



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

"COMPARACION DE LAS TECNICAS DE HEMAGLUTINACION PASIVA, DOBLE
INMUNODIFUSION Y PRUEBA INTRADERMICA EN EL DIAGNOSTICO DE LA
TUBERCULOSIS BOVINA."

TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

EUGENIO ROMERO ALONSO.

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO.

1986.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE

	Pag.
Introducción	1
Material y Métodos	14
Resultados	20
Discusión	30
Resultados y Conclusiones	34
Literatura Citada	36

INTRODUCCION

La tuberculosis es considerada actualmente como una de las enfermedades más devastadoras en los hatos bovinos, principalmente en el ganado lechero. Su incidencia adquiere gran importancia ya que abarca varios puntos de trascendencia en salud pública, así como su efecto nocivo en la producción animal. (4,5,9)

La primera transmisión con éxito de la enfermedad se logró en 1843 cuando se inyectó material tuberculoso por vía intravenosa al conejo. En 1849, se comprobó mediante estudios de inoculación animal que la tuberculosis es una enfermedad infecciosa. Después el 24 de Marzo de 1882, Roberto Koch, comunicó a la sociedad fisiológica de Berlín, el descubrimiento del agente causal de la tuberculosis, más tarde en 1890 él mismo preparó una sustancia que le llamó "linfa" atribuyéndole poderes inmunizantes y terapéuticos y a la cual se le conoce como "Koch old tuberculin" (tuberculina vieja de Koch). En 1887 Rivolta da a conocer diferencias entre el bacilo de la tuberculosis de las aves y el ganado. Theobald en 1896 descubre las diferencias entre el bacilo humano y el bacilo bovino. Long y Seibert en 1936, iniciaron la preparación de un medio sintético para conseguir un extracto de bacilos tuberculosos libres de proteína del medio. Florence, Seibert y Munday en 1951, lograron preparar un precipitado purificado de la proteína del bacilo tuberculoso, al

que se la conoció como "tuberculina precipitada por ácido triclórico acético" (TPD). Ese mismo año Seibert obtuvo un producto más puro utilizando el sulfato de amonio como agente precipitante y es así como se obtuvo el "derivado proteico purificado" (PPD-S) establecido en la FID Standard International en 1932. (3,4,6,7,8,9,10)

La tuberculosis bovina es una enfermedad infecto-contagiosa de índole crónico producida por el Mycobacterium bovis que se caracteriza por el desarrollo progresivo de tubérculos en cualquier órgano. (3,4,6,8,9,13)

Se conocen cuatro tipos de tuberculosis en animales de sangre caliente: humana, bovina, aviar y del ratón campestre. Los agentes etiológicos se califican como Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis, Mycobacterium avium, Mycobacterium microti respectivamente. Estos microorganismos son bacterias de forma bacilar acidorresistentes. (3,5,8,11,12)

La transmisión es principalmente aerógena por medio de aerosoles; también se presenta la vía digestiva por medio de agua, leche o alimentos contaminados, y menos común la vía genital. (13)

La vía de entrada del bacilo en los bovinos adultos por lo general es la respiratoria, siendo más frecuentemente esta vía de entrada en el ganado estabulado. Por otra parte la ingestión es

la vía de entrada más común cuando los animales permanecen en pastoreo. Esta transmisión se realiza por el estrecho contacto de los animales en los sistemas de extensión especializada. Las vías de eliminación son principalmente la respiratoria (esputo, tos) y digestiva (heces procedentes de lesiones intestinales). (6,12,13)

Basta mencionar que la tuberculosis en el ganado bovino reduce la producción láctea tanto en cantidad como en calidad, acortando la vida útil y la capacidad reproductora de los animales. Se ha estimado que el rendimiento de una vaca tuberculosa disminuye del 10 al 25% de su capacidad productiva (1,3,4,5,6) así como en la industria de la carne, pues disminuye la eficiencia de la conversión alimenticia del animal y además provoca decomisos de las canales y vísceras de los animales infectados. (5)

Además del problema de zoonosis que produce, Aline S. de Aluja ha reportado en 1975 que, de 27800 vacas en el D.F., 5% tenían tuberculosis y eliminaron el bacilo por la leche. (1) En 1978 en la comarca lagunera se obtuvo el 19.5% de reactores. En 1979 en la cuenca lechera de Tizayuca se obtuvo una incidencia del 10.8%. (13).

Debido a la alta incidencia de enfermedades infecto-contagiosas en nuestro medio y en varias partes del mundo, es necesario implementar otros métodos de diagnóstico fáciles y rápidos que sirvan como coadyuvantes a los ya existentes. (14)

Para detectar la tuberculosis se han desarrollado métodos IN VIVO e IN VITRO. (14)

Métodos IN VIVO que se han utilizado para el diagnóstico de la Tuberculosis Bovina.~

La respuesta inmune de base celular se manifiesta en la reacción a la tuberculina. Es una respuesta inflamatoria de la piel donde se aplica el antígeno y requiere de una sensibilización primaria específica de las células. (5)

La reacción a la tuberculina es una reacción inmunológica específica que se debe a células T. Las células T sensibles a los antígenos que se encuentran en la circulación entran en contacto con el antígeno inyectado y responden al mismo por reclutamiento de otros linfocitos y por división, diferenciación y liberación de linfocinas, no se sabe que linfocinas intervienen ni en que orden, pero se piensa que la acumulación de macrófagos en el foco inyectado se debe a liberación de factores quimiotácticos para macrófagos, quedando luego impedida su migración a partir del foco por la presencia de factores inhibidores de la migración. Estos macrófagos fagocitan el antígeno inyectado y finalmente lo destruyen, desapareciendo así el estímulo para que continúe la producción de linfocinas, con lo cual los

tejidos vuelven a su estado normal. (5,6)

Métodos de diagnóstico para la tuberculosis bovina, aplicando la prueba de la tuberculina.-

