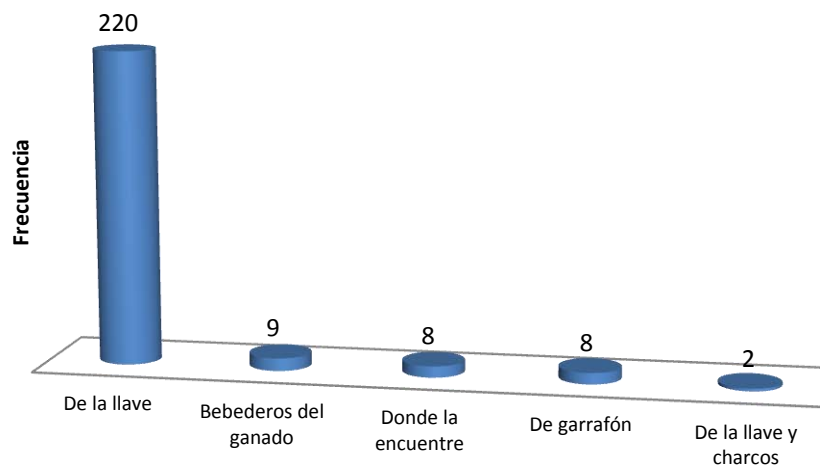


Figura 7.9. Lugar de acceso para el consumo de agua

Consumo de leche bronca

Los propietarios de 101(40.4%) de los perros, refieren que su mascota no consume leche bronca, mientras que 146 (58.4%) la consume o la ha consumido alguna vez en su vida, 3 (1.2%) de ellos no saben si su mascota ha consumido o consume leche bronca. De los animales que consumen la leche, 85 (50%) lo han hecho toda su vida, 48 (28.23%) lo hicieron de cachorros, 34 (20%) el propietario refiere que lo hicieron alguna vez en su vida, sin saber exactamente a qué edad, 2 (1.18%) solo cuando tuvieron parto y 1(0.59%) refiere que la consume desde que llegó al establo. La frecuencia de consumo de la leche es la siguiente: 71 (42.73%) de los perros consumen la leche una vez al día, mientras que 14 (8.43%) la consumen dos veces al día y 10 (6.02%) lo hacen cada tercer día;17 (10.24%) perros consumen leche cada que se ordeña, 18 (10.84%) lo hacen una vez a la semana, 3 (1.81%) dos veces a la semana y 2 (1.2%) tres veces a la semana, 10 (6.02%) perros la consumen cada mes, 2 (1.2%) la consumen cuando hay vacas paridas, 15 (9.04%) cuando le sobra al propietario le dan leche al perro y 7 (4.22%) la consumen a veces (Figura 7.10, Cuadros 6 y 7).

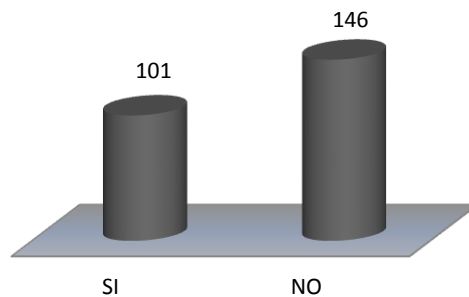


Figura 7.10. Consumo de leche bronca

Cuadro 6. Etapa de la vida del consumo de la leche bronca.

Etapa de la vida de consumo de la leche	Frecuencia	Porcentaje (%)
Toda su vida	85	50
De cachorro	48	28.23
Alguna vez en su vida	34	20
Total		

Cuadro 7. Frecuencia de consumo de leche bronca.

Frecuencia de consumo	Frecuencia	Porcentaje (%)
Una vez al día	71	42.73
Dos veces al día	14	8.43
Cada tercer día	10	6.02
Cada que se ordeña	17	10.24
Una vez a la semana	18	10.84
Dos veces a la semana	3	1.81
Tres veces a la semana	2	1.2
Cada mes	10	6.02
Cuando le sobra	15	9.04
A veces	7	4.22
Total	166	100

Consumo de restos de animales

Los hábitos de alimentación, así como de comportamiento de los perros del CAIT son muy diferentes a los de un perro que vive en casa. Estos tienen un estrecho contacto con las vacas, por lo tanto, algunos de estos llegan a consumir restos de animales como placentas, heces, vísceras, entre otros. De la población canina del CAIT, 150 (60%) de los animales, el propietario refiere que no consumen o han consumido algún resto de los mencionados, 71 (28.4%) de los perros han consumido o consumen restos de animales y 29 de los propietarios no saben si en algún momento su mascota ha consumido algún resto de animal.

De los 71 perros que han consumido restos de animales, 61(85.92%) han consumido placenta, 32 (45.07%) han consumido fetos, 1 (1.41%) han consumido heces, 11 (15.49%) han consumido ratas, 10 (14.08%) de los perros han consumido carne o vísceras y 5 (7.04%) han consumido fluidos (en algunos casos, los perros han consumido uno o más restos de animales) (Figura 7.11).

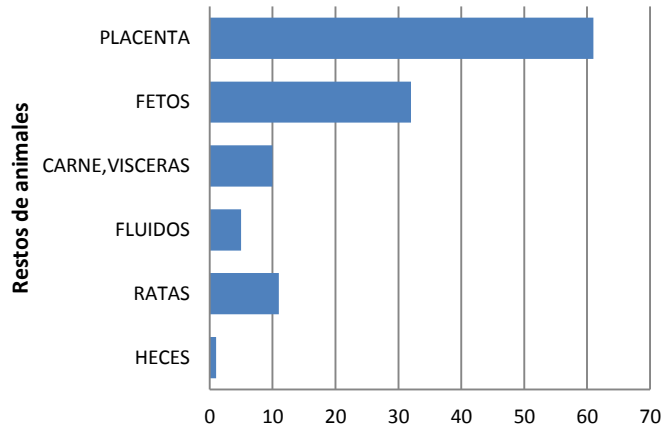


Figura 7.11. Frecuencia de consumo de restos de animales

Signos Clínicos

Se preguntó también si los perros han presentado algún signo clínico que pueda ser asociado a la infección, al respecto 8 (3.2%) perros presentaron depresión, 6(2.4%) tuvieron pérdida del apetito, 8 (3.2%) pérdida de peso, 4 (1.6%) presentaron tos, 1 tuvo moco nasal, 8 (3.2%) tuvieron diarrea, 226 (90.4%) de los propietarios refieren que su perro no ha presentado algún signo clínico (Figura 7.12).

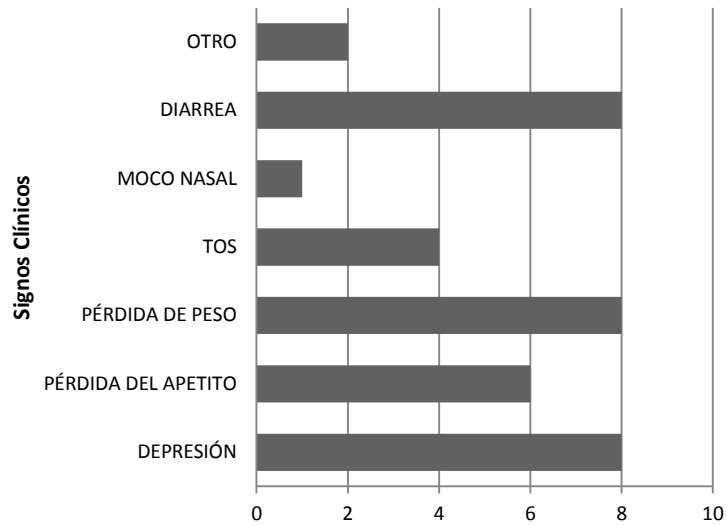


Figura 7.12. Perros con presentación reciente de signos clínicos

7.2 Resultados del examen físico

Setenta y tres perros fueron examinados, el cuadro 8 resume las alteraciones fisiológicas encontradas en los perros tras realizar una revisión rutinaria y evaluar las constantes fisiológicas (Cuadro 8).

Cuadro 8. Alteraciones observadas al examen físico

Alteración	Frecuencia	Porcentaje (%)
Condición corporal		
Sobrepeso	15	21.43
Bajo peso	12	17.14
Alteraciones en mucosas		
Ocular (irritación y secreción)	1	2.74
Vaginal (secreción)	2	4.88
Anal (irritación)	1	1.37
Campos pulmonares		
Ruidos pulmonares	3	4.11
Reflejo tusígeno positivo	5	6.94

Alteraciones en linfonodos

Los linfonodos evaluados al realizar el examen físico fueron: retrofaríngeos, submandibulares, preescapulares, subescapulares, inguinales y popíleos. Al evaluar la simetría y tamaño de los linfonodos, se encontró que 44 perros presentaban un aumento en el tamaño de sus linfonodos, unilateral o bilateralmente (Cuadro 9). El cuadro 12 (Anexo IV) muestra la alteración en linfonodos por individuo, algunos presentaban alteración en dos o más de los linfonodos evaluados al examen físico.

Cuadro 9. Alteración de linfonodos evaluados al examen físico

LINFONODO	Número de linfonodos aumentados de tamaño	Aumento Unilateral	Aumento Bilateral
Retrofaríngeos	5	3	2
Submandibulares	29	17	12
Preescapulares	8	7	1
Subescapulares	8	7	1
Inguinales	9	7	2
Popíleos	17	11	4
Total	44		

7.3 Pruebas Diagnósticas

7.3.1 Prueba de Tuberculina

El aumento de tamaño en la zona de inoculación en las orejas osciló de 1 a 13 mm al realizar la lectura a las 72 hrs post inoculación. Asimismo, pudieron observarse diferentes reacciones dérmicas como costras, induración y eritema.

De los 65 perros inoculados, 9 (13.85%) perros tuvieron una respuesta mayor a 5mm, la respuesta mayor la presentó sólo un individuo (1.37 %) con un aumento de 13 mm, el resto estuvo entre 6 a 9 mm (4 individuos, 5.48%). De los 56 que tuvieron una respuesta menor a 5 mm, 7 (10.77%) no tuvieron ninguna reacción dérmica, por lo que tampoco presentaron aumento en mm (0 mm) (Cuadro 10).