A) Prueba intradérmica única.- En esta prueba se inyectan 0.05 ml de PPD en el pliegue anal y éste es examinado de 72 a 96 horas después, observándose inflamación difusa en el punto de la inoculación de los casos reactivos positivos. El principal inconveniente es la falta de especificidad y el número elevado de reactivos con lesiones no visibles. No es lo bastante específica para permitir la diferenciación de reacciones consecutivas a infecciones por *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium paratuberculosis* y *Nocardia farcinica*. Otro inconveniente es la dificultad para descubrir casos de sensibilidad mínima como puede ocurrir en etapas tempranas o tardías de la enfermedad, en animales viejos y vacas que hayan parido recientemente. (3,6,7,14,20) Otras de las variantes de la prueba practicada en los Estados Unidos es la inyección doble en la unión mucocutánea de la vulva. (14)

B) Prueba de reacción térmica breve.- Se inyecta tuberculina en dosis de 4 ml por vía subcutánea en el cuello de los bovinos cuya temperatura rectal no pase de los 39°C, en el momento de la inyección y dos horas después, si la temperatura se elevó a 40°C a las 4, 6 y 8 horas de la inoculación se considera al animal como reactor positivo. Tiene como indicación que se aplica en

animales después del parto y en casos graves. Su ventaja es que es muy eficaz y su desventaja es que requiere mucho tiempo; entraña un riesgo de anafilaxia. (3,6,14,20)

C) Prueba de Tuberculina intravenosa.- La reacción positiva es dada por fiebre de 4 a 6 horas después de la inoculación de tuberculina. Resulta difícil la interpretación de esta prueba, debiendo considerar a veces cambios hematológicos para evitar pruebas negativas falsas. (3,6,14)

D) Prueba de Stormont.- Esta prueba se utiliza para seleccionar animales pobremente sensibilizados. Es similar a la intradérmica, pero con una inyección ulterior en el mismo sitio siete días después. Se consideran resultados positivos cuando se aprecia un aumento mínimo de 5 mm. en el espesor de la piel 24 horas después de la segunda inyección. Se aplica después del parto y en casos graves. Ventajas: es muy sensible y exacta; desventaja: se requiere de tres visitas, el período de desensibilización es muy largo. (3,6,14,20)

E) Prueba cervical doble comparativa.- La prueba comparativa depende de la mayor sensibilidad a la tuberculina homóloga. Por vía intradérmica se aplican tuberculinas PPD, preparadas a partir de *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium avium*. Estos reactivos se aplican simultáneamente en la tabla del cuello, con 10 a 12 cm. de distancia de una a la otra inyección en sentido vertical, a razón de 7500 U.I. y 2500 U.I. respectivamente, éstas dosis

generalmente son contenidos en 0.1 cc. y se procede a la lectura de la prueba 72 horas más tarde. Si el foco donde se inyectó la tuberculina aviaría muestra una reacción más intensa, se considera que el animal está infectado por Mycobacterium avium o Mycobacterium paratuberculosis. En cambio, si la reacción es más intensa en el foco que recibió tuberculina bovina, se concluye que el animal está infectado por Mycobacterium tuberculosis o Mycobacterium bovis. (3,4,6,7,9,14,20)

Se observan a veces reacciones negativas falsas en:

- 1) Casos avanzados de tuberculosis por desensibilización natural.
- 2) Casos tempranos hasta seis semanas después de la infección.
- 3) Vacas que han parido en transcurso de las seis semanas anteriores o últimas etapas de la gestación.
- 4) Animales desensibilizados por administración de tuberculina durante 8 a 60 días anteriores.
- 5) Bovinos viejos o muy jóvenes.
- 6) Cuando se han aplicado glucocorticoides. (3,14)

Se observan reacciones positivas falsas en:

- 1) Animales sensibilizados a otros alérgenos mycobacterianos.
- 2) Animales sensibilizados a otros alérgenos que pueden ser eventualmente bacterianos por ejemplo Nocardia farcinica que puede dar reacción cruzada con Mycobacterium bovis. (4,14)

Métodos IN VITRO que se han utilizado para el diagnóstico de la Tuberculosis Bovina.-

Ha sido repetidamente observado que el serodiagnóstico de la tuberculosis en el ganado es de valor limitado. Algunas de la razones de esto pueden ser:

- a) La alta prevalencia de reacciones positivas falsas en pruebas positivas de tuberculina en ganado sin lesiones visibles.
- b) Carencia de diferenciación serológica clara entre el ganado sano y ligeramente infectado. (22)

A) Prueba directa de anticuerpos fluorescentes.- Esta prueba permite reconocer la presencia de un antígeno. Es posible marcar el anticuerpo correspondiente a un antígeno dado. Esta prueba directa permite identificar bacterias en muestras donde pueden ser muy escasas. (20)

B) Prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes.- Se permite identificar y medir los anticuerpos en el suero. (20)

C) Prueba de fijación de complemento.- Evalúa la concentración de anticuerpos fijadores del complemento en animales infectados con *Mycobacterium tuberculosis*. (5,16,20) Los animales severamente afectados tiene generalmente mayor concentración de anticuerpos por la prueba de fijación de complemento. (22) Wasserman y Bruck en 1906, reportaron que el suero de pacientes tuberculosos se mostraba positivo a la reacción de fijación de complemento empleando como antígeno la tuberculina antigua de Koch.

D) Prueba de MIF.- Esta prueba fué introducida por George y Vaughan, consiste en células peritoneales de cobayo a partir de células sensibilizadas por antígeno específico. La inhibición de migración se presenta al contacto con el antígeno específico.

(14) Al momento que se pone en contacto el antígeno y los linfocitos se producen tres etapas:

- Reconocimiento por los linfocitos.
- Proliferación celular.
- Es cuando los linfocitos atraviesan por la etapa de actividad que puede ser la producción de una proteína que media la inhibición de macrófagos, además de linfoquinas citotóxicas y control de la respuesta inmune ya sea por cooperación o supresión. (14)

Sin embargo la prueba presenta ventajas y desventajas una sobre otra como son:

- a) La prueba de MIF es más difícil de llevar a cabo porque se necesita personal entrenado.
- b) No se pueden trabajar un gran número de muestras.
- c) Los resultados son obtenidos más rápidamente en comparación con la prueba intradérmica. (14)

E) Prueba de hemaglutinación pasiva.- Middle-Brook y Dukes 1948; Rothbard et al 1950; Toward 1964 y Shukla y Singh 1972 recomiendan como prueba específica que puede ser utilizada en la detec-

ción de formas activas de tuberculosis. (10)

El empleo de un reactivo acoplador, el citrato cúbico para adherir la proteínas a los eritrocitos indicadores, ha hecho posible la hemaglutinación de los glóbulos rojos por los antígenos que en otra forma no muestran esta propiedad. (11)

La prueba de hemaglutinación pasiva puede detectar casos de tuberculosis avanzados cuando la reacción de la tuberculina es inconclusa. (12)

F) Inmunodifusión.- La base de la prueba de inmunodifusión gel es la migración concurrente del antígeno y del anticuerpo a través del agar gel, conteniendo una alta concentración de sales, éstas son necesarias para incrementar la formación de inmunoprecipitación, así cuando el antígeno y el anticuerpo se combinan específicamente, se forma un precipitado que es determinado en el gel, en él se forma una línea visible de inmunoprecipitación. (13)

G) Contraelectroforesis.- Es una modificación del procedimiento de inmunodifusión bidimensional. (14) La contraelectroforesis descrita por Kohn en 1968 la primera vez, utiliza la técnica de difusión doble de Ouchterlony pero es aplicada a un campo eléctrico para acelerar la reacción que da el resultado final. (15,16) En tal sistema el glóbulo gama se mueve hacia cátodo mientras que la mayor parte del antígeno, tiene una movilidad electroforética y migra hacia el ánodo. (17)

Otros métodos de diagnóstico son:

Examen bacteriológico.

Se emplea la técnica de Ziehl-Neelsen para identificación de las bacterias ácidorresistentes en el esputo, corte de tejido, líquido pleural, cefalorraquídeo y sinovial. (4,11)

Examen Clínico

El curso de la enfermedad es crónico. Algunos bovinos con lesiones tuberculosas miliares extensas son clínicamente normales, pero el enflaquecimiento progresivo no acompañado de otra enfermedad, así como la temperatura fluctuante, apetito caprichoso, apatía y el aspecto del tegumento rugoso liso, sugiere el padecimiento. (6,8)

Con frecuencia la afección pulmonar se caracteriza por tos crónica debido a la bronconeumonía. La disnea y otros signos de neumonía de poca intensidad también es una evidencia de afección pulmonar. (3,6,8)

Los signos más frecuentes de participación digestiva se manifiestan por diarrea intermitente y estreñimiento en ciertas ocasiones. En estos casos, los ganglios linfáticos están aumentados de tamaño y ejercen presión sobre los órganos circundantes, pueden ser descubiertos por palpación rectal. Rara vez la úlcera

tuberculosa del testículo produce diarrea. La hipertrofia de los ganglios linfáticos retrofaríngeos ocasiona disfagia y respiración ruidosa por obstrucción de la faringe. (3,6,8,12)

Los tubérculos de la ubre se presentan como hinchazones nodulares circunscritas o difusas que se desarrollan lentamente y sin producir dolor. Los ganglios linfáticos supramamarios generalmente están aumentados de tamaño. (3,5)

Examen postmortem

El diagnóstico de la tuberculosis en los bovinos a la necropsia se basa habitualmente sobre el aspecto amarillento de un proceso necrótico, ya sea la lesión caseosa o calcificada. Es ésta una característica bastante constante de las lesiones tuberculosas y aun el exudado purulento en una lesión grande que sufre necrosis licuefaciente permanece amarillo. (6)

Es frecuente encontrar granulomas tuberculosos en cualquiera de los ganglios linfáticos, pero sobre todo en los mediastínicos y bronquiales. (3,6,12,19)

En el pulmón, los abscesos miliares se extienden para producir bronconeumonía supurativa. Se observa a veces pequeños nódulos en la pleura y peritoneo que poseen pus tuberculoso pero que carecen de líquido. (3)

Control y/o Erradicación.

Para el control y/o erradicación de la tuberculosis bovina se han experimentados diversos métodos clasificándose en cuatro grupos principales:

- 1) De prueba y sacrificio.- Consistente en la detección de los animales positivos a la tuberculina iniciando el muestreo a los cuatro meses de edad y repitiendo la prueba 60 a 90 días después, posteriormente cada año y eliminando de manera inmediata a los reactores positivos a la tuberculinización. (6)
- 2) De prueba y segregación.- "Fincas de segregación" donde es posible explotar en forma rentable y por un período limitado, a animales altamente productivos que han sido clasificados como infectados. (6)
- 3) De quimioterapia.- En los países donde se pretende erradicar la tuberculosis no se aplica ningún tratamiento, pues se corre el riesgo de obtener animales portadores y el costo del tratamiento puede exceder el valor económico del animal. (6)
- 4) Inmunización.- Esta se ha llevado a cabo en países en donde la erradicación es económicamente imposible dando una protección apreciable, pero no absoluta. No es recomendable realizar la inmunización en aquellos lugares en donde se tengan programas de erradicación pues esta induce la sensibilidad a la tuberculina y por consiguiente a la obtención de reactores falsos positivos. (1,6,7,15)

MATERIAL Y METODOS

Material biológico

100 bovinos Holstein, hembras en producción de leche en explotación intensiva, la edad varía entre dos y ocho años, perteneciente a un rancho en el municipio de Zumpango, Estado de México.

Tuberculina bovina (PPD Bovino) Pronabive.

Tuberculina aviar (PPD Aviar) Pronabive.

Método.

Suero de los bovinos.

Se obtuvo una muestra de sangre de cada animal antes de llevarse a cabo la tuberculinización. Para esto, se emplearon tubos Vacutainer estériles y el vacío; las muestras de sangre se obtuvieron de los vasos sanguíneos coccígeos. Dichos sueros se utilizaron para realizar las técnicas serológicas de doble inmunodifusión y hemaglutinación pasiva.

Técnica de Doble Inmunodifusión.

Material y equipo.

Tampón barbital en agar.

Soluciones de antígeno (tuberculina mamífera)

Soluciones de suero (suero de bovino)

Taladrador de geles.

Método para realizar el agar.