Con base en los resultados hechos en estudios anteriores (Parsons et al, 2012), se tomaron como positivos los perros que tuvieron una reacción mayor a 5 mm (9/65).

Cuadro 10. Aumento en milímetros tras la aplicación de la prueba de tuberculina en la población de perros del CAIT

Aumento en mm	Frecuencia	Porcentaje (%)
0	7	10.77
1	18	27.69
2	11	16.92
3	15	23.08
4	5	7.69
5	4	6.15
6	1	1.54
7	1	1.54
8	1	1.54
9	1	1.54
13	1	1.54
Total	65	100

7.3.2 Ensayo de liberación de Interferón gamma (IFN- γ).

Al realizar la estimulación de la sangre con antígenos micobacterianos, se puede observar que la producción de IFN- γ por individuo es diferente (Figura 7.13), teniendo índices de estimulación que oscilaron entre 1 y 33.

Con base en los resultados de Parsons *et al.*, 2012, se consideraron como positivos a los perros que tuvieran una concentración de IFN- γ mayor a 188 pg/ml. Treinta y seis (36/65, 55.38 %) de los perros tuvieron una concentración de IFN- γ que osciló entre 213 y 4,474.25 pg/ml. La media osciló entre los 1549 pg/ml (Figura 7.14)

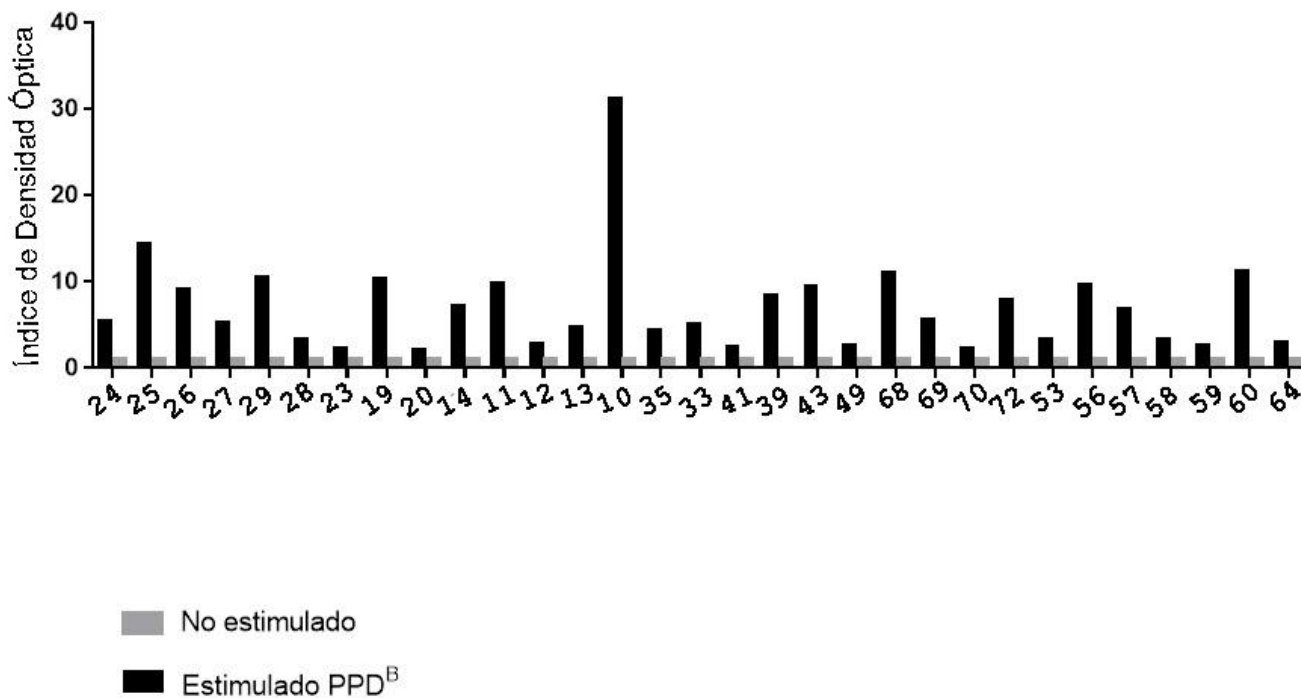


Figura 7.13. Índice de estimulación por individuo

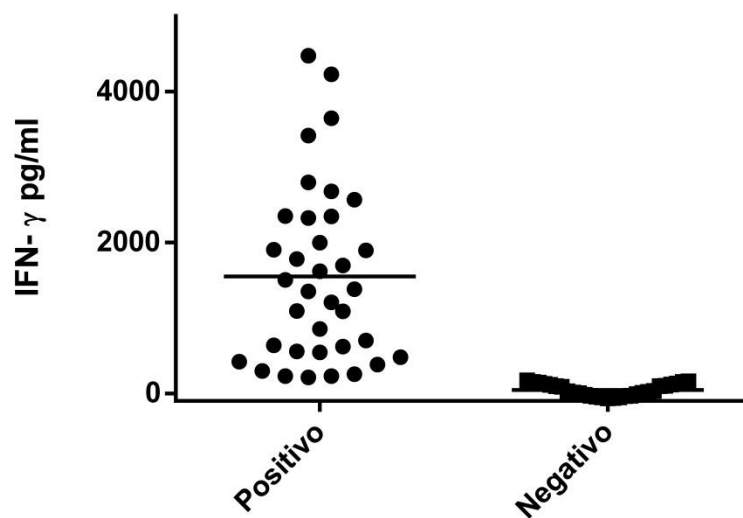


Figura 7.14. Concentración de IFN-γ de sangre de perro estimulada con PPD^B

Al comparar los resultados de ambas pruebas, no existe una correlación en los resultados ya que hubo animales que tuvieron una reacción menor a 5 mm, por lo tanto fueron considerados como negativos; mientras que se consideraron positivos en la prueba de IFN-γ (Anexo V).

7.4 Análisis bivariado

Se encontró una significancia estadística en las variables permanecer libre y deambular libremente por el establo, ya que este hábito de comportamiento de las mascotas permite un estrecho contacto con los animales enfermos, así como con un ambiente contaminado.

Los perros al permanecer libres en el establo, es decir que no estén amarrados, tienen 4.91 veces más la posibilidad de obtener un resultado positivo al realizar la prueba de interferón gamma (IC 95%), comparado con aquellos que no lo están. Mientras que el deambular libremente por el establo tienen 19.35 veces más la posibilidad de obtener un resultado positivo a dicha prueba (Cuadro 11).

Cuadro 11 Factores de riesgo de la población canina de los establos lecheros del CAIT (IFN- γ n=65).

Variable	Distribución n (%)	IFN- γ(+) (%)	RM (IC 95%)	P*
Permanece (libre)	52 (80.0)	30 (46.1)	4.91 (1.04-19.79)	0.026
Camina libre por el establo	40 (61.5)	29 (44.6)	19.35 (2.97 -64.32)	0.00

*Chi cuadrada de Pearson en variables categóricas
RIC= Rango inter-cuartílico (25%-75%)

7.5 Exámenes complementarios

7.5.1 Radiografías de Tórax

Cinco de los 19 perros (26.31%) a los que se les realizó la toma de radiografías fueron identificados como sospechosos. Los hallazgos indican una posible neumonía, siendo estos: patrón bronquial, patrón intersticial estructurado focal y posible lesión cavitada (Cuadro 12, imágenes 1-5).

Cuadro 12. Hallazgos radiográficos en la población canina del CAIT

ID	Sí	No	Sospechoso	Interpretación
70			X	Patrón bronquial y posible lesión cavitada
72		X		
68			X	Patrón intersticial estructurado focal
10		X		
19			X	Patrón bronquial
35		X		
33			X	Patrón bronquial
57		X		Posible obstrucción intestinal
53			X	Posible lesión cavitada
55		X		Gestante
49		X		
13		X		
14		X		
60		X		
25		X		
29		X		
69		X		
39		X		
12		X		

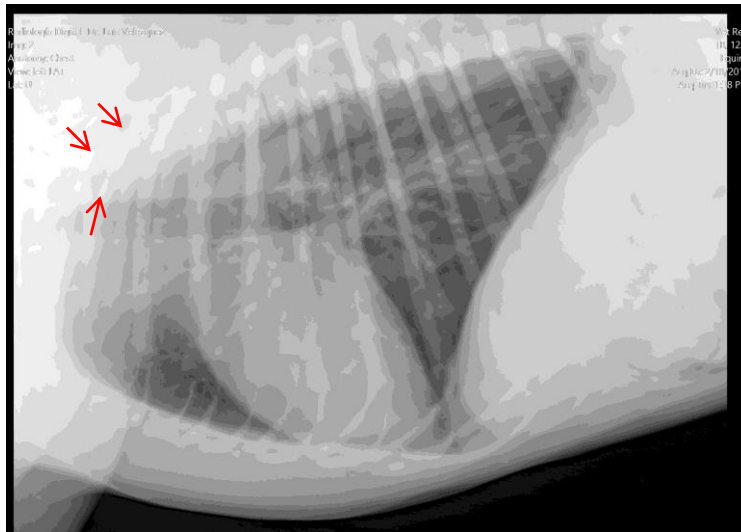


Imagen 1. (ID 70). Radiografía de tórax lateral izquierda-lateral derecha.
Las flechas señalan patrón bronquial y posible lesión cavitada.