0.2 gr de Hidróxido de Sodio.

0.9 gr de Acido Bórico.

0.7 gr de Cloruro de Sodio.

0.7 a 1 gr de agar noble especial.

100 ml de agua destilada.

0.1 ml de mertiolato blanco.

pH 8.4

Método

1. Fundir el agar en un baño de agua hirviendo.
2. Depositar el agar sobre cajas de Petri.
3. Perforar con el modelo de taladrador deseado.
4. Aspirar el molde de agar con una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío.
5. Lenar los posillos con el anticuerpo o el antígeno justo hasta que desaparezca el menisco.
6. Colocar la caja de Petri en una cámara húmeda e incubar toda la noche a temperatura ambiente.

Interpretación de los Resultados.

La reacción de identidad tiene lugar entre determinantes antígenicos idénticos. Las líneas de precipitación se fusionan para dar un arco continuo.

Técnica de Hemaglutinación Pasiva.

Materiales y equipo.

Eritrocitos de carnero.

Solución de Albever Modificada.

Glutaraldehido.

Ácido Tánico

Solución salina buffer (PBS) pH 7.2 y 6.4

Solución de antígeno (tuberculina mamífera)

Solución de anticuerpo (suero de bovino).

Equipo de microaglutinación

Método.

Los sueros de bovino fueron diluidos con PBS pH 7.2 a una dilución de 1:10, adsorbidos con eritrocitos de carnero (0.5 ml) se deja reposar a una temperatura ambiente por 30 minutos. En seguida, el complemento fue inactivado a 56 grados centígrados por 30 minutos.

Suspensión de Glóbulos Rojos.-

La sangre de carnero es obtenida por punción en la vena yugular en condiciones asépticas y recibida directamente en un matrás que contiene solución de alsever modificada. Para un volumen de sangre de carnero (100 ml) se empleó un volumen de la solución de alsever (100 ml). Se le deja reposar durante 24 horas a temperatura de refrigeración. Los eritrocitos se lavan con solución salina buffer pH 7.2, por tres veces consecutivas.

Franizado de Glóbulos Rojos.-

Poner 1 ml del paquete de eritrocitos en 29 ml de PBS pH 7.2 para obtener una suspensión de 2.5%.

Añadir un volumen igual (40 ml) de solución de ácido tánico 1:20000; mezclar e incubar en baño María a 37 grados centígrados por 10 minutos. Sacar los eritrocitos del baño María y centrifugar por 5 minutos a 2500 rpm. Descartar el sobrenadante, lavar con PBS pH 7.2 y centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos y resuspender los eritrocitos en PBS pH 5.4 para hacer una suspensión al 2.5%.

Fijación de Glóbulos Rojos con Glutaraldehído al 1%.-

A un volumen de 3 ml de la suspensión de eritrocitos se añaden 25 ml de glutaraldehído al 1%.

Adsorción de antígeno a los eritrocitos lavados y fijados.

Para sensibilizar los hematíes lavados y fijados, un volumen de éstos se mezcla con un volumen igual de la solución de tuberculina mamífera 1:5, en PBS pH 6.4. Se agita y se les coloca en baño termostático a 37°C por 30 minutos. Después de este periodo de incubación, los eritrocitos son lavados con PBS pH 7.2 y centrifugados a 1500 rpm durante 5 minutos, se desecha el sobrenadante y se resuspenden en 5 ml de PBS pH 7.2.

Los glóbulos rojos así preparados, se guardan en refrigeración y quedan listos para usarse en la prueba de hemaglutinación.

Prueba de Hemaglutinación Pasiva.

A cada pozo de la placa de aglutinación se le añade una gota (0.05ml) de PBS pH 7.2 con suero de conejo al 1%. Se deposita una gota (0.05 ml) de suero de bovino diluido 1:10 en la primera hilera vertical, quedando una dilución 1:20. Con los agitadores se hacen las posteriores diluciones hasta 1:10204. Luego a cada pocito se le agrega la solución de eritrocitos de carnero ya procesados, por último, se agita la placa hasta obtener una suspensión homogénea de los eritrocitos, se colocan en el refrigerador durante 24 horas y se realiza posteriormente la lectura de resultados.

Prueba de la tuberculina.

La tuberculización se realizó utilizando la prueba doble intradérmica comparativa a la tuberculina, que se aplica en la tabla del cuello. primeramente, se rasuro la piel en dos diferentes zonas (separados por 10 cm. aprox.) de un mismo lado de la tabla del cuello, se midió el grosor de la piel en dicha zona por medio de un vernier y se apunta en una hoja de campo; posteriormente, con jeringas especiales se aplicó 0.1 ml de tuberculina intradérmicamente, aplicando en la zona de arriba la tuberculina aviar y en la zona de abajo la bovina.

72 horas posteriores de la aplicación de la tuberculina se realizó la lectura de la reacción en cada animal; esta lectura se debe realizar por la misma persona que midió originalmente la piel, haciendo la medición otra vez con el vernier, en la zona que previamente se había inyectado. Las dos mediciones para cada animal y para cada tuberculina, se anotaron en una columna control para cada vaca, para así facilitar su interpretación.

Se utilizó el criterio siguiente para considerar el aumento del grosor del pliegue de la piel como resultado de la reacción:

aumento de mas de cuatro mm. POSITIVO

aumento de dos a cuatro mm. SOSPECHOSO

menos de dos mm. NEGATIVO.

RESULTADOS

En los cuadros se presentan los resultados obtenidos, tanto en las pruebas serológicas (doble inmunodifusión, hemaglutinación pasiva) como en la prueba de la tuberculina (doble comparativa) registrados en el presente trabajo.

En los resultados obtenidos se observa que de las 100 vacas, 31 casos son positivos de tuberculosis y 1 caso es sospechoso. De éstos casos, 1 fué positivo a la prueba de doble inmunodifusión, 21 fueron positivos a la prueba de hemaglutinación pasiva y 14 fueron positivos a la prueba de la tuberculina. En donde la vaca No. 215 apareció positiva a la prueba de doble inmunodifusión y a la prueba de hemaglutinación pasiva, las vacas números 246, 372, 384, 452 aparecieron positivas tanto a las pruebas de hemaglutinación pasiva como a la prueba de la tuberculina.

CUADRO No. 1

Resultados de la prueba doble inmunodifusión, hemaglutinación pasiva y prueba de la tuberculina.

No	NO DEL ANIMAL	DOBLE INMUNO DIFUSION	HEMAGLUTINACION PASIVA				PRUEBA DE TUBERCULINA
			1/20	1/40	1/80	1/160	
1	15	-	-	-	-	-	positivo
2	17	-	-	-	-	-	-
3	26	-	-	-	-	-	-
4	37	-	-	-	-	-	-
5	53	-	+	+	+	+	-
6	58	-	-	-	-	-	-
7	115	-	-	-	-	-	-
8	125	-	+	+	+	+	-
9	127	-	-	-	-	-	-
10	129	-	-	-	-	-	-
11	144	-	+	+	+	+	-
12	146	-	+	+	+	+	-
13	151	-	-	-	-	-	positivo
14	159	-	-	-	-	-	-
15	161	-	-	-	-	-	-
16	166	-	-	-	-	-	positivo
17	201	-	-	-	-	-	-
18	202	-	-	-	-	-	-
19	205	-	+	-	-	-	-
20	206	-	-	-	-	-	-
21	208	-	-	-	-	-	-
22	216	positivo	+	-	-	-	-
23	221	-	-	-	-	-	-
24	228	-	+	+	+	+	-
25	229	-	-	-	-	-	-
26	230	-	-	-	-	-	-
27	231	-	+	+	+	+	-
28	238	-	-	-	-	-	-
29	244	-	-	-	-	-	-
30	246	-	+	+	+	-	positivo
31	248	-	-	-	-	-	-
32	257	-	-	-	-	-	-
33	304	-	-	-	-	-	-
34	309	-	-	-	-	-	-
35	313	-	-	-	-	-	-
36	315	-	-	-	-	-	-
37	316	-	+	+	+	+	-
38	317	-	-	-	-	-	positivo
39	322	-	-	-	-	-	-
40	323	-	-	-	-	-	-
41	325	-	-	-	-	-	-
42	326	-	-	-	-	-	-

No	NO DEL ANIMAL	DOBLE INMUNO DIFUSION	HEMOAGLUTINACION PASIVA				PRUEBA DE TUBERCULINA
			1/20	1/40	1/80	1/160	
43	327	-	-	-	-	-	positivo
44	333	-	-	-	-	-	-
45	334	-	-	-	-	-	-
46	335	-	-	-	-	-	-
47	336	-	-	-	-	-	-
48	338	-	-	-	-	-	-
49	341	-	-	-	-	-	-
50	342	-	-	-	-	-	-
51	346	-	-	-	-	-	-
52	348	-	-	-	-	-	positivo
53	349	-	-	-	-	-	-
54	351	-	+	-	-	-	-
55	355	-	-	-	-	-	-
56	363	-	-	-	-	-	-
57	365	-	-	-	-	-	-
58	368	-	-	-	-	-	-
59	372	-	+	+	+	+	positivo
60	376	-	-	-	-	-	-
61	382	-	+	+	+	+	-
62	384	-	+	+	+	-	positivo
63	385	-	-	-	-	-	positivo
64	387	-	-	-	-	-	-
65	389	-	-	-	-	-	positivo
66	406	-	-	-	-	-	-
67	413	-	-	-	-	-	-
68	450	-	-	-	-	-	-
69	452	-	+	+	+	+	positivo
70	453	-	+	+	+	+	-
71	455	-	+	-	-	-	-
72	456	-	-	-	-	-	-
73	458	-	-	-	-	-	-
74	459	-	-	-	-	-	-
75	461	-	-	-	-	-	-
76	462	-	-	-	-	-	-
77	463	-	-	-	-	-	-
78	464	-	-	-	-	-	-
79	465	-	-	-	-	-	sospechoso
80	466	-	-	-	-	-	-
81	467	-	-	-	-	-	-
82	468	-	-	-	-	-	-
83	501	-	-	-	-	-	-
84	507	-	+	-	-	-	-
85	593	-	+	+	+	+	-
86	639	-	-	-	-	-	-
87	651	-	-	-	-	-	-
88	652	-	+	+	-	-	-
89	663	-	-	-	-	-	-
90	667	-	-	-	-	-	positivo
91	728	-	-	-	-	-	-

No	NO DEL ANIMAL	DOBLE INMUNO DIFUSION	HEMAGLUTINACION PASIVA				PRUEBA DE TUBERCULINA
			1/20	1/40	1/80	1/160	
93	856	-	-	-	-	-	-
94	861	-	-	-	-	-	-
95	863	-	-	-	-	-	-
96	872	-	-	-	-	-	-
97	917	-	+	-	-	-	-
98	953	-	-	-	-	-	positivo
99	987	-	-	-	-	-	-
100	988	-	-	-	-	-	-

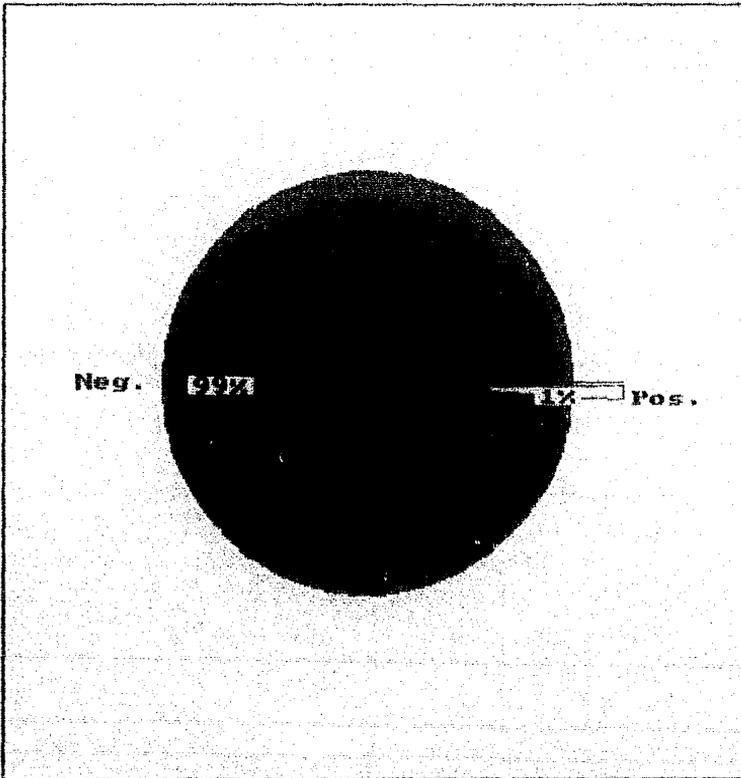
CUADRO No. 2

Resultados de la prueba de doble inmunodifusión, utilizando como antígeno turberculina maniterra (Pronabive).