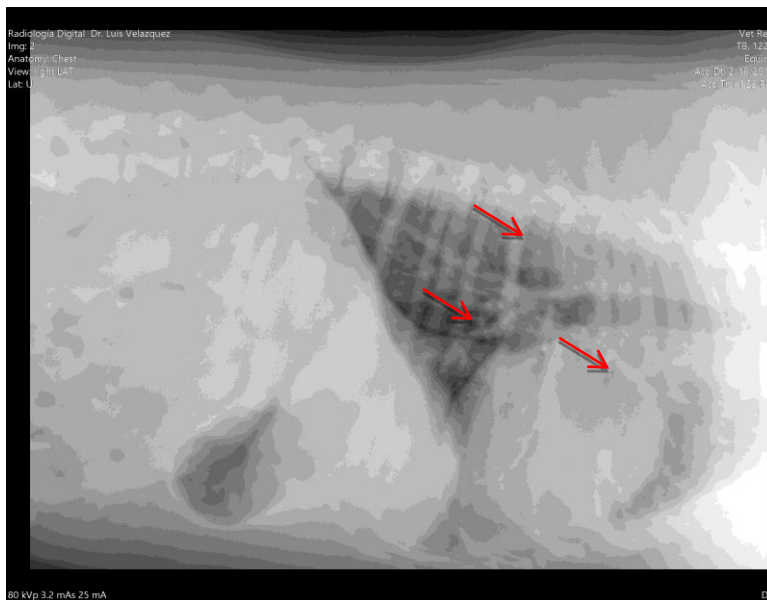


Imagen 2. (ID 68). Radiografía de tórax lateral derecha-lateral izquierda.
Las flechas señalan patrón intersticial estructurado focal.

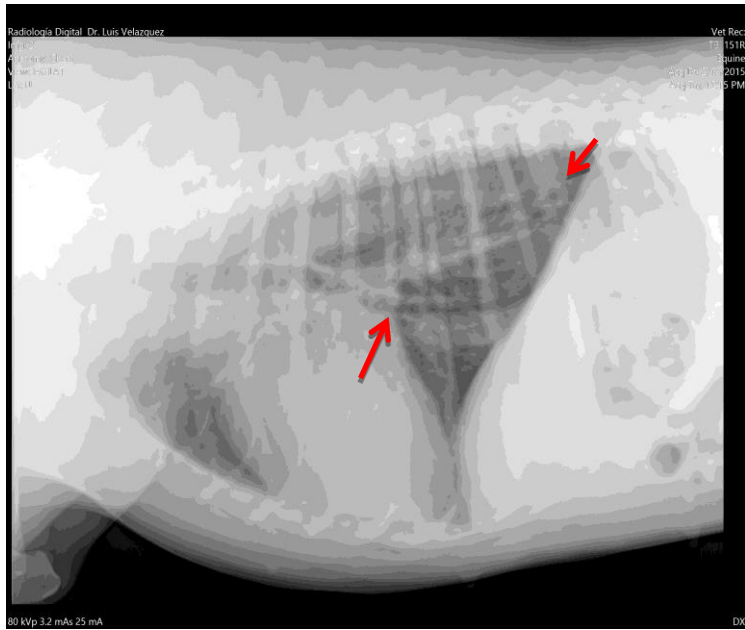


Imagen 3. (ID 19). Radiografía de tórax lateral izquierda -lateral derecha. Las flechas señalan patrón bronquial

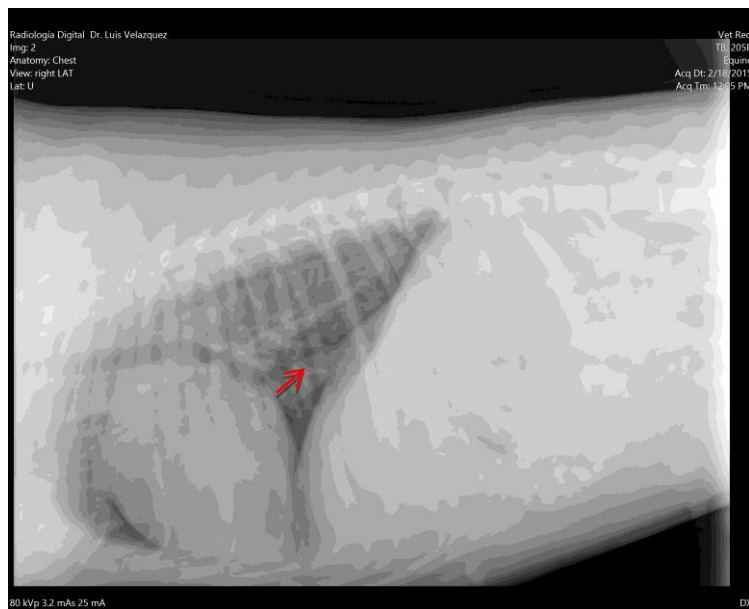


Imagen 4. (ID 53). Radiografía de tórax lateral derecha-lateral izquierda. Las flechas señalan posible lesión cavitada

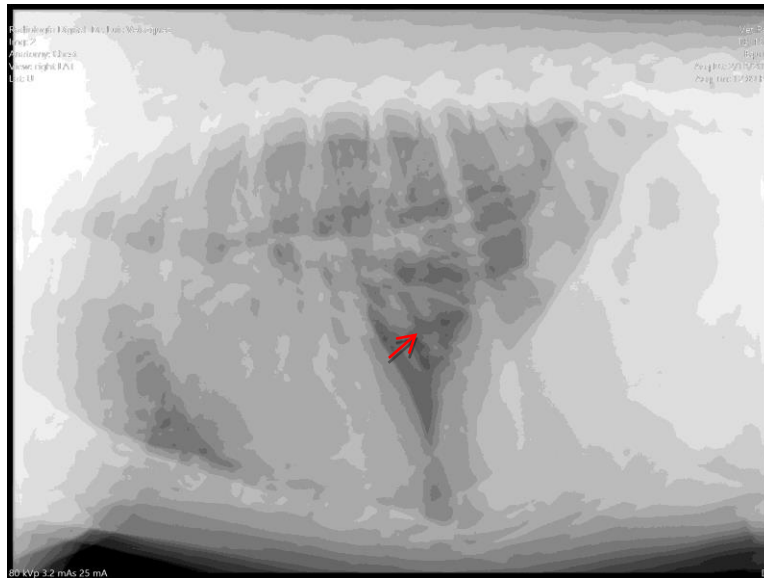


Imagen 5. (ID 33). Radiografía de tórax lateral derecha-lateral izquierda. Las flechas señalan patrón bronquial

7.5.2 Estudios *post mortem*

Especie canino, macho entero de aproximadamente 4 años de edad. Tenía acceso a todas las áreas del establo, con antecedente de consumo de leche bronca y placentas; los resultados a la prueba de tuberculina (7mm) y prueba de IFN- γ (1695.5 pg/ml) fueron positivos.

Hallazgos a la necropsia:

Inspección externa. Pelo hirsuto, sucio, con presencia de parásitos externos, pulgas.

El miembro pélvico izquierdo presentaba engrosamiento de la piel con nódulos alopecicos multifocales ulcerados de entre 5mm a 3 cm de diámetro, sin presencia de exudado de algún tipo.

Aparato respiratorio.

Lóbulos pulmonares con zonas multifocales de apariencia nodular blanca. Asimismo se observaron en los bordes de los lóbulos pulmonares zonas enfisematosas (Imágenes 6-8).

Aparato digestivo

Estómago: con restos de alimento, así como la presencia de una membrana posiblemente resto de placenta.

Intestinos: mucosa hemorrágica, con presencia de parásitos intestinales cuya morfología es consistente con el cestodo *Dipylidium caninum* y nematodos con morfología consistente con *Ancylostoma caninum*.

El resto de órganos examinados no presentaron ningún cambio morfológico aparente.

Histopatología

Neumonía intersticial multifocal, sin desarrollo de lesión granulomatosa clásica, así como zonas de enfisema (Imágenes 9 y 10).

Linfonodos mediastínicos reactivos (hiperplasia linfoide) (Imágenes 11 y 12). Con la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) se observan algunos macrófagos positivos (citoplasma rojo intenso) (Imagen 13).

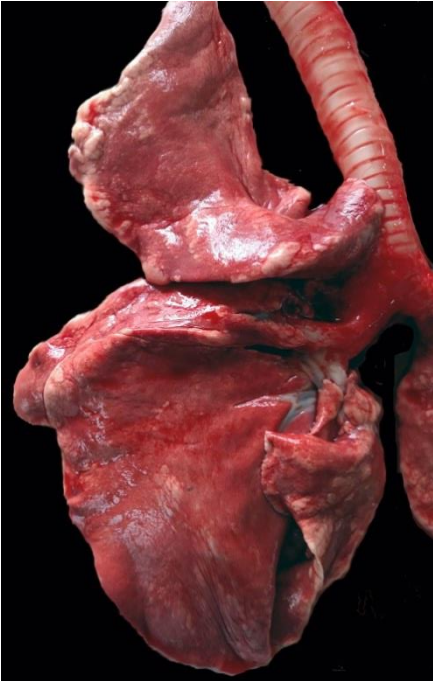


Imagen 6. Vista ventral de pulmón derecho. Se observan nódulos blancos en el parénquima pulmonar así como zonas enfisematosas en el borde del lóbulo pulmonar.



Imagen 7. Vista dorsal de pulmón derecho. Se observan múltiples nódulos de diferentes diámetros color blanco

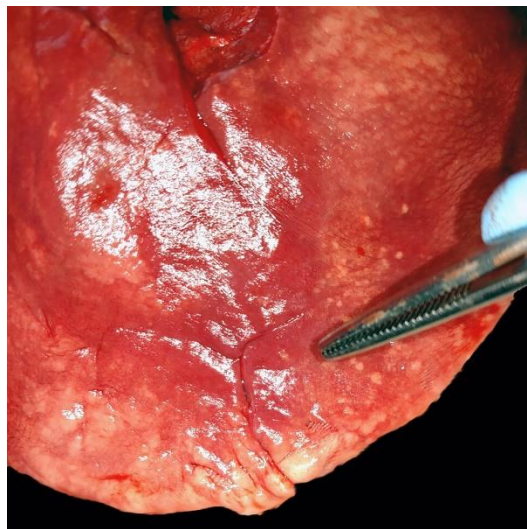


Imagen 8. Acercamiento, se aprecian nódulos blancos de diferentes diámetros.