Total de animales: 100

Animales negativos: 99

Animales positivos: 1



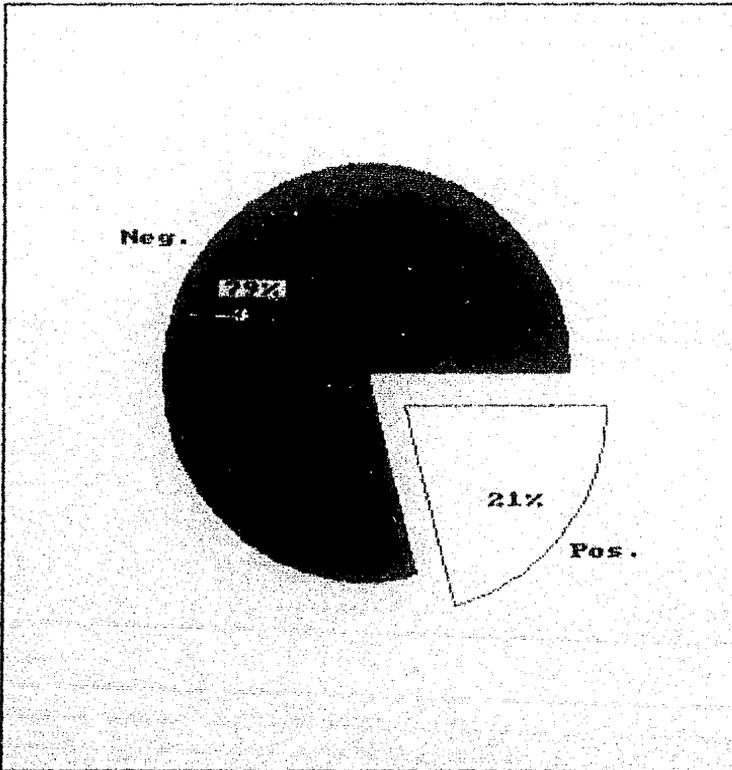
CUADRO No. 2

Resultados de la prueba de Hemaglutinación pasiva, utilizando como antígeno tuberculina vacuifera (Pronabive).

Total de animales: 100

Animales negativos: 79

Animales positivos: 21



CUADRO No. 4

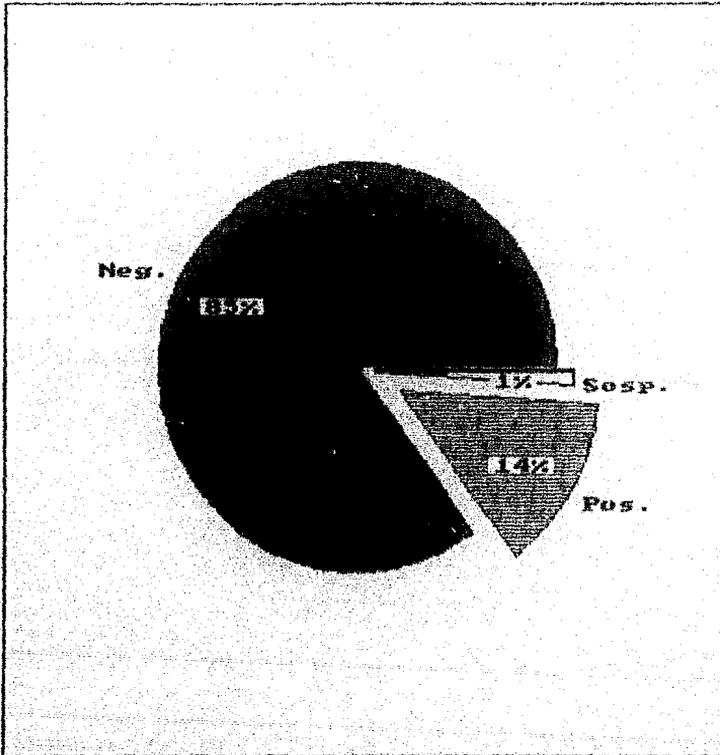
Resultados de la prueba de tuberculina, utilizando como antígeno tuberculina mamífera y Avian (Pronabive).

Total de animales: 100

Animales negativos: 85

Animales sospechosos: 1

Animales positivos: 14



CUADRO No. 5

Porcentajes de las pruebas serológicas de Doble Inmunodifusión, Hemaglutinación pasiva, y prueba de campo Tuberculina.

	DOBLE INMUNODIFUSION	HEMAGLUTINACION PASIVA	PRUEBA DE TUBERCULINA
% de casos negativos	99%	79%	85%
% de casos positivos	1%	21%	14%
		Titulos de Anticuerpos.	
		1/20	6%
		1/40	1%
		1/80	2%
		1/160	12%
% de casos sospechosos			1%

CUADRO No. 6

Correlación de la prueba de la Tuberculina y la prueba de Hema-
glutinación Pasiva.

		Hemaglutinación pasiva					
		Negativos	1/20	1/40	1/80	1/160	TOTAL
Prueba de la Tuberculina	Negativos	68	6	1	0	10	85
	Suspechosos	1	0	0	0	0	1
	Positivos	10	0	0	2	2	14
	TOTAL	79	6	1	2	12	100

CUADRO No. 7

Resumen comparativo de los resultados positivos de las tres pruebas.