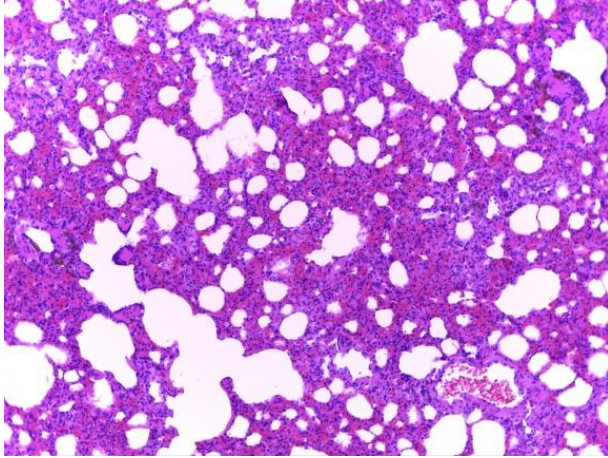


Imagen 9. Fotomicrografía de pulmón. Se observan septos alveolares engrosados (neumonía intersticial).Tinción H&E. 10x.

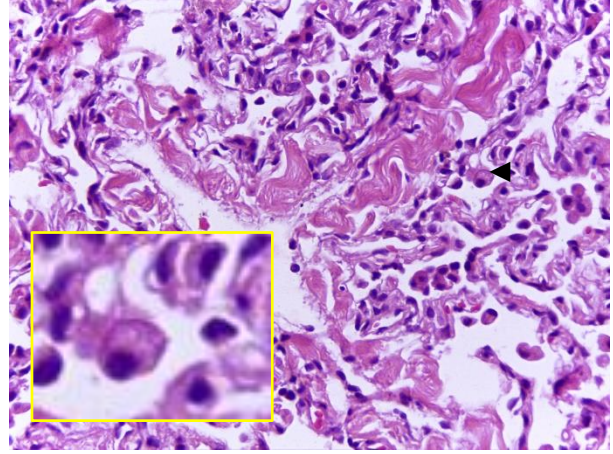


Imagen 10. Fotomicrografía de pulmón. La flecha señala un macrófago espumoso. Tinción H&E. 40X

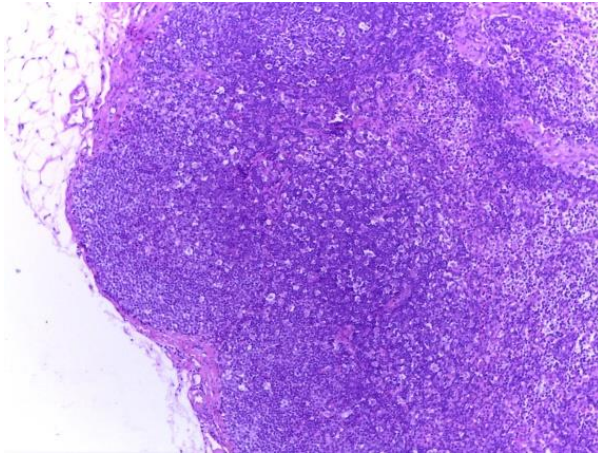


Imagen 11. Fotomicrografía de Linfonodo. Se observan abundantes células linfoides poblando la corteza del linfonodo (hiperplasia linfoide). Tinción H&E 10 x.

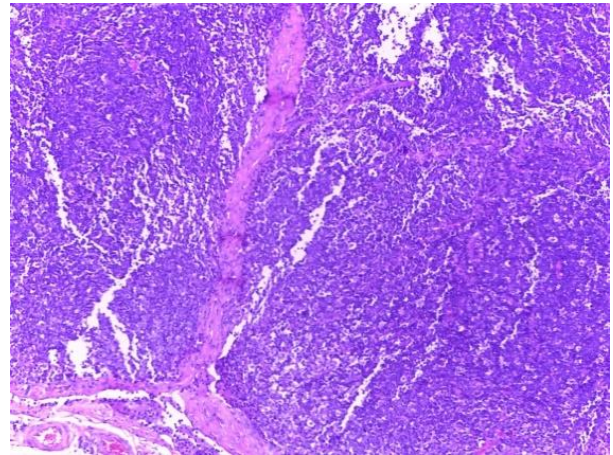


Imagen 12. Fotomicrografía de Linfonodo. Se observa aumento en la población de linfocitos en la corteza del órgano (hiperplasia linfoide). Tinción H&E 10 x.

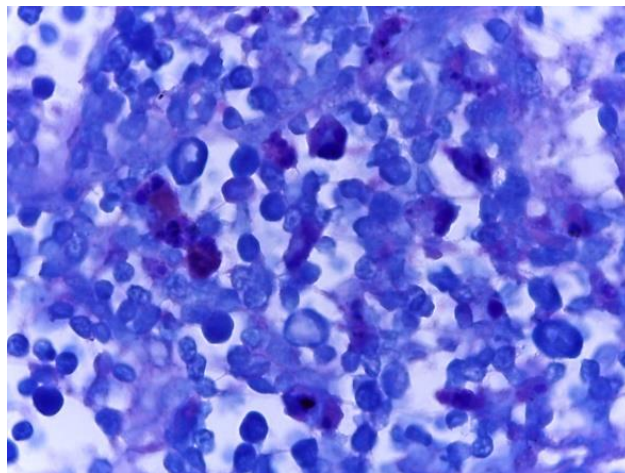


Imagen 13. Fotomicrografía de Linfonodo . Células mononucleares positivas con citoplasma rojo. Tinción ZN, 100x.

7.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa

Resultado de la PCR anidada realizada de los órganos obtenidos en la necropsia. Se observa la amplificación de los productos esperados en las muestras de pulmón y linfonodos retrofaríngeos, traqueobronquiales y mediastínicos (Figura 7.15).

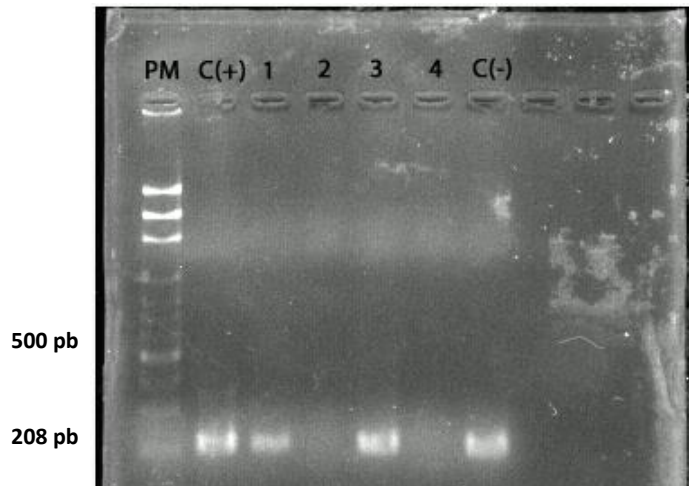


Figura 7.15. Resultados del PCR anidado para el gen *mpb70*. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Se observa en el primer carril el marcador de peso molecular (100 pb), Control positivo, 1. Pulmón, 2. Linfonodo (MES) + intestino, 3. Pulmón, 4. Linfonodos (RT, TRAQ, MED), Control negativo. RT=Retrofaríngeo; TRAQ=Traqueobronquial; MED=Mediastínico; MES=Mesentérico.

7.5.4 Resultados de Cultivo

No se observó crecimiento en los medios de cultivo inoculados.

8. DISCUSIÓN

Tras la implementación de la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina en México (NOM-031-ZOO-1995), se ha logrado disminuir considerablemente la prevalencia de la enfermedad, sin embargo, dicha prevalencia aún es del 16.5 % en cuencas lecheras (SENASICA). La presencia de otras especies en las unidades de producción representa un problema de salud pública no solo para el combate de la tuberculosis bovina sino para otras enfermedades, debido al potencial que poseen como reservorios de *M. bovis*. La infección con *M. bovis* en animales de vida silvestre ha sido documentada en varias partes del mundo como Europa, África, Asia, Australia, Nueva Zelanda y América, en poblaciones que se distribuyen alrededor de hatos infectados (Olsen, 2010), representando un problema en el control y erradicación de la enfermedad (Shrikrishna et al, 2009).

En el caso de perros y gatos, se tienen algunos informes en los que se ha confirmado la infección con *M. tuberculosis*, así como con *M. bovis*, ya sea por la convivencia con individuos infectados (humanos, bovinos o fauna silvestre) o infectados experimentalmente. (Aranaz et al, 1996; Erwin et al, 2004; Turinelli et al, 2004; Parsons et al, 2008; Burgt et al, 2009; Moravkova et al, 2011; Parsons et al, 2012; Broughan et al, 2013; Vitirito et al, 2013; Roberts et al, 2014).

En el presente estudio, tras la asociación del resultado de la prueba de IFN- γ con los hábitos de los perros identificados como factores de riesgo, se obtuvo una razón de momios (OR) de 4.91 para obtener un resultado positivo en la prueba de IFN- γ al permanecer libres (no estar amarrados) y un OR de 19.35 para obtener un resultado positivo en la prueba cuando deambulan libremente por el establo por lo tanto, estos resultados sugieren que los hábitos de las mascotas son un factor de riesgo importante para contraer la infección. Se sabe que los perros desempeñan un papel como hospedero incidental (*spillover host*) del *M. bovis*, la población canina del CAIT al convivir con los bovinos, podría infectarse y excretar la micobacteria, lo que representa un mayor problema para el control de la enfermedad en la cuenca; además del problema de salud pública que este representa ya que el perro es una posible fuente de infección para los humanos.

El análisis estadístico univariado, no determinó variables significativas ($p < 0.20$), sin embargo, hay que considerar la plausibilidad biológica que existe en varios hábitos de comportamiento que tienen los perros para que contraigan la infección, ya que en algunas especies, la infección se desarrollará tras el consumo de cadáveres con lesiones o restos de animales infectados (Olsen, 2010). Dichos hábitos de comportamiento son: el consumo de leche bronca, 146 perros (58.4%) consumen leche bronca, cuya frecuencia de consumo va de una, dos o tres veces a la semana, cada tercer día, dos veces al día o una vez al día. En lo que respecta a la convivencia con otras especies, se ha demostrado que los perros que conviven con pacientes tuberculosos contraen la infección (Parsons et al, 2012). En el presente estudio 66 perros del CAIT (56.9%) conviven con vacas por lo que se considera que es un factor de riesgo importante para que contraigan la infección. El consumo de restos de animales es también un hábito común en la población canina del CAIT que podría favorecer la

presentación digestiva de la enfermedad, ya que 71 perros (28.4%) consumen o han consumido restos de animales como: placentas, fetos, carne o vísceras, heces o fluidos.

Las heces son una fuente de contaminación y de transmisión de enfermedades, por eso es importante su manejo en las mascotas, ya que al estar a la intemperie, estas se deshidratan y se desintegran contaminando el ambiente. Asimismo se ha demostrado que las heces y orina de la fauna silvestre como tejones son fuente de contaminación del agua del ganado (Phillips *et al*, 2003), y si la micobacteria es excretada en grandes cantidades, las vacas pueden ingerirla contrayendo así la infección.

De acuerdo a las encuestas del presente estudio, 134 perros (53.6%) tienen una convivencia cercana o muy cercana con los humanos, la probabilidad de transmisión de la enfermedad de perros a humanos podría suceder si el perro se encuentra excretando la micobacteria. Existe evidencia de la transmisión de *M. bovis* de un gato a un humano en el Reino Unido (Roberts *et al*, 2014).

La metodología para la aplicación de la prueba de tuberculina en perros utilizada en este estudio fue la descrita por Greene (2012), con una modificación por facilidad de manejo (inoculación de 0.1 ml de PPD bovino en la cara externa de la oreja derecha, en lugar de la cara interna) a diferencia de lo descrito por Parsons *et al* (2012) cuyo sitio de aplicación fue en la piel del muslo en la parte medial, sin embargo, los resultados obtenidos, fueron similares, teniendo una reacción de 0 a 5 mm en la mayoría de la población (56 perros, 87.67%).

Snider *et al* (1975), al realizar la aplicación de tres diferentes tuberculinas (tuberculina estándar de mamíferos USDA, PPD y tuberculina vieja) obtuvo diferentes reacciones en los perros, en algunos casos teniendo resultados positivos con dos o los tres tipos de tuberculinas.

Se ha observado que el empleo de proteínas como ESAT-6 y CFP-10 mejoran la especificidad de la prueba de tuberculina, demostrando su utilidad ya que estas se encuentran ausentes en la mayoría de las micobacterias ambientales, no causan ninguna reacción en animales no infectados (Flores-Villalva, *et al*, 2012). Con los resultados obtenidos por Snider y lo observado por Flores, el uso de antígenos específicos de micobacterias patógenas para la prueba de tuberculina, podría resultar efectiva para la detección de perros infectados con la micobacteria.

De los estudios que se han realizado en perros, no se tiene bien establecido el sitio de aplicación, ni el punto de corte para considerar positivo o negativo a un animal. Se han utilizado diferentes sitios anatómicos para la aplicación de la tuberculina como: piel del tórax a la altura de la unión costochondral (Snider *et al*, 1975), cara medial de la piel del muslo (Snider *et al*, 1975; Parsons *et al*, 2012) y piel de la cara interna de la oreja (Greene, 2012); sin embargo, el perro tiene la facilidad de alcanzar estos sitios y rascarse, pudiendo interferir en el resultado de la prueba. Por lo tanto en el presente estudio se concluye al igual que Parsons *et al* (2012) que con la metodología descrita en estudios anteriores, la prueba de tuberculina es poco específica.

El uso de la prueba de IFN- γ como herramienta diagnóstica de la enfermedad, incrementa la detección de animales infectados en la fase temprana de la infección, en el caso bovinos, se puede tener un mayor número de animales positivos con respecto a la prueba de tuberculina, que muchas veces es inespecífica o no detecta a animales anérgicos o en las fases en la que la respuesta inmune es de tipo Th2 (De la Rúa-Domenech *et al*, 2006).

A pesar de que la prueba de IFN- γ para perros no establece un punto de corte a partir del cual puedan ser considerados positivos o negativos, con base en los resultados de Parsons *et al* (2012), pudimos detectar 33 animales positivos a la prueba (concentración de IFN- γ > 198 pg/ml); mientras que con la prueba de tuberculina únicamente detectamos 9 animales positivos (\geq 5 mm). A pesar de estas diferencias en los resultados de las pruebas, tenemos evidencia de que los perros poseen células de memoria hacia antígenos micobacterianos. A pesar de que algunos autores (Parsons *et al*, 2012), sugieren que la prueba de tuberculina es ineficaz, es posible detectar animales positivos mediante la prueba de IFN- γ , por lo que sería importante establecer un punto de corte de ambas pruebas en perros para una detección eficiente de animales infectados, ya sea que cohabiten con bovinos o humanos tuberculosos, en ambos casos, estos representan un problema de salud pública.

La radiología como método de diagnóstico de tuberculosis es comúnmente utilizada en el humano, debido a la naturaleza de las lesiones tuberculosas, estas pueden ser observadas como estructuras radiopacas en los lóbulos pulmonares. El estudio radiográfico en perros, podría ser una prueba de diagnóstico complementaria cuando los animales muestren signos clínicos de enfermedad respiratoria. Al respecto en el presente estudio se llegó a la conclusión de que los perros positivos a las pruebas inmunológicas cursaban con algún tipo de neumonía, sin embargo, debido a que ninguna apariencia radiológica es patognomónica de tuberculosis, para llegar a un diagnóstico definitivo, es necesario realizar las diferentes pruebas diagnósticas disponibles.

Los hallazgos a la necropsia del perro que murió durante el estudio fueron: lesiones nodulares blancas multifocales en pulmón y a la histopatología se pudo observar neumonía intersticial multifocal. Dichas lesiones no lucían como los granulomas comúnmente observados en bovinos, sin embargo, en ratones se ha documentado que la infección con cepas de *M. bovis* con diferente virulencia producen diferentes grados de lesión pulmonar, encontrando zonas focales de neumonía con cepas atenuadas, hasta neumonía de moderada a severa con zonas de necrosis, así como inflamación perivascular con cepas virulentas (Aguilar-León *et al*, 2009). Por otro lado Roadhes *et al* (1997) demostraron que algunos de los ratones infectados con *M. bovis* desarrollan neumonía intersticial y de acuerdo a la virulencia de la cepa se desarrollará una lesión grave o moderada. En el caso de los perros, se ha documentado que las lesiones histopatológicas son muy variadas, encontrando desde neumonía intersticial hasta lesiones granulomatosas clásicas en diferentes órganos, por lo tanto se sugiere que la presentación de lesiones en el perro podría no ser similar a las lesiones de tuberculosis en los bovinos pero si similar a la neumonía intersticial descrita en los ratones.

El estado inmunológico, el estado nutricional y el estrés de un perro podrían jugar un papel determinante para la presentación de enfermedades y lesiones no sólo para la tuberculosis si no para otras enfermedades que

comúnmente afectan al perro. El manejo de medicina preventiva de la población canina del CAIT, únicamente abarca la vacunación anual contra la rabia, así como desparasitación mínimo cada seis meses. En gatos se ha asociado que la presentación de tuberculosis se ve favorecida por la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia felina (Abalos y Rematal, 2004); por lo tanto, la presentación de enfermedades virales inmunosupresoras en los perros, podrían favorecer la presentación de infecciones bacterianas secundarias. Esto sumado a los factores que ya se discutieron anteriormente, podrían favorecer la infección con micobacterias en esta población.

De acuerdo con la guía para el seguimiento epidemiológico de la tuberculosis bovina (SENASICA, 2015), la eliminación del problema de un hato se resuelve con la despoblación total en hatos con prevalencias menores al 10% probar y eliminar a los reactivos; así como bioseguridad, manejo adecuado del hato infectado y cumplimiento de los protocolos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, una de las propuestas para evitar una diseminación mayor de la enfermedad dentro de la cuenca lechera, tanto en la población canina como en la población de bovinos y humana, sería reducir la población de perros que conviven con los bovinos y llevar un mejor control en la población bovina. Una de las acciones que se llevan a cabo en el Reino Unido desde el 2006 como medida de control de la enfermedad, es el reporte obligatorio de mascotas enfermas de tuberculosis, una medida de este tipo en nuestro país podría ser implementada, por el problema de salud pública que esta representa.

9. CONCLUSIONES

La convivencia cercana de los perros con bovinos expuestos naturalmente a *M. bovis*, así como los hábitos de los mismos son un factor de riesgo para contraer la infección.

La prueba de IFN- γ , es un método de diagnóstico de tuberculosis confiable en perros.