VACA No.	DOBLE INMUNODIFUSION	HEMAGLUTINACION PASIVA	PRUEBA DE LA TUBERCULINA
15	-	-	positivo
53	-	positivo	-
125	-	positivo	-
144	-	positivo	-
146	-	positivo	-
151	-	-	positivo
166	-	-	positivo
205	-	positivo	-
216	positivo	positivo	-
228	-	positivo	-
231	-	positivo	-
246	-	positivo	positivo
316	-	positivo	negativo
317	-	-	positivo
327	-	-	positivo
348	-	-	positivo
351	-	positivo	-
372	-	positivo	positivo
382	-	positivo	-
384	-	positivo	positivo
385	-	-	positivo
389	-	-	positivo
452	-	positivo	positivo
453	-	positivo	-
455	-	positivo	-
465	-	-	sospechoso
587	-	positivo	-
593	-	positivo	-
652	-	positivo	-
667	-	-	positivo
953	-	positivo	-
987	-	-	positivo

DISCUSION

En la mayoría de los países, incluyendo México, la reacción intracutánea de la tuberculina es la prueba principal usada en los programas de erradicación de la tuberculosis bovina.

Shaaf, Ramadan et al, Freerksen and Luterbach, Loffy and Guindl, El-Ahwal and Kelly dicen que hay varios fenómenos que interfieren con la interpretación de los resultados, conocidos como reacciones no específicas y son las siguientes: parasitosis como la fascioliasis, infecciones con micobacterias atípicas y brucella, embarazo y parto, y la vacunación contra ciertas enfermedades.

Con el éxito de los métodos de control depende la rápida separación del ganado tuberculoso del rebaño, la exactitud de la prueba de la tuberculina es de gran importancia al respecto.

Consecuentemente se han estado tratando de mejorar tuberculinas y métodos de diagnóstico. Bajo estas circunstancias distintos serodiagnósticos han sido investigados para corroborar la prueba de la tuberculina en el diagnóstico de la tuberculosis humana y de los animales.

Puede interpretarse como animales que han estado en contacto con microorganismos del género micobacteria y presentan una hipersensibilidad pero no responden a la producción de anticuerpos

debido a varios factores como pueden ser: reacciones cruzadas con otros microorganismos como *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium phlei*, *Pseudomonas* y algún otro perteneciente al género *Nocardia*. También como animales que pudieron ser naturalmente tuberculinizados o que hayan adquirido cierta inmunidad natural y errores en la lectura.

A la prueba de hemaglutinación pasiva 17 animales fueron positivos pero negativos a la prueba de la tuberculina, esto puede deberse a varias factores:

- 1) Animales con un curso avanzado de tuberculosis.
- 2) La gran cantidad de antígeno presente en los focos evolutivos, aunque los órganos encargados de la producción de células "T" responsables de la respuesta de inmunidad celular produciendo una verdadera inmunosupresión o estados de desensibilización.
- 3) Se observan en los casos avanzados de tuberculosis, que en el suero de estos animales hay un factor bloqueador que impide que las células "T" reaccionen con el antígeno.

Otro factor que enmascara la respuesta humoral inmune son las hormonas presentes en aquellos animales que están en los últimos días de gestación o recién paridas. En animales que han recibido tratamiento con corticoesteroides o con progesterona se ha visto que tiene una acción depresora sobre la sensibilidad en el sistema inmune. Factores neurofisiológicos que causan un aumento considerable en la concentración de adrenalina en la circulación sanguínea, incrementando o deprimiendo la respuesta a la aplica-

ción de la tuberculina. A este respecto se puede decir que en la prueba de hemaglutinación pasiva, ninguno de estos factores producen variaciones en los resultados. Esta puede detectar desde niveles bajos de anticuerpos hasta niveles altos para todas las especies que forman el género *Mycobacterium*. Por lo tanto, aquellos animales que a la prueba de tuberculina fueron negativos y que presentan un nivel bajo de anticuerpos hace sospechar de una infección producida por bacilos ácido-resistentes. Incluso en aquellos animales que están en un período inicial de la infección y que son positivos a la prueba de la tuberculina pueden ser detectados por esta prueba.

En el tercer grupo de animales formado únicamente por la vaca No. 216 esta fué positiva a la prueba de doble inmunodifusión y negativa a las demás pruebas. Esta podría ser debido al fenómeno de zona por exceso de antígeno y poco anticuerpo y como podrá observarse en el cuadro de resultados, los títulos de anticuerpos de aquellos animales que resultaron positivos a la prueba de hemaglutinación pasiva no fueron superiores a 1:160. Esta prueba requiere para su visualización de títulos considerables de anticuerpos.

El bovino que resultó positivo a la prueba de doble inmunodifusión y con un título de 1:20 a la prueba de hemaglutinación pasiva puede ser por una reacción cruzada con algún otro microorganismo y no necesariamente a *Mycobacterium bovis* por lo tanto esta prueba en este trabajo no resultó eficiente para la detección de animales enfermos sospechosos a tuberculosis aunque

esto no concuerda con otras investigaciones realizadas.

Aunque los animales negativos a la prueba de hemaglutinación pasiva y de la tuberculina no ofrecen mayor interés por suponerse libres de la enfermedad, son los de mayor importancia debido a que conviven con animales reactivos positivos y estos últimos probablemente estén infectando a los animales negativos a la tuberculosis.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

El objetivo del trabajo fue comparar los resultados de la prueba intradérmica doble comparativa de tuberculina en bovinos productores de leche, con los resultados obtenidos en las pruebas serológicas de hemaglutinación pasiva y de doble inmunodifusión desarrolladas IN VITRO en las cuales se utilizó como antígeno tuberculina mamífera (Fronabive); con el propósito de encontrar un método más rápido y específico que pudiera ser utilizado como técnica adicional en el diagnóstico de tuberculosis bovina.

Hasta la fecha la prueba más frecuentemente utilizada ha sido la prueba doble comparativa pero resulta complicado evaluar su eficiencia a nivel de campo, y es por esto que se han buscado métodos más prácticos para su detección como la técnica de hemaglutinación pasiva que pudiera ser utilizada como una prueba de sustitución o corroboración de resultados.

Se emplearon 100 bovinos Holstein Friesian a los cuales se le aplicó por vía intradérmica tuberculina mamífera y aviar y se analizaron los resultados para ser comparados con las pruebas serológicas de hemaglutinación pasiva y doble inmunodifusión.

Los resultados indicaron que en la prueba de hemaglutinación pasiva se obtuvo el 21% de animales positivos en tanto que en la prueba intradérmica que se realizó después de la obtención de la muestra de sangre se obtuvo el 14%.

La discrepancia entre los resultados es discutida, al señalar entre otras posibles explicaciones las siguientes: mal desarrollo de la prueba, variaciones en el estado fisiológico de los animales analizados, la posible inespecificidad de los antígenos utilizados lo que pudiera dar lugar a falsas lecturas positivas o negativas.

Por lo tanto consideremos que es importante el muestreo periódico del hato y según este trabajo, las pruebas que nos auxiliarían serían la prueba de la tuberculina más la prueba de la hemaglutinación pasiva. De esta manera estaríamos determinando realmente aquellos animales que ofrecen un peligro para todo el hato.

Resultaría conveniente para poder corroborar la validez de este trabajo que se hicieran exámenes clínicos, bacteriológicos, serológicos y postmortem que pudieran determinar si los hallazgos de las tres pruebas realizadas en este trabajo son verídicos.

LITERATURA CITADA

1. Aluja, A. S.: La tuberculosis del ganado bovino en México, *Veterinaria México*, 6, 1975.
2. Berggren, S.A.: Incidence of tuberculosis in BCG vaccinated and control cattle in relation to age distribution in Malawi, *Br. vet. J.*, 133, 1977.
3. Blodd, D.C., Henderson, J.A., Radostist, O.M.: *Medicina Veterinaria*. Ed. Interamericana. 5a. edición, 1985.
4. Contreras, F.J.: Prueba Comparativa de tuberculización en Ganado Bovino Lechero Mediante el Empleo de PPD de Elaboración Inglesa (Weybridge) PPD nacional (Pronabivo), Tesis de Licenciatura, *Fac. de Est. Sup. Cuautitlán U.N.A.M. México*, D.F. 1981.
5. Chávez, M. J. F.: Prueba de Fijación de Complemento para Detectar Anticuerpos Contra *Mycobacterium tuberculosis* en Suero de Bovinos de un Hato Bajo Control de Tuberculosis, Tesis de Licenciatura, *Fac. de Med. Vet. y Zoot. U.N.A.M. México*, D.F. 1975.
6. De la O.R.F.: Efectividad de la Prueba Tuberculina doble comparativa PPD aviar y bovina aplicada en ganado de raza HolsteinFreiesian del centro de recría de Cd. Jiménez, Chih., y del establo San Juan de la Colmena del municipio de Cd. Ojinaga Chih., Tesis de licenciatura, *Fac. de Est. Sup. Cuautitlán U.N.A.M. México*, D.F. 1984.

7. Del Rio, V. J. A.: Programa Sanitario para el control de la Tuberculosis en el Ganado Bovino, Memorias Crianza de Becerras, Fac. de Med. Vet. y Zoot. U.N.A.M. México, D.F. 1981.
8. Gibbons, W. J., Catcott, E. J., Smithcors, J. F.: Medicina y cirugía de los bovinos La Prensa Médica Mexicana, S.A., 1a. Edición, 1984.
9. Grijalva, R. A.: Determinación de Anticuerpos de origen Mycobacterial en bovinos por el método Hemaglutinación, Tesis de Licenciatura, Fac. de Med. Vet. y Zoot. U.N.A.M. México, D.F. 1966.
10. Hudson, L., Hay, F. C.: Inmunología Práctica. Ed. Jims, Barcelona, 1a. Edición, 1979.
11. Jawetz, E., Adelberg, E.A., Melnick, J.: Manual de Microbiología Médica. Ed. El Manual Moderno, 9a. Edición, 1981.
12. Jubb K. V. F., Kennedy F.C.: Patología de los Animales Domésticos. Ed. UPOME 1a. Edición.
13. Cangle, C.R., Figueroa, R. M.: Prevalencia de la Tuberculosis Bovina y su relación con la raza y la edad en la región de Tierra Caliente Guerrero X Congreso Nacional de Buiatría, Esc. de Med. Vet. y Zoot. de la Universidad Autónoma de Guerrero.
14. López, L. M. E.: Estudio comparativo entre la prueba Intradérmica y prueba de MIF para detección de tuberculosis en el ganado, Tesis de Licenciatura, Fac. de Med. Vet. y Zoot. U.N.A.M. México, D.F. 1978.

15. Moodie, P. A.: Tuberculin Reactions in BCGVaccinated cattle. Br. Vet. J., 133, 1977.
16. Perez, J.: Evaluación de las técnicas de Inmunodifusión y Contraelectroforesis en el diagnóstico del linfosarcoma bovino, Tesis de Licenciatura, Fac. de Med. Vet. y Zoot., U.N.A.M. México, D.F. 1984.
17. Poli, G.; Pozza, O., Ponti, W., Balsori, A., Vairica, G.: Application of Counterimmunoelectrophoresis for a rapid Serodiagnosis of Endemic Bovine Leukosis, Br. Vet. J., 136, 1980
18. Selim, S.A., Amin, M.M., ElSherif, M.I., ElSaifi, A.A.: Indirect Hemagglutination Test as means of diagnosis of tuberculosis in Egyptian Buffaloes, Bulletin of Animal Health and Production in Africa, 24, 1978.
19. Smith, H. A., Jones, T.C.: Patología Veterinaria, Ed. UIEHA, 1a. Edición, 1980.
20. Hizard, I.R.: Inmunología Veterinaria, Ed. Interamericana, 1a. Edición, 1979.
21. Vilchis, M.C.: Detección de Anticuerpos contra el virus de Leucosis Bovina por la técnica de Inmunodifusión, Tesis de Licenciatura, Fac. de Med. Vet. y Zoot., U.N.A.M. México, D.F. 1979.
22. Yugi, H., Nozaki, C.: Serologic Diagnosis of Bovine Tuberculosis. Am. J. Vet. Res., 33, 1972.