Mycobacterium bovis se encuentra presente en la población canina que cohabita con bovinos.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Beck, A. The human-Dog Relationship: A tale of two species. En Macpherson CN, Meslin FX, Wandeler AI. Dogs, Zoonoses and Public Health. 2nd ed. Boston USA: CAB International, 2013.
2. Situación actual de la Tuberculosis Bovina en México. SENASICA, 2015. Disponible en <http://www.senasica.gob.mx/?id=4369>.
3. Shrikrishna D, De la Rúa-Domenech R, Smith NH, Colloff A, Coutts I. Human and canine *Mycobacterium bovis* infection in the same household: re-emergence of an old zoonotic threat?. Thorax 2009; 64: 89-91.
4. O'Reilly LM, Darbon CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. Tuber Lung Dis 1995, 76 Supl 1: 1-46.
5. Chomel B, Arzt J. Dogs and Bacterial Zoonoses. En Macpherson CN, Meslin FX, Wandeler AI. Dogs, Zoonoses and Public Health. 2nd ed. Boston USA: CAB International, 2013.
6. Norma Oficial Mexicana NOM 031 ZOO 1995, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*).
7. Schiller I, RayWaters W, Vordermeier M, Jemmi T, Welsh M, *et al.* Bovine tuberculosis in Europe from the perspective of an officially tuberculosis free country: Trade, surveillance and diagnostics. Vet Microbiol 2011; 151: 153-159.
8. Parsons SD, Warren RM, Ottenhoff TH, Gey van Pittius NC, van Helden PD. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in dogs in a high-risk setting. Res Vet Sci 2012; 92(3): 414-419.
9. Daniel, TM. The History of tuberculosis. Respir Med 2006; 100: 1862- 1870.
10. Ledermann W. La tuberculosis antes del descubrimiento de Koch. Rev Chil Infectol. Edición aniversario 2003:46-47.
11. Moreno Altamirano L. Desde las fuerzas mágicas hasta Roberto Koch: Un enfoque epidemiológico de la Tuberculosis. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 2004; 17(2):117-125.
12. Abalos P, Retamal P. Tuberculosis: ¿una zoonosis re-emergente? Rev sci tech Off Int Epiz 2004; 23 (2): 583-594.
13. Tuberculosis. Nota descriptiva N° 104. Marzo de 2015. Organización Mundial de la Salud. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>.
14. Herrera-León L, Pozuelo-Díaz R, Molina-Moreno T, Valverde-Cobacho A, Saiz-Vega P, Jiménez-Pajares MS. Aplicación de métodos moleculares para la identificación de las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2009; 27(9): 496-502.
15. Bautista Rincón I. "Distribución espacial de perros y gatos como un factor de riesgo en la transmisión de *Mycobacterium bovis* en el Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, Hidalgo" (Tesis de Licenciatura). Distrito Federal, México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2011.

16. Broughan J.M, Downs SH, Crawshaw TR, Upton PA, Brewer J, Clifton-Hadley RS. *Mycobacterium bovis* infections in domesticated non-bovine mammalian species. Part 1: Review of epidemiology and laboratory submissions in Great Britain 2004–2010. *Vet J* 2013; 198: 339–345.
17. Palmer MV, Thacker TC, RayWaters W, Gortázar C, Corner AL. *Mycobacterium bovis*: a model pathogen at the interface of livestock, wildlife, and humans. *Vet Med Int* 2012; 2012: 1-17.
18. Thoen CO, Barletta RG. *Mycobacterium*. En: Gyles C, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO, editores. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Iowa: Blackwell Publishing, 3rd edition, 2004: 69-76.
19. Pfyffer GE, Palicova F. *Mycobacterium*: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. En Jorgensen JH, Pfaller MA. Chief editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC: ASM Press, 11th edition, 2011.
20. Thoen CO, Steele JH, Gilsdorf MJ. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Iowa: Blackwell Publishing, 2006.
21. Olsen I, Barletta RG, Thoen CO. *Mycobacterium*. En: Gyles C, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO, editores. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Iowa: Blackwell Publishing, 2010: 113-132.
22. Pollock JM, Neill SD. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet J* 2002; 163: 115-127.
23. Pieters J. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes infect* 2001; 3: 249-255.
24. Tuberculosis and other Mycobacterial Infections. The Merck Veterinary Manual Disponible en: http://www.merckvetmanual.com/mvm/generalized_conditions/tuberculosis_and_other_mycobacterial_infections/overview_of_tuberculosis_and_other_mycobacterial_infections.html
25. Aranday-Cortes E, Bull NC, Villarreal-Ramos B, Gough J, Hicks D *et al*. Upregulation of IL-17A, CXCL9 and CXCL10 in Early-Stage Granulomas Induced by *Mycobacterium bovis* in Cattle. *Transbound Emerg Dis* 2013; 60 (6): 525-537.
26. Pollock JM, Welsh MD, McNair J. Immune responses in bovine tuberculosis: Towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Vet Immunol Immunopatol* 2005; 108: 37–43.
27. Winthrop KL, Scott J, Brown D, Jay MT, Rios R, Mase S, Richardson D, Edmonson A, MacLean M, Flood J. Investigation of human contacts: a *Mycobacterium bovis* outbreak among cattle at a California dairy. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005, 9(7): 809–813.
28. De la Rúa- Domenech R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 2006, 86: 77–109.
29. Torres-González P, Soberanis-Ramos O, Martínez-Gamboa A, Chávez-Mazari B, Barrios-Herrera MT, *et al*. Prevalence of Latent and Active Tuberculosis among Dairy Farm Workers Exposed to Cattle Infected by *Mycobacterium bovis*. *PLOS Negl Trop Dis* 2013, 7(4): e2177.
30. Proyecto de Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM 031 ZOO 1995, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*).
31. Casas RS, Alcaide FVF, Santín CM. Alternativas a la Prueba de Tuberculina. *Pneuma* 2007: 9; 34-37.

32. Tizard IR. Veterinary Immunology an Introduction. 8th ed. España: Elsevier, 2009; 369-374.
33. Ettinger SJ, Feldman EC. Tratado de Medicina Interna Veterinaria: Enfermedades del perro y del gato. 6ª ed. España: Elsevier, 2007; 875-881.
34. Greene C. Infectious Diseases of the Dog and Cat. 4 th ed. USA: Elsevier, 2012; 495-509.
35. De la Rúa-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. Res Vet Sci 2006; 81(2): 190–210.
36. Corner LAL; Gormley E, Pfeiffer DU. Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: Conditions for maximising the number of positive controls. Vet Microbiol 2012, 156: 162-171.
37. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Normas y Guía Técnica. 2008.
38. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of THE CELL. 5th ed. USA: Garland Science, 2008.
39. Aranaz A., Liébana E., Pickering X., Novoa C., Mateos A., Domínguez L. Use of polymerase chain reaction in the diagnosis of tuberculosis in cats and dogs. Vet Rec 1996; 138: 276-280.
40. Serpell J. The Domestic Dog: Its Evolution, Behaviour and Interactions with People. Cambridge UK: Cambridge University Press, 1995.; 8-16, 162-174.
41. Vilà C, Savolainen P, Maldonado JE, Amorim IR, Rice JE, Honeycutt L, et al. Multiple and Ancient Origins of the Domestic Dog. Science 1997; 276 (5319): 1687-1689.
42. Macpherson CN, Meslin FX, Wandeler AI. Dogs, Zoonoses and Public Health. 2nd ed. Boston USA: CAB International, 2013; 4, 5, 91, 97, 98.
43. Snider WR, Cohen D, Reif JS, Stein SC, Prier JE Tuberculosis in Canine and Feline Populations Study of High Risk Populations in Pennsylvania, 1966-1968. Am Rev Respir Dis 1971; 104(6):866-76.
44. Wilkins MJ, Bartlett PC, Berry DE, Perry RL, Fitzgerald SD, Bernardo TM, Thoen CO, Kaneene JB. Absence of *Mycobacterium bovis* infection in dogs and cats residing on infected cattle farms: Michigan, 2002. Epidemiol Infect 2008; 136(12):1617-1623.
45. Erwin PC, Bemis DA, McCombs SB, Sheeler LL, Himelright IM, Halford SK, Diem L, Metchock B, Jones TF; Schilling MG, Thomsen BV. *Mycobacterium tuberculosis* transmission from human to canine. Emerg Infect Dis. 2004; 10 (12): 2258-2260.
46. Turinelli V, Ledieu D, Guilbaud L, Marchal T, Magnol JP, Fournel-Fleury C. *Mycobacterium tuberculosis* infection in a dog from Africa. Vet Clin Pathol 2004; 33(3):177-181.
47. Parsons SD, Gous TA, Warren RM, van Helden PD. Pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* (Beijing strain) infection in a stray dog. J S Afr Vet Assoc. 2008; 79(2): 95–98.
48. . Van der Burgt GM, Crawshaw T, Foster AP, Denny DJ, Schock A, *Mycobacterium bovis* infection in dogs. Vet Rec. 2009; 165(21): 634.

49. Moravkova M, Slany M, Trcka I, Havelkova M, Svobodova J, Skoric M, Heinigeova B, Pavlik I. Human-to-human and human-to-dog *Mycobacterium tuberculosis* transmission studied by IS6110 RFLP analysis: a case report. *Veterinari Medicina* 2011; 56 (6): 314–317
50. Vitirito Martinho A, Junqueira Franco M, Garcia Ribeiro M, Mutt Perrotti I, Henriques Mangia S *et al.* Case Report: Disseminated *Mycobacterium tuberculosis* Infection in a Dog. *Am J Trop Med Hyg* 2013; 88(3): 596-600.
51. Roberts T., O'Connor C, Nuñez-Garcia J, de la Rúa -Domenech R., Smith NH. Unusual cluster of *Mycobacterium bovis* infection in cats. *Vet Rec* 2014; 174 (13): 326.
52. Snider WR, Cohen D, Reif JS, Stein SC, Prier JE Tuberculin Sensitivity in a High Risk Canine Population. *American Journal of Epidemiology* 1975; 142(2):185-190.
53. Phillips CJ, Foster CR, Morris PA, Teverson R. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Res Vet Sci* 2003; 74(1): 1–15.
54. Flores-Villalva S, Suárez-Güemes F, Espitia C., Whelan AO., Vordermeier M, Gutiérrez-Pabello JA. Specificity of the Tuberculin Skin Test Is Modified by Use of a Protein Cocktail Containing ESAT-6 and CFP-10 in Cattle Naturally Infected with *Mycobacterium bovis*. *Clin Vaccine Immunol* 2012; 19(5): 797–803.
55. Aguilar León D, Zumárraga MJ, Jiménez Oropeza R, Gioffré AK, Bernardelli A, Orozco Estévez H, Cataldi AA, Hernández Pando R. *Mycobacterium bovis* with different genotypes and from different hosts induce dissimilar immunopathological lesions in a mouse model of tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 2009; 157(1): 139–147.
56. Rhoades ER, Frank AA, Orme IM. Progression of chronic pulmonary tuberculosis in mice aerogenically infected with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle and Lung Disease* 1997; 78(1): 57-66.

11. ANEXOS

Anexo I



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



Censo de Población Canina del CAIT

Fecha: _____

Folio: _____

Establo	Coordenadas		
	W		N
Nombre del entrevistado		Cargo en el establo	

¿Existen perros en el establo? Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Edad de los perros		Número de perros	
	Adulto	Menor de 7 años <input type="checkbox"/> Mayor a de 7 años <input type="checkbox"/>	Total	
	Cachorro		Hembras	
		Machos		
¿Los perros deambulan libremente por el establo?	¿Tienen acceso a otros establos?		En este establo, ¿Ingresan animales de otros establos?	
Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	
			¿Qué animales ingresan?	

Anexo II



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Cuestionario de Salud General Población Canina del CAIT



Establo

Fecha

Folio

Nombre del entrevistado

Actividad que realiza en el establo

DATOS DEL PERRO

Nombre

Raza

Edad

Sexo

 M H

Señas Particulares

Lugar de origen de su mascota

Hidalgo, Tizayuca, CAIT (Otro Establo o Casa), Otro Estado o País

Adquisición

Mercado, Particular, Adopción, Regalo, Llegó solo

¿Convive con otros animales? Especificar

 SÍ NO

Castrado/OVH

 SÍ NO

Reproducción

 SÍ NO

No camadas

Agresivo Personas

 SÍ NO

Agresivo Animales

 SÍ NO

Alimentación

Croqueta
Alimento enlatado
Restos de comida

Frecuencia Alimentación

Una vez al día
Dos veces al día
Tres veces al día

Frecuencia de baño

Cada semana
Cada mes
Cada seis meses
Nunca

¿Con qué se baña?

Jabón de perro
Shampoo de perro
Jabón/Shampoo otro

Función Zootécnica

Compañía, Trabajo, Guardia

Atención Médica Veterinaria

1. ¿Considera a su mascota un miembro más de su familia?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
2. ¿Su mascota ha recibido alguna vez atención médica veterinaria?	<input type="checkbox"/> No, nunca <input type="checkbox"/> De pequeño <input type="checkbox"/> Hace un año o menos <input type="checkbox"/> Hace más de un año <input type="checkbox"/> No lo sabe
3. Desde que usted tiene a su mascota, ¿ha enfermado alguna vez?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe
4. De las siguientes opciones, ¿Qué acción realizó para curarlo?	<input type="checkbox"/> Llevarlo al MVZ <input type="checkbox"/> Le dio medicina de la que tenía <input type="checkbox"/> Nada
5. ¿Vacuna o ha vacunado alguna vez a su mascota? 6. ¿QUE TIPO DE VACUNA APLICÓ?	<input type="checkbox"/> Sí, de cachorro <input type="checkbox"/> Sí, cada año <input type="checkbox"/> Hace más de un año <input type="checkbox"/> Hace seis meses <input type="checkbox"/> Hace menos de seis meses <input type="checkbox"/> No lo sabe <input type="checkbox"/> Nunca
7. ¿Desparasita o ha desparasitado alguna vez a su mascota?	<input type="checkbox"/> Sí, de cachorro <input type="checkbox"/> Sí, cada 6 meses/cada año <input type="checkbox"/> Hace más de un año <input type="checkbox"/> Hace un año o menos <input type="checkbox"/> No lo sabe <input type="checkbox"/> Nunca
8. Quién aplica los medicamentos o vacunas a su mascota?	<input type="checkbox"/> Usted <input type="checkbox"/> Su veterinario

Comportamiento

9. Su mascota permanece la mayor parte del tiempo:	<input type="checkbox"/> Libre <input type="checkbox"/> Amarrado <input type="checkbox"/> Amarrado en el día, suelto por las noches <input type="checkbox"/> Suelto en el día, amarrado por las noches
10. ¿Su mascota camina libremente por el establo?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
11. ¿En qué áreas del establo puede estar su mascota?	<input type="checkbox"/> Todo el establo <input type="checkbox"/> Casa <input type="checkbox"/> Corrales <input type="checkbox"/> Becerreras <input type="checkbox"/> Almacén de alimentos <input type="checkbox"/> Sala de ordeña
12. Si su mascota ingresa a la ordeña, ¿puede hacerlo durante la misma?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
13. ¿Su mascota sale del establo?	<input type="checkbox"/> Sí a otros establos <input type="checkbox"/> Sí en las calles únicamente <input type="checkbox"/> Si, sólo cuando lo saca usted <input type="checkbox"/> No, nunca
14. ¿Qué tan cercana es la convivencia de su mascota con las personas del establo o su	<input type="checkbox"/> Nula <input type="checkbox"/> Poca <input type="checkbox"/> Cercana <input type="checkbox"/> Muy cercana Especifique: _____

familia?	
¿Qué tan estrecho es el contacto con su mascota?	<input type="checkbox"/> Ninguno <input type="checkbox"/> Permite que lo lama <input type="checkbox"/> Lo acaricia algunas veces <input type="checkbox"/> Duerme con él
15. ¿Dónde duerme su mascota?	<input type="checkbox"/> Dentro de la casa <input type="checkbox"/> En los corrales <input type="checkbox"/> En alguna habitación del establo (oficina, almacén alimentos, sala de ordeño) <input type="checkbox"/> No lo sabe
16. ¿Sabe dónde defeca su mascota?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> No
17. ¿En qué lugar ha visto que defeca su mascota?	<input type="checkbox"/> En los corrales <input type="checkbox"/> En la sala de ordeña <input type="checkbox"/> Afuera de la casa <input type="checkbox"/> No sabe <input type="checkbox"/> En la bodega de alimentos <input type="checkbox"/> otro
18. ¿Qué hace con las heces de su mascota?	<input type="checkbox"/> Las recoge <input type="checkbox"/> Ahí las deja

Alimentación

19. ¿Su mascota tiene plato propio para comer?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
20. ¿Su mascota tiene plato propio de agua para beber?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
21. ¿Cuál es el origen del agua que le proporciona a su mascota?	<input type="checkbox"/> De la llave <input type="checkbox"/> De los bebederos del ganado <input type="checkbox"/> De pozo <input type="checkbox"/> Donde la encuentre <input type="checkbox"/> No sabe
22. ¿Su mascota consume o ha consumido leche bronca o sin hervir?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
23. ¿En qué etapa de su vida la consumió?(la leche bronca)	<input type="checkbox"/> De cachorro <input type="checkbox"/> Toda su vida <input type="checkbox"/> Alguna vez en su vida <input type="checkbox"/> Otro: _____
24. ¿Con que frecuencia consume la leche bronca?	<input type="checkbox"/> Cada vez que se ordeña <input type="checkbox"/> Una vez a la semana <input type="checkbox"/> Una vez al día
25. ¿Su mascota consume o ha consumido restos de animales?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No sabe <input type="checkbox"/> No
26. ¿Qué restos consume o ha consumido?	<input type="checkbox"/> Placenta <input type="checkbox"/> Ratas <input type="checkbox"/> Fetos <input type="checkbox"/> Carne o vísceras <input type="checkbox"/> Heces <input type="checkbox"/> Fluidos (sangre, líquidos del parto)

Estado de salud actual

27. ¿Ha notado alguno de los siguientes signos en su mascota últimamente?	<input type="checkbox"/> Depresión <input type="checkbox"/> Diarrea <input type="checkbox"/> Pérdida del apetito <input type="checkbox"/> Diarrea con sangre <input type="checkbox"/> Pérdida de peso <input type="checkbox"/> Distensión del
---	---

	<input type="checkbox"/> Tos <input type="checkbox"/> Dificultad para respirar <input type="checkbox"/> Moco nasal	abdomen <input type="checkbox"/> Otro: _____
--	--	---

28. ¿Ingresan perros u otros animales de otros establos a este establo?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	
29. ¿Qué animales ingresan al establo?	<input type="checkbox"/> Perros <input type="checkbox"/> Gatos <input type="checkbox"/> Borregos	<input type="checkbox"/> Cerdos <input type="checkbox"/> Conejos <input type="checkbox"/> Otro: _____

Observaciones

Anexo III



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



Examen Físico General

Perros en el Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, Hidalgo (CAIT)

Establo	Identificación	Sexo	Edad	No. _____
	Raza	Fecha		

Examen Físico General

CONSTANTES

Antecedentes _____

Actitud General: _____ Condición general: _____ Elasticidad de la piel: _____

Frec. Respiratoria: _____/min. Frec. Cardíaca: _____/min. Temperatura: _____ °C

Deshidratación: _____% TLLC: _____seg. Peso: _____kg.

MUCOSAS

Oral: _____ Nasal: _____ Ocular: _____ Prepuccial: _____ Vaginal: _____ Anal: _____

GANGLIOS LINFÁTICOS

Retrofaríngeos: _____ Submandibulares: _____ Pre escapulares: _____

Subescapulares: _____ Inguinales: _____ Poplíteos: _____

Reflejo deglutorio: Sí No Reflejo tusígeno: (+) (-) Tráquea: _____

Campos pulmonares: _____ Ritmo cardíaco: _____

VÁLVULAS

Pulmonar: _____ Aórtica: _____ Mitral: _____ Tricúspide: _____

Abdomen: _____

Piel: _____

Pelo: _____

OTROS

HALLAZGOS:

Toma de muestras

Contención	
Fármaco y dosis utilizada	

Muestras colectadas		
Tipo de muestra	Sí/No	Características
Sangre		
Heces		
Exudado nasal		

Prueba PPD	Resultado	
	Inicial	Final

Anexo IV

Cuadro 13. Alteración en linfonodos por individuo

ID	RAZA	SEXO	EDAD	LINFONODOS					
				Retrofaríngeos	Sub mandibular	Pre escapular	Sub escapular	Inguinal	Poplíteo
1	Criollo	H		N	N	N	N	N	N
2	Criollo	M		N	N	N	N	N	N
3	Criollo	M		N	N	N	N	N	N
4	Criollo	H	15	N	↑ DER	N	N	N	N
5	Criollo	H	6	N	N	N	N	N	N
6	Chihuahua	H	2	N	↑ 2	N	N	N	N
7	Chihuahua	M	4	N	N	N	N	N	N
8	Cruza cocker	H	7	N	N	N	N	N	N
9	Ganadero australiano	M		N	N	N	N	N	N
10	Ganadero Australiano	M	11	N	↑ IZQ	N	N	↑ IZQ	↑ IZQ
11	Ratonero	M		N	N	N	N	N	N
12	Pitbull	H		N	N	↑ IZQ	N	N	N
13	Criollo	M	7M	N	N	↑ IZQ	N	N	N
14	Weimaraner	H		N	N	N	N	N	↑ IZQ
15	Chihuahua	M	6	N	↑ IZQ	N	N	N	N
16	Pastor belga	H		N	N	N	N	N	N
17	Criollo	M	7M	N	N	↑ IZQ	N	N	N
18	Ganadero Australiano	H		N	↑ IZQ	N	N	N	↑ DER
19	Ganadero Australiano	H		N	N	N	N	N	↑ DER
20	Cruza collie	M		N	N	N	N	N	N
21	Poodle	H		↑ IZQ	N	N	N	N	N
22	Chihuahua	H		N	N	N	N	N	N
23	Ganadero australiano	M	1.4	N	N	N	N	N	N
24	Ganadero australiano	H	2	N	N	N	N	N	N
25	Criollo	M	2	N	N	N	N	N	N
26	Pastor Alemán	M	10 M	N	N	↑ DER	N	N	N
27	Criollo	H	7 m	N	N	N	N	N	N
28	Criollo	H		N	N	N	N	↑ 2	↑ 2
29	Criollo	H	5	N	N	N	N	N	↑ 2

30	Bóxer	M		N	N	N	N	N	N
31	Bóxer	H	5m	N	N	N	N	N	N
32	Bóxer	H		N	N	N	N	N	N
33	Dálmata	H		N	N	N	N	N	N
34	Bóxer	H		N	N	N	N	N	N
35	Dálmata	M		↑ IZQ	N	N	N	N	N
36	Schnauzer	H		↑ IZQ	N	N	N	N	N
37	Criollo	M	1	N	↑ 2	↑ IZQ	N	N	N
38	Criollo	M	1	N	↑ DER	N	N	N	N
39	Criollo	M	1	N	↑ DER	N	N	↑ IZQ	↑ DER
40	Criollo	H	6M	N	↑ 2	N	N	↑ IZQ	N
41	Criollo	H	2	N	↑ DER	N	N	N	N
42	Criollo	M	6M	N	↑ DER	N	N	N	N
43	San Bernardo	M	3	N	N	N	N	N	N
44	Criollo	H		N	N	N	N	N	N
45	Criollo	H	6m	N	N	N	N	N	N
46	Criollo	M	6M	N	N	N	↑ DER	N	N
47	Maltes	M	1	N	↑ IZQ	↑ IZQ	N	↑ DER	↑ DER
48	Maltes	H	1	N	↑ DER	N	↑ DER	N	↑ DER
49	Bóxer	H		N	↑ 2	N	↑ DER	N	N
50	Ganadero Australiano	M	2	N	↑ 2	N	N	N	N
51	Ganadero Australiano	H		N	↑ 2	N	↑ DER	↑ DER	N
52	Ratonero	H	2	N	↑ 2	N	N	↑ DER	↑ IZQ
53	Criollo	H		↑ 2	↑ 2	↑ 2	↑ 2	↑ 2	↑ 2
54	Criollo	H		N	↑ DER	N	N	N	N
55	Criollo	H	1.5 a 2	N	N	N	N	N	N
56	CRIOLLO	H	1	N	↑ DER	N	N	N	N
57	CRIOLLO	H	5	N	↑ DER	N	↑ DER	N	↑ IZQ
58	CRIOLLO	M		N	↑ 2	N	N	N	N
59	CRIOLLO	M	5M	N	↑ 2	↑ DER	↑ DER	↑ IZQ	↑ IZQ
60	CRUZA PASTOR ALEMÁN	H		↑ 2	↑ DER	N	N	N	↑ 2
61	CRIOLLO	H		N	N	N	N	N	↑ IZQ
62	Criollo	M	3	N	N	N	N	N	N
63	Criollo	M	2	N	N	N	N	N	N
64	Cruza Labrador	M	2	N	N	N	N	N	N
65	Cruza Golden	M	3	N	N	N	↑ DER	N	N

66	Cruza Maltes	M		N	↑ 2	N	N	N	N
67	Criollo	M	14	N	↑ DER	N	N	N	N
68	Ganadero Australiano	H	4	N	↑ DER	N	N	N	N
69	Pastor Alemán	M	13	N	↑ IZQ	N	N	N	↑ DER
70	Pastor Alemán	H	6M	N	N	N	N	N	↑ IZQ
71	Weimaraner	H	3,4	N	↑ DER	N	N	N	N
72	Chichuahua	H	2	N	↑ 2	N	N	N	N

Anexo V

Cuadro 14. Resultados de las pruebas de tuberculina e IFN- γ por individuo.

ID	IFN DO(PROMEDIO)			INDICE DE ESTIMULACION	PPD ^B	Tuberculina
	SE	PPD ^B	PK	SE/PPD	Pg/ml	aumento en mm
3	0.1945	0.1495	1.2945	0.76863753	175.5	1
7	0.098	0.0815	3.4255	0.83163265	5.5	0
8	0.08	0.12	3.915	1.5	101.75	0
9	1.405	0.5625	3.8485	0.40035587	1208	1
10	0.057	1.7705	3.9065	31.0614035	4228	2
11	0.0525	0.514	3.8735	9.79047619	1086.75	1
12	0.0665	0.182	0.0565	2.73684211	256.75	3
13	0.0575	0.2715	3.8205	4.72173913	480.5	1
14	0.1445	1.0185	3.75	7.04844291	2348	2
16	0.144	0.1265	3.6155	0.87847222	118	1
17	0.1435	0.0595	3.769	0.41463415	49.5	4
18	0.117	0.1645	3.7845	1.40598291	213	2
19	0.082	0.84	3.9235	10.2439024	1901.75	0

20	0.0605	0.125	3.5735	2.0661157	114.25	1
21	0.113	0.1175	3.4255	1.03982301	95.5	2
22	0.1185	0.0925	3.8255	0.78059072	33	1
23	0.11	0.2475	0.0765	2.25	420.5	1
24	0.055	0.2975	3.893	5.40909091	545.5	1
25	0.053	0.7575	3.7355	14.2924528	1695.5	7
26	0.0965	0.879	1.913	9.10880829	1999.25	9
27	0.0575	0.302	1.8795	5.25217391	556.75	3
28	0.051	0.1715	3.9275	3.3627451	230.5	2
29	0.0595	0.62	3.8515	10.4201681	1351.75	13
30	3.522	0.088	3.2805	0.0249858	21.75	3
31	0.0795	0.068	3.8895	0.85534591	28.25	1
32	0.084	0.0725	3.7435	0.86309524	17	0
33	0.1675	0.838	3.912	5.00298507	1896.75	3
34	0.0935	0.115	3.703	1.22994652	89.25	2
35	0.1465	0.6315	3.921	4.3105802	1380.5	3
36	0.078	0.13	3.7005	1.66666667	126.75	0
37	0.095	0.1325	2.683	1.39473684	133	1
38	0.1035	0.1715	2.1785	1.65700483	230.5	1
39	0.1745	1.4455	3.933	8.28366762	3415.5	5
40	0.0785	0.082	3.8785	1.04458599	6.75	2
41	0.0995	0.232	3.8385	2.33165829	381.75	2
42	0.0705	0.119	3.565	1.68794326	99.25	4

43	0.1275	1.1975	3.8005	9.39215686	2795.5	3
44	0.1455	0.055	3.412	0.37800687	60.75	3
45	0.2315	0.0655	3.4675	0.28293737	34.5	2
46	0.2225	0.062	3.4975	0.27865169	43.25	1
47	0.1915	0.0585	2.5875	0.30548303	52	3
48	0.7235	0.053	2.2455	0.07325501	65.75	0
49	0.1255	0.334	3.8665	2.66135458	636.75	8
50	0.29	0.1435	3.207	0.49482759	160.5	3
51	0.056	0.084	3.8725	1.5	11.75	3
53	0.0995	0.3275	3.625	3.29145729	620.5	4
54	1.028	1.0095	3.8045	0.98200389	2325.5	5
55	0.5705	0.792	3.8815	1.38825592	1781.75	1
56	0.12	1.15	3.808	9.58333333	2676.75	1
57	0.229	1.5385	3.805	6.71834061	3648	1
58	0.128	0.4215	3.8505	3.29296875	855.5	2
59	0.204	0.5155	3.884	2.52696078	1090.5	3
60	0.1665	1.869	3.4145	11.2252252	4474.25	5
61	0.5125	0.1375	3.3515	0.26829268	145.5	6
62	0.367	0.141	3.6565	0.38419619	154.25	2
63	0.687	0.068	3.671	0.09898108	28.25	1
64	0.2365	0.6805	3.724	2.87737844	1503	3
66	0.185	0.1985	2.2115	1.07297297	298	3
67	1.3155	1.017	3.931	0.77309008	2344.25	4

68	0.0665	0.7265	3.541	10.924812	1618	4
69	0.0645	0.36	3.2765	5.58139535	701.75	5
70	0.064	0.1405	3.5725	2.1953125	153	3
71	0.094	0.0755	3.112	0.80319149	9.5	1
72	0.1395	1.106	3.9225	7.92831541	2566.75	3
73	0.0735	0.0905	3.9285	1.23129252	28	0